



HAL
open science

**Dynamique des communautés procaryotiques actives
dans l'élevage larvaires de la crevette bleue du Pacifique,
Penaeus stylirostris : influence des intrants et
identification de biomarqueurs bactériens de la santé des
larves**

Carolane Giraud

► **To cite this version:**

Carolane Giraud. Dynamique des communautés procaryotiques actives dans l'élevage larvaires de la crevette bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris* : influence des intrants et identification de biomarqueurs bactériens de la santé des larves. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2023. Français. NNT : 2023NCAL0003 . tel-04610311

HAL Id: tel-04610311

<https://unc.hal.science/tel-04610311>

Submitted on 13 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

THÈSE

présentée devant
L'UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE
ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE

par
Carolane GIRAUD

pour obtenir le grade de
DOCTEUR

Spécialité : **Biologie des populations et écologie | Écologie microbienne**

Dynamique des communautés procaryotiques actives dans les élevages larvaires de la crevette bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris* : influence des intrants et identification de biomarqueurs bactériens de la santé des larves

Travail réalisé au sein de l'Unité Lagons, Écosystèmes et Aquaculture durable en Nouvelle-Calédonie (LEAD-NC) de l'Ifremer et de l'Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA) de l'Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC)

Sous la direction de : **Viviane Boulo** (Ifremer) et **Nazha Selmaoui-Folcher** (UNC)
Sous l'encadrement de : **Nolwenn Callac** (Ifremer) et **Nelly Wabete** (Ifremer)

Soutenue publiquement le **26 Avril 2023** devant le jury formé par :

Benjamin Misson	MCF HDR, Université de Toulon, MIO	Rapporteur
Ludwig Jardillier	Pr, Université de Paris-Saclay, ESE	Rapporteur
Christine Paillard	DR, CNRS, LEMAR	Examinatrice
Pierre Galand	DR, CNRS, LECOB	Examinateur
Yves Letourneur	Pr, UNC, ENTROPIE	Examinateur
Viviane Boulo	CR HDR, Ifremer, IHPE	Directrice
Nazha Selmaoui-Folcher	Pr, UNC, ISEA	Directrice
Nolwenn Callac	CR, Ifremer, LEAD-NC	Encadrante



Remerciements

Les premiers mots de ce manuscrit sont les derniers écrits et marquent la fin de 3 années (et 2 mois) incroyables. Il est donc temps d'arriver au bout de cette dernière ligne droite et de remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnée au cours de cette thèse, tant dans les bons que dans les mauvais moments.

Rappelons d'abord que cette thèse est issue d'une collaboration entre l'unité Lagons, Écosystèmes et Aquaculture Durable en Nouvelle-Calédonie (LEAD-NC) de l'Ifremer et l'Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA) de l'Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC). Elle a été effectuée sous la co-direction de Viviane Boulo (IHPE, Ifremer) et de Nazha Selmaoui-Folcher (ISEA, UNC) ainsi que sous l'encadrement de Nolwenn Callac (LEAD-NC, Ifremer) et de Nelly Wabete (LEAD-NC, Ifremer). Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'École Doctorale du Pacifique (EDP) ainsi que du programme de recherche Ressources et Écosystèmes Aquacoles en Nouvelle-Calédonie (RESSAC) lui-même financé par un accord-cadre établi entre l'Ifremer, le Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie et les Provinces. Ce programme a d'ailleurs permis le financement de ma participation au congrès ISS10 (Lyon, France) ainsi que 2 missions de formation en France et à Tahiti.

Pour commencer, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce manuscrit ; les rapporteurs Benjamin Misson et Ludwig Jardillier ainsi que les examinateurs Christine Paillard, Pierre Galand et Yves Letourneur.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Linda Guentas, Véronique Bertheaux-Lecellier et Guillaume Cleuziou.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Emmanuel Tessier et Benoît Soulard ainsi qu'à Peggy Gunkel-Grillon pour leur accueil respectif au sein des équipes du LEAD-NC et de l'ISEA.

Je remercie mes co-directrices de thèse, Nazha Selmaoui-Folcher et Viviane Boulo, de m'avoir donnée l'opportunité de réaliser ce travail.

Nazha, puisque la biologie et l'informatique ne parlent pas la même langue, ça n'a pas toujours été évident de se comprendre mais merci de m'avoir donnée les clés nécessaires pour apprivoiser les analyses multivariées et les méta-analyses.

Viviane, merci pour cet encadrement à distance au cours duquel tu as toujours été disponible. Merci pour tous ces échanges (virtuels ou non et parfois tardifs) et pour ta rigueur qui m'ont permis de garder un esprit critique pour faire avancer mon travail. Merci aussi pour nos brefs moments en France, à Montpellier et à Paris.

Je remercie mes co-encadrantes Nelly Wabete et Nolwenn Callac de m'avoir guidée, soutenue et encouragée pendant ces 3 années.

Nelly (ou cheffe ou jefa, c'est toi qui choisis), tu es l'une de mes plus belles rencontres sur cette île. Merci d'avoir partagé avec moi toutes tes connaissances passionnantes sur le monde de la crevette et de m'avoir fait une place dans ton emploi du temps déjà surchargé. Sur un plan plus personnel, merci de m'avoir ouvert les portes de ta maison et de m'en avoir appris un peu plus sur la Nouvelle-Calédonie et ses plantes.

Nolwenn, sans toi cette thèse n'aurait tout simplement pas été possible. Je ne pense pas avoir les qualités rédactionnelles nécessaires pour t'exprimer correctement toute ma

reconnaissance et ma gratitude mais je vais essayer de faire au mieux. Je tiens à te remercier d'avoir été une encadrante brillante tant sur le plan professionnel que personnel. Te rencontrer à Banyuls en 2018 a été une chance incroyable et je n'en serai pas là aujourd'hui si tu n'avais pas été là. Merci de t'être battue pour cette thèse et d'avoir cru en moi (tu y sûrement plus que cru que moi d'ailleurs !). Évidemment, ce projet n'a pas toujours été facile, on a connu des galères de mission (entre les logements, les prières au dieu de la crevette et les grèves d'avion...) mais aussi beaucoup de galères informatiques (parce que c'est bien connu R et Inkscape ne nous comprennent pas). Malgré tout ça, tes conseils, ta bienveillance et ta gentillesse ont toujours su me faire rebondir. Merci pour toutes ces (longues) heures de travail et pour ton implication sans limite. Merci aussi pour tous nos moments de vie en dehors du labo ; les déménagements, les repas de Noël (ou pas d'ailleurs), les apéros... Tu es une personne formidable, je te souhaite le meilleur pour la suite, tu le mérites !

Je remercie également Dominique Pham pour son implication toujours bienveillante au cours de cette thèse. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions sur la crevette et son élevage avec bonne humeur. Avec Nelly, vous avez été mon encyclopédie styli ! Bon courage pour ton prochain encadrement de thèse, dernière ligne droite avant une retraite bien méritée !

Je remercie toutes les équipes de la SASV pour leur aide au cours de cette thèse et sans qui j'aurais sûrement eu beaucoup moins de données à analyser. Merci à toutes les personnes qui ont été impliquées de près ou de loin dans ce projet ainsi qu'à toutes celles qui font vivre la station.

Merci aux équipes éclosion et zootechnie, Jean-Sébastien, Jean-René, Pierre, Matehau, Julien L., Maxime et Vincent, d'avoir géré les élevages de la SASV et de m'avoir aidée à préparer le matériel pour les campagnes de prélèvement chez les privés.

Merci à Dominique et Florence pour leur implication dans les manips de biologie moléculaire et de chimie. Les filles merci de m'avoir formée et de m'avoir aidée pour les préparations de matériel (un véritable déménagement à chaque campagne !). Un merci tout particulier à Domi pour sa participation aux campagnes de prélèvement et pour les nombreux aller-retours Nouméa-Port Ouenghi en covoiturage.

Merci à Julien d'apporter de la bonne humeur dans le bureau.

Merci à tous les VSC qui sont passés par la station et qui ont contribué à l'avancement de ce projet : Célia, Armelle, Valentine, Gwenola, Valérie, Mélanie, Étienne et Thomas.

Merci à tous les autres avec qui je n'ai pas travaillé directement mais qui font aussi vivre le site : Eugénie, José, Jean-Marc et toute l'équipe du LEAD à Nouméa.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Groupement des Fermes Aquacoles et plus spécifiquement à Séverine Duval sans qui nos campagnes de prélèvement en éclosion privées n'auraient pas pu avoir lieu. Je remercie également toutes les éclosions du territoire et leurs équipes de nous avoir fait confiance et de nous avoir accueillies avec bienveillance. Merci pour ces échanges passionnants et pour votre disponibilité. Un merci particulier à Philippe M. pour ses nombreuses blagues, à David et Philippe R. pour leur immense gentillesse ainsi que leur disponibilité et à Anthony pour sa cuisine et son partage d'expérience.

Je remercie également les équipes de l'IHPE à Montpellier et du SeBiMER (Ifremer, Brest) chez qui j'ai eu l'occasion de faire de brèves missions pour des échanges scientifiques très intéressants et qui ont fait évoluer mon raisonnement ainsi que mon projet. Un merci tout particulier à Cyril Noël qui m'a grandement aidée pour la méta-analyse. Merci d'avoir partagé

ton expertise avec moi et de t'être arraché les cheveux pour faire parler ces données sans leur faire dire n'importe quoi.

Je remercie Claire Goarant de m'avoir fait confiance et de m'avoir confiée ses étudiants de L1 pour ma première expérience, plus que positive, d'enseignements.

Je remercie ma stagiaire préférée Claudia Wabete pour sa bonne humeur quotidienne, ses bons gâteaux hebdomadaires (tu sais si bien me parler !) et son sérieux au travail. J'ai été ravie que tu sois ma toute première stagiaire !

Je remercie également les étudiants que j'ai pu encadrer en projet tutoré, Mathilde Nyikieine, Dimitri Tran et Cassandra Lamataki, qui ont été bienveillants devant mes codes R pas toujours protocolaires. Merci pour votre investissement, votre bonne volonté et votre bonne humeur.

Sur un plan plus personnel, je remercie toutes mes belles rencontres calédoniennes ; Anthony, Aurélien et Célia.

Antho merci d'avoir accepté de partager ton quotidien avec ma thèse (quelque peu omniprésente ces derniers temps !). Merci pour ta gentillesse, tes bons repas et tes gâteaux (et merci d'avoir le même humour que moi !). Surtout, merci à toi et ta famille pour votre accueil à bras ouverts.

À mes collègues devenus ami(e)s, Aurél et Cécé, merci pour vos potins et vos histoires toutes plus improbables les unes que les autres, vous avez égayé ma vie à la station ! Ma Cécé malgré les (trop nombreuses) galères, on a de sacrés souvenirs, tu es quand même la seule personne qui a réussi à me traîner en boîte, et ça je pense que ça dit tout sur ce je pense de toi !

Je remercie le meilleur groupe d'ami(e)s dont on puisse rêver : Isa, Max, Nico, Estelle et Bastien. On a hâte de vous retrouver les copains, on a 3 ans à rattraper !

Je remercie la meilleure binôme de tous les temps, ma Juju ! Sans toi mes années master n'auraient pas du tout été les mêmes et mes années thèse non plus. L'un des plus gros points négatifs de cette thèse est sûrement de ne pas t'avoir vue pendant plus de 3 ans mais l'expression (un peu cheesy) loin des yeux près du cœur prend tout son sens. Merci pour nos interminables appels visio où j'ai pu vider mon sac plus d'une fois.

Je remercie toute ma famille et ma belle-famille et plus particulièrement mes parents et mes beaux-parents.

Philippe et Isabelle merci pour votre soutien, vos encouragements et votre aide, quelle chance d'avoir des beaux-parents comme vous ! Promis je ramène votre fils rapidement en métropole.

Papa, Maman, je l'ai fait ! merci pour votre soutien sans faille et vos encouragements depuis toutes ces années. Merci de m'avoir donnée l'opportunité de faire ce que je voulais. Merci de m'avoir transmis vos valeurs. Merci pour votre amour inconditionnel, plus que réciproque.

Enfin, je remercie tout particulièrement l'homme qui a été assez fou pour tout quitter et me suivre à l'autre bout du monde en pleine pandémie mondiale. Si cette thèse s'est aussi bien passée c'est en grande partie grâce à toi Do, tu as été mon plus grand soutien et ma plus grande motivation. On a connu 5 ans de brigade, 1 an de galère et 3 ans de thèse (agrémentées de quelques confinements) alors je pense qu'on est parés pour la suite Vallot !

*À mon grand-père avec qui je danserai toujours joue contre joue,
À Germaine Vallot à qui nous aurions aimé dire au revoir une dernière fois...*

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	6
Liste des figures	12
Liste des tableaux	16
Liste des abréviations	18
Introduction générale	22
I- Chapitre I – État de l’art	26
I.1- La crevetticulture, du monde à la Nouvelle-Calédonie	26
I.1.1- Place de la crevette dans l’aquaculture mondiale	26
I.1.1.a- Chiffres clés de l’aquaculture	26
I.1.1.b- Crevetticulture	26
I.1.2- Crevetticulture en Nouvelle-Calédonie	27
I.1.2.a- Historique	27
I.1.2.b- Enjeux socio-économiques.....	29
I.1.2.c- Difficultés de production	30
I.2- <i>Penaeus stylirostris</i> : présentation du modèle d’étude	32
I.2.1- Présentation et morphologie de l’espèce	32
I.2.1.a- Origine et classification	32
I.2.1.b- Morphologie.....	33
I.2.2- Reproduction et cycle de vie des crevettes pénéides en milieu naturel.....	34
I.2.3- Reproduction et cycle de vie de <i>Penaeus stylirostris</i> en conditions maîtrisées	35
I.2.3.a- Élevage des géniteurs en bassins.....	35
I.2.3.b- Acclimatation et maturation des géniteurs.....	36
I.2.3.c- Reproduction des géniteurs.....	36
I.2.3.d- Élevage larvaire en écloserie	36
I.2.3.e- Élevage post-larvaire en nurserie	37
I.2.4- Présentation des stades larvaires.....	38
I.2.4.a- Le stade larvaire nauplius	38
I.2.4.b- Le stade larvaire zoé.....	39
I.2.4.c- Le stade larvaire mysis.....	40
I.2.4.d- Post-larves	41
I.3- Le microbiote ou les microorganismes au service de leur hôte	41
I.3.1- Historique et définitions.....	41
I.3.1.a- Les 3 phases majeures de la microbiologie	41
I.3.1.b- Caractérisation de l’holobionte.....	43
I.3.2- Le microbiote intestinal humain	45
I.3.2.a- Quelques données clés.....	45
I.3.2.b- Rôle du microbiote intestinal humain dans la digestion et l’immunité.....	45
I.3.3- Microbiote d’espèces aquacoles d’intérêt économique	47
I.3.3.a- Microbiote et poissons	47
I.3.3.b- Microbiote et bivalves (mollusques)	48
I.3.3.c- Microbiote et crustacés marins	49
I.3.4- Le microbiote des crevettes, de la larve à l’adulte.....	51
I.3.4.a- Le microbiote larvaire.....	51
I.3.4.b- Microbiote et crevettes adultes	54

I.4- Analyses multivariées et méta-analyses pour étudier le microbiote	57
I.4.1- Définitions	57
I.4.1.a- Analyses multivariées	57
I.4.1.b- Méta-analyses	57
I.4.2- Méta-analyses pour l'étude du microbiote des crevettes	59
I.4.3- Limites des méta-analyses	63
II- Chapitre II – Matériels et méthodes	66
II.1- Élevages larvaires réalisés dans le cadre de cette thèse et échantillonnages	66
II.1.1- Élevage larvaire à la Station Aquacole de Saint-Vincent (SASV).....	67
II.1.1.a- Traitement de l'eau de la baie de Saint Vincent aux bacs d'élevage larvaire.....	67
II.1.1.b- Nourrissage des larves à la SASV	69
II.1.2- Élevage larvaire à l'écloserie privée 1	70
II.1.2.a- Traitement de l'eau de la baie aux bacs d'élevage larvaire.....	70
II.1.2.b- Nourrissage des larves à l'écloserie privée 1.....	70
II.1.3- Élevage larvaire à l'écloserie privée 2	72
II.1.3.a- Traitement de l'eau de la baie aux bacs d'élevage larvaire.....	72
II.1.3.b- Nourrissage des larves à l'écloserie privée 2.....	72
II.2- Échantillonnages.....	74
II.2.1- Échantillonnages en élevage larvaire	74
II.2.1.a- Échantillons d'eau	74
II.2.1.b- Échantillons de larves.....	75
II.2.1.c- Échantillons de nourriture	75
II.2.2- Échantillonnages des géniteurs.....	76
II.3- Paramètres zootechniques.....	77
II.3.1- Taux de survie larvaire	77
II.3.2- Indice de croissance	77
II.4- Paramètres de qualité physico-chimique de l'eau	77
II.4.1- Température, pH et salinité	77
II.4.2- Paramètres de matière organique dissoute colorée (CDOM).....	77
II.4.3- Dosage des sels nutritifs.....	78
II.4.3.a- Dosage des TAN (Total Ammonium Nitrogen, NH ₃ -N et NH ₄ ⁺).....	78
II.4.3.b- Dosage des SRP (Soluble Reactive Phosphorus, PO ₄ ³⁻ , HPO ₄ ²⁻ et H ₂ PO ₄ ⁻)	78
II.5- Méthodes de biologie moléculaire et évaluation de la diversité microbienne active	79
II.5.1- Extractions ARNs, rétrotranscriptions ADNc et séquençage.....	79
II.5.2- Traitement des données de séquençage	80
II.5.3- Analyses de la diversité microbienne.....	80
II.6- Méta-analyse	81
III- Chapitre III – De l'échantillon aux analyses de diversité : choix d'une méthode optimale	86
III.1- ARN et ADNc pour étudier les communautés microbiennes actives.....	86
III.2- Le séquençage	86
III.2.1- Historique du séquençage.....	86
III.2.2- Le séquençage Illumina	87
III.2.3- Le métabarcoding.....	90
III.3- Différentes stratégies d'analyses des résultats de séquençage	91
III.3.1- La méthode FROGS : Find Rapidly OTUs using Galaxy Solution	91
III.3.1.a- Démultiplexage.....	93
III.3.1.b- Pré-traitement.....	93
III.3.1.c- Clustering.....	93

III.3.1.d- Suppression des chimères	94
III.3.1.e- Filtres	95
III.3.1.f- Attribution taxonomique.....	95
III.3.2- La méthode DADA2 : Divide Amplicon Denoise Algorithm.....	95
III.3.2.a- Identification des séquences	96
III.3.2.b- Filtres.....	96
III.3.2.c- Taux d'erreur	96
III.3.2.d- Dé-réplication.....	98
III.3.2.e- Construction des ASVs.....	98
III.3.2.f- Assemblage	98
III.3.2.g- Suppression des chimères	98
III.3.2.h- Attribution taxonomique.....	98
III.3.3- Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) et Variants de Séquence d'Amplicon (ASV).....	99
III.3.3.a- Différences entre un OTU et un ASV	99
III.3.3.b- Comment choisir ?.....	99
III.4- Normalisation	100
III.4.1- Pourquoi normaliser ?.....	101
III.4.2- Principales méthodes de normalisation.....	102
III.4.2.a- La raréfaction.....	102
III.4.2.b- Méthodes basées sur les proportions	103
III.4.2.c- Méthodes plus complexes	104
III.4.3- Quelle normalisation choisir ?.....	107
IV- Chapitre IV – Des transmissions horizontales et verticales modulent le microbiote actif des œufs et des nauplii de <i>Penaeus stylirostris</i>	110
IV.1- Étude A – Premières preuves de transmission horizontale	110
IV.1.1- Introduction	110
IV.1.2- Article 1 – Potential lineage transmission within the active microbiota of the eggs and the nauplii of the shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> : possible influence of the rearing water and more.....	111
IV.1.3- Synthèse des résultats et perspectives	135
IV.2- Étude B – Contributions des géniteurs et de l'eau d'élevage au cours de la mise en place du microbiote larvaire	136
IV.2.1- Introduction	136
IV.2.2- Article 2 – The active microbiota of the eggs and the nauplii of the Pacific blue shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> partially shaped by a potential vertical transmission	138
IV.2.3- Synthèse des résultats et perspectives.....	151
V- Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé	154
V.1- Introduction	154
V.2- Article 3 – Environmental factors and potential probiotic lineages shape the active microbiota associated with healthy <i>Penaeus stylirostris</i> larvae and their rearing water	155
V.3- Synthèse des résultats et perspectives.....	190
VI- Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs	194
VI.1- Introduction	194
VI.2- Article 4 – Microbiota of the rearing water of <i>Penaeus stylirostris</i> larvae influenced by lagoon seawater and specific key lineages of larval stage and survival	196

VI.3- Article 5 – Microbial biomarker detection in shrimp larvae rearing water as putative biosurveillance proxies in shrimp aquaculture	215
VI.4- Synthèse des résultats et perspectives.....	252
VII- Chapitre VII – Méta-analyse : cores microbiens et biomarqueurs bactériens.....	258
VII.1- Normalisation par les méthodes DESeq2 et CPM et ordonnancements de l'ensemble des échantillons d'élevage	258
VII.1.1- Rappel des méthodes d'analyse de la diversité bêta	258
VII.1.2- Interprétation des résultats	259
VII.2- Recherche de cores microbiens.....	262
VII.2.1- Identification des ASVs	262
VII.2.2- Influence des intrants	264
VII.3- ASVs différenciellement abondants en fonction de l'état de santé des élevages	265
VII.3.1- ASVs différenciellement abondants dans les eaux d'élevage	265
VII.3.2- ASVs différenciellement abondants dans les larves.....	268
VII.3.3- Comparaison des ASVs différenciellement abondants	269
VII.4- Influence des intrants et identification de potentiels biomarqueurs	270
VII.4.1- Biomarqueurs des élevages en bonne santé	270
VII.4.2- Biomarqueurs des élevages en mauvaise santé	277
VIII- Chapitre VIII – Conclusions générales.....	284
VIII.1- Synthèse, discussion et perspectives.....	284
VIII.1.1- Transmissions horizontales et verticales au cours de la mise en place du microbiote larvaire..	284
VIII.1.2- Eutrophisation du milieu d'élevage	285
VIII.1.3- Évolution du microbiote des élevages au cours du développement larvaire	286
VIII.1.4- Influence des intrants	290
VIII.1.5- Biomarqueurs bactériens de la santé des élevages larvaires	290
VIII.1.5.a- Biomarqueurs bactériens de bonne santé : vers la maîtrise des communautés procaryotiques associées aux élevages et identification de potentiels nouveaux probiotiques.....	290
VIII.1.5.b- Biomarqueurs bactériens de mauvaise santé : outils de détection des mortalités à venir	293
VIII.2- Points de discussion et limites de l'étude.....	294
VIII.2.1- Communautés procaryotiques actives.....	294
VIII.2.2- Biais expérimentaux.....	295
VIII.2.3- Un jeu de données à compléter	296
VIII.3- Conclusion	296
Bibliographie	298
Annexes.....	308
VIII.1- Annexe 1 – Le séquençage de Sanger	308
VIII.2- Annexe 2- Le pyroséquençage.....	310
VIII.3- Annexe 3 - Le séquençage IonTorrent	313
Appendices	314
Appendice 1 : Obtention du Prix Jeunes Talents France Fondation L'Oréal-UNESCO Pour les Femmes et la Science (2022)	314
Appendice 2 : Diffusions scientifiques	316
Présentations orales.....	316

Posters.....	316
Appendice 3 – Formations	319
Formations dispensées par l'École Doctorale du Pacifique.....	319
Autres formations	319
Appendice 4 – Encadrements et enseignements	320
Encadrements	320
Enseignements	320
Appendice 5 – Communication auprès du grand public	321
Presse	321
Activités et événements.....	321
VIII.3.1.a- Nuit de la Science 2022	321
VIII.3.1.b- Journée Mondiale des Océans 2021	322
Appendice 6 – Articles scientifiques publiés au cours de la thèse mais ne portant pas sur le sujet de thèse.....	323
Article 1 – Microbial diversity and activity during the biodegradation in seawater of various substitutes of conventional plastic cotton swab sticks (Jacquin et al. 2021)	323
Article 2 – Evidence of coupled autotrophy and heterotrophy on plastic biofilms and its influence on surrounding seawater (Conan et al. 2022)	324
Résumé.....	327
Abstract.....	327

Liste des figures

FIGURE 1 – Contributions de la pêche et de l'aquaculture à la production mondiale d'animaux aquatiques.

FIGURE 2 – Animaux aquatiques majoritairement produits pas l'aquaculture en 2020.

FIGURE 3 – Crevette bleue du Pacifique (*Penaeus stylirostris*) adulte.

FIGURE 4 - Part de la production de la crevette bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris*, dans la production mondiale aquacole de Crustacés.

FIGURE 5 – Carte des infrastructures crevetticoles sur la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie.

FIGURE 6 – Production aquacole de crevettes bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris*, en Nouvelle-Calédonie.

FIGURE 7 – Production aquacole de post-larves de *Penaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie.

FIGURE 8 – Déroulement d'un élevage de crevettes, *Penaeus stylirostris*, en Nouvelle-Calédonie.

FIGURE 9 – Morphologie des crevettes pénéides.

FIGURE 10 – Dimorphisme sexuelle de la crevette bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris*.

FIGURE 11 – Cycle de développement des crevettes pénéides en milieu naturel.

FIGURE 12 – Zones d'élevage de crevettes en conditions contrôlées à la Station Aquacole de Saint Vincent.

FIGURE 14 – Larves nauplii 1 à 6.

FIGURE 13 – Succession des stades larvaires de *Penaeus stylirostris*.

FIGURE 15 – Larves zoé 1 à 3.

FIGURE 16 – Larves mysis 1 à 3.

FIGURE 17 – Post-larve.

FIGURE 18 – Bref historique de la microbiologie.

FIGURE 19 – État des lieux des méthodes « omics ».

FIGURE 20 – Visualisation du phénomène de dysbiose.

FIGURE 21 – Implication du microbiote intestinal humain dans la digestion.

FIGURE 22 – Implication du microbiote intestinal humain dans l'immunité.

FIGURE 23 – Espèces de mollusques les plus cultivées en aquaculture en 2022.

FIGURE 24 – Communautés microbiennes majoritaires mises en évidence dans la littérature traitant des microorganismes associés aux larves de crevettes, *Penaeus vannamei*, et à leur environnement.

FIGURE 25 – Familles bactériennes mises en évidence par Zheng et al. (2017) dans l'eau d'élevage des larves aux stades zoé 1 (Z1), zoé 3 (Z3), mysis 1 (M1), mysis 3 (M3), post-larve 1 (P1), post-larve 3 (P3) et post-larve 6 (P6).

FIGURE 26 – Facteurs susceptibles d'influencer le microbiote intestinal des crevettes adultes.

FIGURE 27 – Pyramide de la hiérarchie des preuves en recherche médicale.

FIGURE 28 – Répartition des échantillons considérés par le méta-analyse de Cornejo-Granados et al. (2018).

FIGURE 29 – Répartition des échantillons considérés par la méta-analyse de Yu et al. (2018).

FIGURE 30 – Répartition des échantillons considérés par la méta-analyse de Sha et al. (2022).

FIGURE 31 – Chronologie des campagnes de prélèvement des échantillons analysés au cours du projet de thèse.

FIGURE 32 – Traitement de l'eau de remplissage des bacs d'élevage larvaire utilisé à la Station Aquacole de Saint Vincent.

FIGURE 33 – Protocoles d'élevage larvaire réalisés à la Station Aquacole de Saint Vincent.

FIGURE 34 – Traitement de l'eau de remplissage des bacs d'élevage larvaire utilisé à l'écloserie privée 1.

FIGURE 35 – Protocole d'élevage larvaire appliqué à l'écloserie privée 1.

FIGURE 36 – Traitement de l'eau de remplissage des bacs d'élevage larvaire utilisé à l'écloserie privée 2.

FIGURE 37 – Protocole d'élevage larvaire appliqué à l'écloserie privée 2.

FIGURE 38 – Casque de prélèvement de l'eau.

FIGURE 39 – Poste de filtration des échantillons d'eau.

FIGURE 40 – Protocole d'échantillonnages employé lors de la campagne géniteurs en mai 2021 à la Station Aquacole de Saint Vincent.

FIGURE 41 – Méthodes de calcul des distances de Bray-Curtis, Jaccard, weighted UniFrac et UniFrac.

FIGURE 42 – Historique du séquençage.

FIGURE 43 – Séquençage Illumina.

FIGURE 44 – Structure du gène codant pour l'ARNr 16S.

FIGURE 45 – Exemple d'un fichier fastq contenant deux séquences.

FIGURE 46 – Schéma du workflow FROGS implanté dans la plateforme GALAXY (Escudié et al. 2018).

FIGURE 47 – Formation d'une séquence chimérique au cours du processus PCR.

FIGURE 48 – Processus d'identification des chimères.

FIGURE 49 – Schéma du pipeline DADA2 implanté dans le package DADA2 sous R (Callahan et al. 2016).

FIGURE 50 – Normalisation par la méthode de raréfaction.

FIGURE 51 – Exemples de méthodes de normalisation basées sur les proportions.

FIGURE 52 – Normalisation par la méthode DESeq2 (Differential Expression Analysis for Sequence count data).

FIGURE 53 – Normalisation par la méthode edgeR.

FIGURE 54 – Normalisation par la méthode CSS (Cumulative Sum Scaling).

FIGURE 55 – NMDS (Non Metric Dimensional Scaling) basées sur des matrices de distances de Jaccard, Bray-Curtis, UniFrac ou weighted UniFrac obtenues à partir des données d'élevage normalisées par A) la méthode DESeq2 ou B) la méthode CPM.

FIGURE 56 – A) Diagramme de Venn des ASVs mis en évidence dans les cores microbiens des eaux d'élevage, des larves et de l'ensemble des échantillons. Taxonomie des ASVs identifiés dans les cores microbiens A) des eaux d'élevage, B) des larves et C) de l'ensemble des échantillons d'élevage (communs eaux et larves).

FIGURE 57 – Comparaison des ASVs différentiellement abondants dans les eaux d'élevage en fonction du stade larvaire et de l'état de santé des animaux.

FIGURE 58 – Abondances relatives moyennes des ASVs différentiellement abondants mis en évidence par ANCOM-BC (184 ASVs).

FIGURE 59 – ASVs différentiellement abondants dans les larves en fonction du stade larvaire et de l'état de santé des animaux.

FIGURE 60 – Abondances relatives moyennes des ASVs différentiellement abondants mis en évidence par ANCOM-BC (193 ASVs).

FIGURE 61 – Nombre d'ASVs présents dans les eaux d'élevage ou dans les larves en fonction de l'état de santé des animaux.

FIGURE 62 – Suivi de la présence / absence, dans les intrants, des 189 ASVs les plus abondants dans les échantillons d'eau et de larves des élevages en bonne santé.

FIGURE 63 – Suivi de la présence / absence, dans les intrants, des 90 ASVs les plus abondants dans les échantillons d'eau et de larves des élevages en bonne santé, absents des intrants des élevages en mauvaise santé (campagnes M1, M3 et M4 réalisées à la SASV) et présents dans au moins un type d'intrant de l'ensemble des élevages en bonne santé (campagnes E1 et E2 réalisées dans les écloseries privées 1 et 2).

FIGURE 64 – Suivi de la présence / absence, dans les intrants, des 121 ASVs les plus abondants dans les échantillons d'eau et de larves des élevages en mauvaise santé.

FIGURE 65 – Suivi de la présence / absence, dans les intrants, des 13 ASVs les plus abondants dans les échantillons d'eau et de larves des élevages en mauvaise santé, absents des intrants des élevages en bonne santé (campagnes E1 et E2 réalisées dans les écloseries privées 1 et 2) et présents dans au moins un type d'intrant de l'ensemble des élevages en mauvaise santé (campagnes M1, M3 et M4 réalisées à la SASV).

FIGURE 66 – Processus écologiques déterministes et stochastiques d'assemblages de communautés microbiennes.

FIGURE 67 – Méthodes de détermination du core microbien.

FIGURE 68 – Réponse immunitaire chez les crevettes pénéides.

FIGURE 69 – Schéma bilan résumant les Interactions hôte – microbiote – environnement au sein des élevages de *Penaeus stylirostris*.

FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 1 – Di-désoxyribonucléotide.

FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 2 – Séquençage de Sanger.

FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 3 – Principe de synthèse des acides nucléiques.

FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 4 – Processus de transformation du pyrophosphate en lumière.

FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 5 – Pyroséquençage 454.

FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 6 – Séquençage IonTorrent

Liste des tableaux

TABLEAU 1 – Principales publications traitant du microbiote larvaire de crevettes d'intérêt aquacole et utilisant une technique de séquençage.

TABLEAU 2 – Liste non exhaustive des analyses multivariées les plus utilisées pour l'analyse du microbiote.

TABLEAU 3 – Techniques utilisées par les études considérées dans la méta-analyse de Cornejo-Granados et al. (2018).

TABLEAU 4 – Techniques utilisées par les études considérées dans la méta-analyse de Yu et al. (2018).

TABLEAU 5 – Techniques utilisées par les études considérées dans la méta-analyse de Sha et al. (2022).

TABLEAU 6 – Détails des élevages larvaires réalisés à la Station Aquacole de Saint Vincent et analysés au cours du projet de thèse.

TABLEAU 7 – Composition des réactifs des dosages TAN (Total Ammonium Nitrogen) et SRP (Soluble Reactive Phosphorus).

TABLEAU 8 – Présentation des indices de diversité utilisés au cours de cette thèse.

TABLEAU 9 – Comparaison des technologies de séquençage de 2ème génération.

TABLEAU 10 – Exemple d'une table d'ASVs.

TABLEAU 11 – Illustration de trois librairies au sein d'une table d'ASVs.

TABLEAU 12 – Taux de survie des bacs d'élevage suivis au cours des campagnes M1 (encadrées en noir), M3 (encadrées en rouge), M4 (encadrées en orange), E1 (encadrées en vert) et E2 (encadrées en bleu).

TABLEAU 13 – Comptages non normalisés des ASVs identifiés dans les cores microbiens des eaux d'élevage, des larves et de l'ensemble des échantillons.

TABLEAU 14 – Taxonomie des 29 ASVs mis en évidence comme potentiels biomarqueurs de la bonne santé des élevages dans les échantillons d'eau.

TABLEAU 15 – Taxonomie des 27 ASVs mis en évidence comme potentiels biomarqueurs de la bonne santé des élevages dans les échantillons de larves.

TABLEAU 16 – Taxonomie des 28 ASVs mis en évidence comme potentiels biomarqueurs de la bonne santé des élevages dans les échantillons d'eau et de larves.

TABLEAU 17 – Taxonomie des 9 ASVs mis en évidence comme potentiels biomarqueurs d'une dégradation de l'état de santé larvaire.

Liste des abréviations

- **A0** : Antibiotique ajouté le jour de l'ensemencement des larves dans les bacs d'élevage (J0)
- **A3** : Antibiotique ajouté dans les bacs d'élevage à partir du 3ème jour d'élevage (J3)
- **ACC** : Analyse Canonique des Correspondances
- **ACE** : Abundance-based Coverage Estimator
- **ACM** : Analyse en Correspondances Multiples
- **ACP** : Analyse en Composantes Principales (PCA en anglais, Principal Component Analysis)
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **ADNc** : ADN complémentaire
- **AFM** : Analyse Factorielle Multiple
- **ANCOM-BC** : Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction
- **ANOVA** : Analysis Of Variance
- **AQUACAL** : Aquaculture en Nouvelle-Calédonie
- **ARN** : Acide ribonucléique (RNA en anglais)
- **ARNi** : ARN interférent
- **ARNm** : ARN messager
- **ARNr** : ARN ribosomal
- **ARNt** : ARN de transfert
- **ASV** : Amplicon Sequence Variant (Variant de séquence d'amplicon)
- **CAH** : Classification Ascendante Hiérarchique
- **CAZymes** : Carbohydrate Active Enzymes
- **CDOM** : Colored Dissolved Organic Matter (Matière organique dissoute colorée)
- **CFP** : Change Franc Pacifique
- **CNEXO** : Centre National pour l'Exploitation des Océans
- **CPM** : Count Per Million
- **CPS** : Commission du Pacifique Sud
- **CSS** : Cumulative Sum Scaling
- **DADA2** : Divide Amplicon Denoising Algorithm
- **dbOTU** : Distribution-Based Operational Taxonomic Unit-calling
- **DESeq** : Differential Expression Analysis for Sequence data count

- **DNase** : Désoxyribonucléase
- **dNTP** : Désoxyribonucléotide triphosphate en mélange [dATP (désoxyadénine triphosphate), dTTP : (désoxythymine triphosphate), dGTP (désoxyguanine triphosphate), dCTP (désoxycytosine triphosphate)]
- **E1, E2** : Campagnes de prélèvements réalisées dans 2 écloséries privées de Nouvelle-Calédonie (1 et 2) en août et novembre 2020
- **EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique
- **FAO** : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation Mondiale des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)
- **FLASH** : Fast Length Adjustment of Short reads
- **FROGS** : Find Rapidly OTUs using Galaxy Solution
- **GRD** : Growth Retardation Disease
- **HCl** : Acide chlorhydrique
- **IEMH** : Action Interactions Environnement - Microbiote - Hôte
- **Ifremer** : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
- **IHHNV** : Infectious Hematopoietic and Hypodermal Necrosis Virus (virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse)
- **ISEA** : Institut des Sciences Exactes et Appliquées
- **LEAD-NC** : Unité Lagons, Écosystèmes et Aquaculture Durable en Nouvelle-Calédonie de l'Ifremer
- **LEfSe** : Linear discriminant analysis with effect size (Analyse discriminante linéaire avec effet de taille)
- **M1, M3, M4** : Campagnes de prélèvements réalisées à la Station Aquacole de Saint Vincent en septembre 2018, novembre 2018 et février 2019
- **Med** : Médiane
- **NGS** : Next Generation Sequencing (Séquençage haut débit)
- **NMDS** : Non-Metric Dimensional Scaling
- **NT** : Non traité (désigne l'eau non traitée des bacs d'élevages larvaires de la Station Aquacole de Saint Vincent)
- **OTC** : Oxytétracycline
- **OTU** : Operationnal Taxonomic Unit (unité taxonomique opérationnelle)
- **pb** : Paires de bases

- **PCoA** : Principal Component Analysis (Analyse en Coordonnées Principales)
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PERMANOVA** : Permutational Analysis Of Variance
- **pH** : Potentiel hydrogène
- **POMS** : Pacific Oyster Mortality Syndrome
- **ProPO** : Prophénol Oxidase
- **PRR** : Pathogen Recongnition Receptor
- **qPCR** : PCR quantitative
- **RDA** : Redundancy Analysis (Analyse de redondance)
- **RDP** : Recombination Detection Program
- **RESSAC** : Ressources et Écosystèmes Aquacoles en Nouvelle-Calédonie
- **RNase** : Ribonucléase
- **SA** : Sans Antibiotique
- **SASV** : Station Aquacole de Saint-Vincent
- **SODACAL** : Société d'aquaculture calédonienne
- **SpDUOX** : Dual Oxidase
- **SR** : Slope Ratio (Ratio des pentes spectrales de 275 à 295nm et de 350 à 400nm)
- **sRNA** : Small RNA
- **SRP** : Soluble Reactive Phosphorus (Phosphates réactifs solubles)
- **T** : Traité (désigne l'eau non traitée des bacs d'élevages larvaires de la Station Aquacole de Saint Vincent)
- **TAN** : Total Ammonia Nitrogen (Azote ammoniacal total)
- **TSS** : Total Sum Scaling
- **UNC** : Université de la Nouvelle-Calédonie
- **UniFrac** : Unique Fraction metric
- **UQ** : Upper Quartile
- **USD** : United States Dollar
- **UV** : Ultra-violet
- **WFS** : White Feces Syndrom
- **WSSV** : White Spot Syndrome Virus

Introduction générale

La production mondiale d'animaux aquatiques a augmenté de plus de 60% au cours des 30 dernières années. Le développement massif de l'aquaculture sur cette période explique en grande partie cette augmentation. En 2020, l'espèce animale la plus produite, toutes espèces aquacoles confondues, était la crevette à pattes blanches, *Penaeus vannamei*, témoignant de l'importance de la crevetticulture au sein des marchés aquacoles mondiaux. En Nouvelle-Calédonie, la crevette bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris*, est produite depuis les années 1970. À l'heure actuelle, son statut de premier exportateur agro-alimentaire et les emplois générés au sein de la filière confèrent à la crevetticulture calédonienne un rôle socio-économique essentiel à l'échelle du territoire. Cependant, après avoir été fortement impactée par des vibrioses causées par *Vibrio penaeicida* (Mermoud et al. 1998) et *V. nigripulchritudo* (Goarant et al. 1999; 2006), la production de crevettes en Nouvelle-Calédonie est à nouveau freinée, depuis 2005, par des mortalités larvaires massives non expliquées touchant l'ensemble des écloséries du territoire. Ces dernières étaient d'ailleurs au nombre de 4 au début du projet et ne sont plus que 3 à l'heure actuelle (2023). Diverses expérimentations menées au cours de ces dernières années ne permettent pas, pour l'instant, de mettre en évidence l'implication de pathogènes viraux ou bactériens dans cette diminution de production de post-larves. De plus, l'occurrence des mortalités étant variable au sein d'élevages larvaires provenant d'un même lot de fécondations et élevés dans un même environnement, les pistes liées à une potentielle baisse de la fécondité des géniteurs et de la qualité de leurs larves semblent pouvoir être écartées. Par ailleurs, suite au développement de nouvelles techniques pour étudier les microorganismes, de nombreuses publications scientifiques ont montré l'importance du microbiote sur la physiologie de l'hôte. Des méthodes analytiques ont également été développées pour comprendre la dynamique de ces communautés microbiennes et des nombreux facteurs biotiques et abiotiques les modulant. Des approches biostatistiques, combinant analyses multivariées et méta-analyses, ont récemment permis d'identifier des bioindicateurs microbiens de l'état de santé de crevettes d'élevage ; démontrant ainsi le rôle essentiel des communautés microbiennes au sein des systèmes aquacoles.

En Nouvelle-Calédonie, l'ensemble des écloséries du territoire pompent l'eau de mer du milieu naturel pour remplir leurs bacs d'élevage. Ces derniers sont donc en système ouvert avec l'eau du lagon qui possède des caractéristiques physico-chimiques (qualité de l'eau) et des assemblages microbiens (microbiote) susceptibles de varier selon différents facteurs. Des études ont, par exemple, montré que les saisons et les phénomènes climatiques comme les fortes pluies entraînent des variations du pH, de la salinité, de la quantité d'oxygène et de la concentration en nutriments de l'eau de mer (Van Den Broeck et al. 2004; Satpathy et al. 2010). Ces facteurs sont également susceptibles d'influencer la dynamique des communautés microbiennes en présence (Hutchins & Fu 2017). De plus, l'anthropisation croissante des milieux marins et terrestres conduit à une augmentation des polluants organiques et chimiques (eutrophisation, pesticides, herbicides, antibiotiques, etc.) qui modulent la biologie et la chimie des écosystèmes côtiers (Cloern 2001; Hutchins & Fu 2017). Or, la qualité de l'eau d'élevage et les variations des communautés microbiennes associées à cette eau sont susceptibles d'influencer le microbiote larvaire impactant ainsi la physiologie et la qualité des larves et donc, à fortiori, leur survie. Dans ce contexte, **les variations des communautés**

procaryotiques associées aux élevages pourraient-elles expliquer les mortalités larvaires observées ? Afin de répondre à cette question ce projet de thèse a eu comme objectif :

- d'étudier les facteurs influençant la mise en place des communautés procaryotiques associées aux œufs ainsi qu'aux stades larvaires précoces (Giraud et al. 2021, 2022) ;
- de caractériser les communautés procaryotiques associées à des élevages soumis ou non à de fortes mortalités (Callac et al. 2022; Callac et al. *In review*; Giraud et al. *In prep.*) ;
- de réaliser une méta-analyse regroupant l'ensemble des données issues d'élevages larvaires soumis ou non à de fortes mortalités et conduits au sein de différentes écloséries entre 2018 et 2020.

Afin de répondre à ces objectifs, plusieurs élevages larvaires, effectués dans plusieurs écloséries du territoire et soumis ou non à des épisodes de fortes mortalités, ont été considérés. Pour chacun de ces élevages, des paramètres zootechniques relatifs à la survie et au développement des larves ont été quotidiennement calculés. En parallèle, la température, le pH et la salinité des eaux de remplissage (provenant du lagon) et d'élevages ont été mesurés afin d'analyser leur qualité, et des dosages de nutriments (azote et phosphate) et de matière organique ont également été réalisés. Par ailleurs, des échantillons d'eau, de larves et de nourriture ont été quotidiennement prélevés au cours des élevages afin d'étudier les communautés procaryotiques actives associées à ces échantillons. Des analyses multivariées ont été conduites sur l'ensemble des paramètres considérés afin de caractériser les variations ayant lieu au cours du développement larvaire. Enfin, une méta-analyse considérant les paramètres de tous les élevages larvaires étudiés a été conduite. Sur cette base expérimentale, il a d'abord été conclu que la mise en place du microbiote larvaire de *P. stylirostris* était soumise à l'influence de communautés procaryotiques issues de l'environnement d'élevage et des organes reproducteurs des géniteurs. Il a ensuite été montré que ce microbiote larvaire ainsi que les communautés procaryotiques et les paramètres physico-chimiques associés à l'eau d'élevage évoluaient sous l'influence du stade de développement des larves et de leur état de santé. Enfin, de potentiels biomarqueurs bactériens ont été mis en évidence en comparant les élevages larvaires soumis ou non à de fortes mortalités. L'ensemble des analyses menées au cours de ce projet de thèse sont une première étape vers le développement d'outils de détection précoce des mortalités larvaires dans les écloséries de Nouvelle-Calédonie.

CHAPITRE I

État de l'art

I- Chapitre I – État de l’art

I.1- La crevetticulture, du monde à la Nouvelle-Calédonie

I.1.1- Place de la crevette dans l’aquaculture mondiale

I.1.1.a- Chiffres clés de l’aquaculture

Depuis les années 1990, la production mondiale d’animaux aquatiques (poissons, crustacés, mollusques, etc.) a augmenté de plus de 60%, passant de 110 à 178 millions de tonnes. Alors que la contribution de la pêche est restée stable sur cette période (environ 91 millions de tonnes par an), cette augmentation est principalement due à une croissance de l’aquaculture qu’elle soit continentale, marine ou côtière. En effet, en 2020, les différentes activités aquacoles ont permis la production de 87,5 millions de tonnes d’animaux aquatiques contre 21,8 millions de tonnes, en moyenne, dans les années 1990 (Fig. 1). Ce chiffre record représente la moitié des animaux aquatiques produits à l’échelle mondiale ainsi qu’une valeur économique de plus de 264 milliards d’USD (FAO 2022). À l’heure actuelle, nous consommons chaque année environ 20,5kg de produits alimentaires d’origine aquatique par personne, soit 2 fois plus qu’il y a 50 ans. En Asie et en Afrique, cette consommation d’animaux aquatiques représente jusqu’à 50% des protéines animales consommées. Au-delà de cet aspect alimentaire, l’aquaculture génère également 20,5 millions d’emplois dont 28% des postes sont occupés par des femmes. Au regard de l’ensemble de ces chiffres, il semble donc évident que le développement et le maintien d’une aquaculture durable représentent des enjeux socio-économiques mondiaux majeurs (FAO 2022).

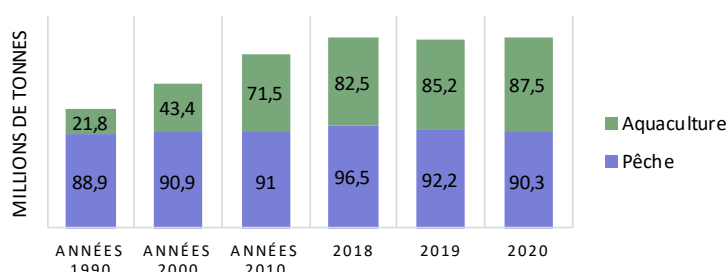


FIGURE 1 – Contributions de la pêche et de l’aquaculture à la production mondiale d’animaux aquatiques (Source : FAO 2022).

Contributions (en millions de tonnes) exprimées en moyenne des années pour 1990, 2000 et 2010 et par année pour 2019 et 2020.

I.1.1.b- Crevetticulture

En 2020, bien que la production aquacole mondiale ait été dominée par la production de poissons et de mollusques, l’espèce la plus produite, toutes espèces confondues, était la crevette à pattes blanches *Penaeus vannamei* avec 5,8 millions de tonnes générées (Fig. 2). Au total, 16% des produits aquacoles exportés à travers le monde sont des crevettes et ce marché représente une valeur économique de plus de 24 milliards d’USD. La production aquacole de crevettes, aussi appelée crevetticulture, domine ainsi la production de crustacés dans le monde. Cette activité est soutenue par des pays d’Amérique latine mais plus largement par des pays asiatiques tels que la Chine, la Thaïlande, l’Inde et l’Indonésie qui représentent d’ailleurs 91,7% de la production aquacole mondiale (FAO 2022).

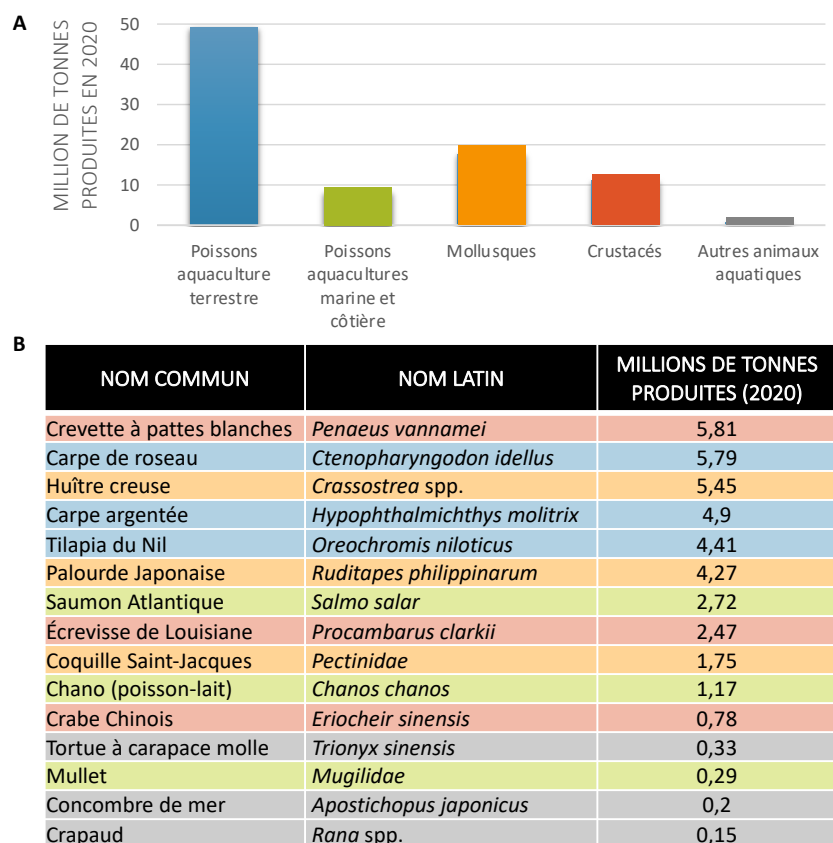


FIGURE 2 – Animaux aquatiques majoritairement produits par l’aquaculture en 2020. A) Animaux aquatiques produits par l’aquaculture en 2020. B) Top 3 des espèces animales les plus produites par l’aquaculture en 2020 par catégorie (Source : FAO 2022).

Les espèces de poissons issues de l’aquaculture terrestre et marine sont respectivement représentées en bleu et en vert, les mollusques en orange, les crustacés en rouge et les autres animaux aquatiques en gris.

I.1.2- Crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

I.1.2.a- Historique

En Nouvelle-Calédonie, la crevetticulture a été initiée en 1970 sous l’instigation des membres de la Commission du Pacifique Sud (CPS) et de l’Organisation Mondiale pour l’Alimentation et l’Agriculture (FAO). Les premières expérimentations ont été réalisées en 1972 en baie de Saint-Vincent (Boulouparis). Les installations ont ensuite été confiées, en 1973, à l’Association pour le développement de l’Aquaculture en Nouvelle-Calédonie (AQUACAL) puis au Centre National pour l’Exploitation des Océans (CNEXO) en 1978. Ce dernier devient l’Institut Français de Recherche pour l’Exploitation de la Mer (Ifremer) en 1984 (Goarant et al. 2003; Della Patrona & Brun 2009). Les premières expérimentations menées ont concerné des espèces de crevettes pénelides locales dont *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus merguensis* et *Metapenaeus ensis*. Puis, au fil des années, une douzaine d’espèces de crevettes ont été testées. Les élevages de *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. vannamei*, et *F. indicus* ont été les plus satisfaisants. Néanmoins, la crevette bleue du Pacifique (Fig. 3), *P. stylirostris*, a finalement été sélectionnée en raison de ses qualités zootechniques et économiques. En effet, cette espèce était la seule à maintenir une croissance acceptable au cours de la saison fraîche. De plus, sa couleur bleutée, sa rareté (Fig. 4) ainsi que ses qualités gustatives permettaient d’envisager une exportation lucrative. Au

début des années 80, après une décennie d’expérimentations, les premiers résultats de la recherche sont transférés au secteur privé. La première ferme de crevettes, la Société d’aquaculture calédonienne (SODACAL) est alors créée. La première écloserie naît ensuite en 1988 et est intégrée à la ferme SODACAL (Goarant et al. 2003; Della Patrona & Brun 2009). En 1990, 3 fermes sont comptabilisées sur le territoire et ce chiffre passe ensuite à 10 en 1998 puis 19 en 2010 (Pham 2011). À l’heure actuelle, l’activité crevetteicole calédonienne est portée par 17 fermes (18 au moment du début de cette thèse) et 3 écloséries (4 au moment du début de cette thèse) représentant une surface totale d’environ 650 hectares (Agence Rurale de la Nouvelle-Calédonie, <https://www.agence-rurale.nc>). Toutes les infrastructures crevettecoles sont implantées sur la côte Ouest de la Grande Terre (Fig. 5) sur des tannes de mangrove (zones sursalées en arrière de mangrove).



FIGURE 3 – Crevette bleue du Pacifique (*Penaeus stylirostris*) adulte (Source : Ifremer).

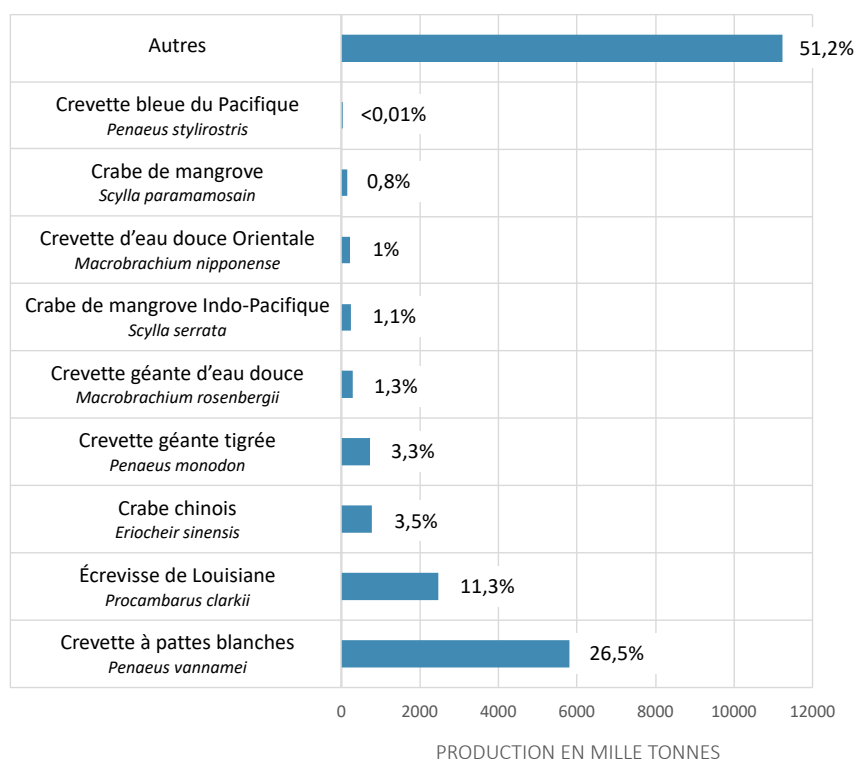


FIGURE 4 - Part de la production de la crevette bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris*, dans la production mondiale aquacole de crustacés.

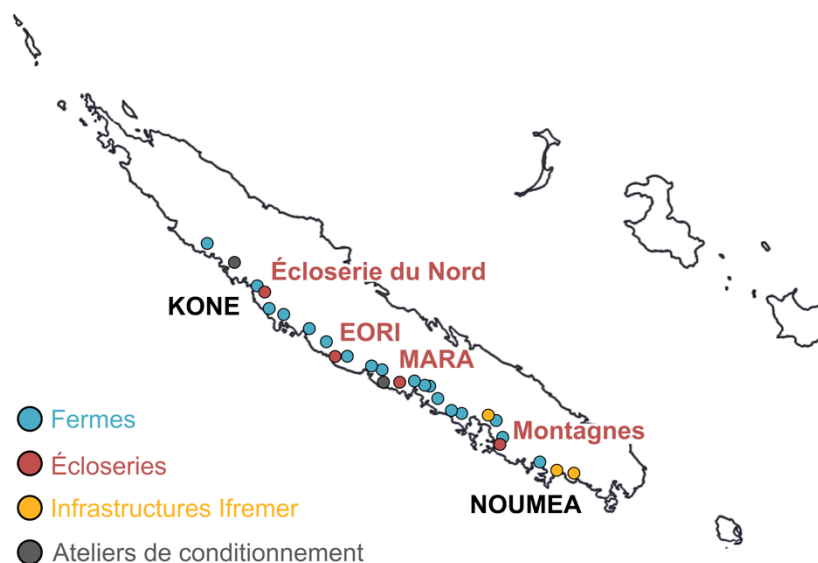


FIGURE 5 – Carte des infrastructures crevetticoles sur la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie.

Les écloseries du Nord (EDN), d’EORI, de MARA et de Montagnes sont représentées en rouge sur la carte.

1.1.2.b- Enjeux socio-économiques

Depuis son lancement en Nouvelle-Calédonie, la crevetteculture permet de valoriser des terres non exploitables par l’agriculture et les habitations humaines mais aussi de créer des emplois en Province Nord et en Province Sud. En 2018, la filière crevette calédonienne employait 244 personnes dans les fermes et les écloseries ainsi que 306 salariés dans les ateliers de conditionnement soit un total de plus de 500 emplois ([Agence Rurale de la Nouvelle-Calédonie](#)). Au-delà de cet aspect social, la crevetteculture revêt également un aspect économique important. En effet, en 2020, 1470 tonnes de crevettes ont été produites en Nouvelle-Calédonie, représentant un chiffre d’affaires de 1875 millions de CFP (plus de 15 millions d’euros). Plus de la moitié de cette production est destinée à l’exportation et fait ainsi de la crevetteculture le premier exportateur agroalimentaire du territoire et le deuxième exportateur tous produits confondus après le nickel ([Agence Rurale de la Nouvelle-Calédonie](#)). L’aquaculture de crevettes en Nouvelle-Calédonie s’inscrit donc dans une filière mondiale et représente des enjeux socio-économiques majeurs à l’échelle locale. Pourtant, malgré ces chiffres et ce potentiel, la crevetteculture calédonienne est en net recul depuis plusieurs années. En effet, après une progression rapide au cours des 20 premières années, la production de crevettes a atteint 2000 tonnes au début des années 2000. Elle a ensuite diminué de 40% entre 2005 et 2019 avec une production moyenne de 1500 tonnes alors que les projections à 10 ans étaient de 5000 tonnes annuelles ([Fig. 6](#)). Trois phénomènes majeurs ont durablement impacté la crevetteculture calédonienne :

- l’apparition d’une première vibriose, due à *Vibrio penaeicida*, en 1993 entraînant des mortalités en saison fraîche ([Mermoud et al. 1998](#)) ;
- l’apparition d’une seconde vibriose en 1997, due à *V. nigripulchritudo*, affectant les élevages réalisés en saison chaude mais dans une zone géographique limitée ([Goarant et al. 2006; 1999](#)) ;
- une pénurie de post-larves due à des mortalités larvaires importantes et non expliquées dans les écloseries ([Pham et al. 2014](#)) ([Fig. 7](#)).

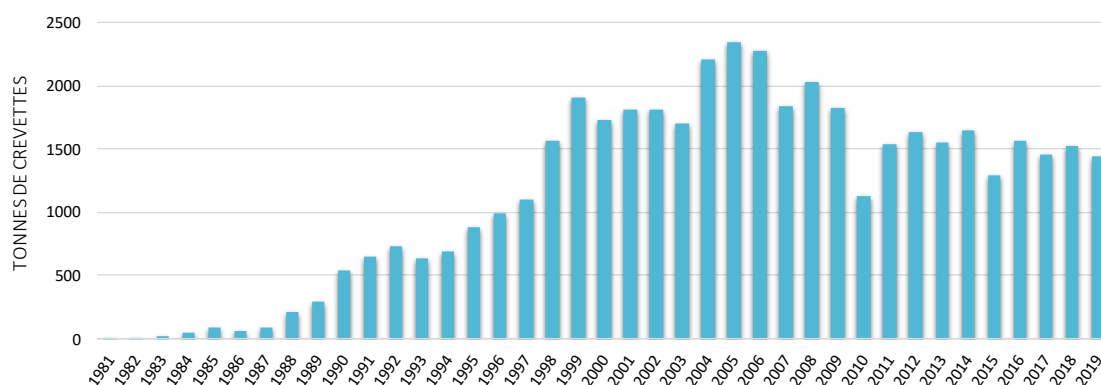


FIGURE 6 – Production aquacole de crevettes bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris*, en Nouvelle-Calédonie (Source : ISEE, <https://www.isee.nc/>).

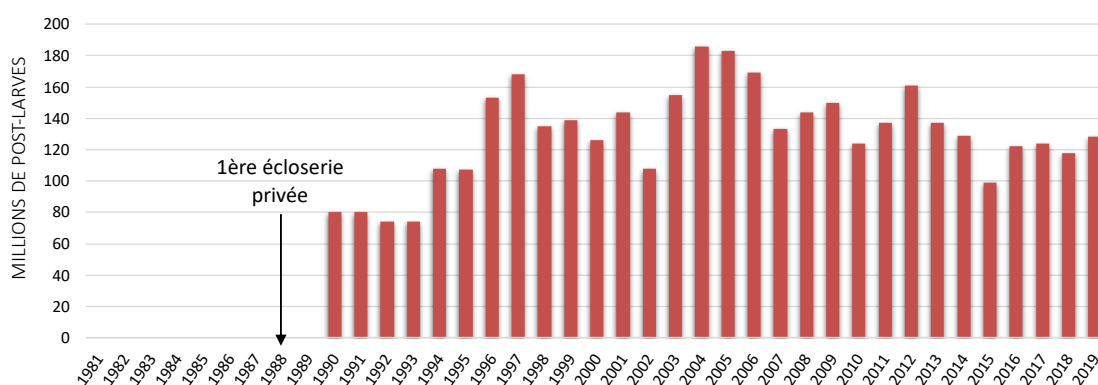


FIGURE 7 – Production aquacole de post-larves de *Penaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie (Source : ISEE, <https://www.isee.nc/>).

1.1.2.c- Difficultés de production

SYNDROME 93 – Au cours de la saison fraîche (mai-août, 15-23°C) de 1993, la Nouvelle-Calédonie est, pour la première fois, confrontée à des mortalités importantes et anormales affectant les juvéniles et les adultes (Mermoud et al. 1998). Ce phénomène est appelé « Syndrome 93 » ou « Syndrome d’hiver ». Les crevettes impactées par ce syndrome présentent des symptômes similaires à ceux provoqués par des virus de crevettes connus tels que le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (Infectious Hematopoietic and Hypodermal Necrosis Virus, IHNV) (Lightner et al. 1983) et le syndrome Taura (Bonami et al. 1997). Ces signes cliniques sont caractérisés par une faiblesse des animaux et un comportement anormal de ces derniers, une sensibilité accrue au stress, une carapace molle et sombre, des tissus musculaires opaques ainsi qu’une coagulation lente de l’hémolymphe colonisée par un grand nombre de bactéries mobiles (Mermoud et al. 1998). Des analyses en biologie moléculaire ont permis d’identifier la bactérie *Vibrio penaeicida* comme étant responsable de ce phénomène (Goarant et al. 1999; Saulnier et al. 2000). Le Syndrome 93 est ainsi reconnu comme étant une vibriose septicémique s’exprimant de façon saisonnière. Bien que *V. penaeicida* puisse être détecté à toutes les étapes de l’élevage, les crevettes deviennent sensibles à cet agent pathogène à partir du stade juvénile au moment de

l’acquisition de la formule rostrale définitive (nombre définitif d’épines rostrales dorsales et ventrales) (Goarant et al. 1998). Cette sensibilité semble être accrue lorsque la température de l’eau d’élevage chute sous les 25°C en saison fraîche (Mermoud et al. 1998). Ces différentes constatations ont conduit à réorganiser la production et à arrêter les élevages de crevettes en saison fraîche à partir de 1997.

SYNDROME D’ÉTÉ – En 1995, 2 fermes du territoire sont affectées par une nouvelle épidémie. Malgré les recommandations sanitaires, en décembre 1997, ce phénomène, identifié comme « Syndrome d’été », s’étend à d’autres infrastructures localisées à 50km au Sud du foyer d’origine (Goarant et al. 1999; 2006). Bien que ce syndrome ait été géographiquement restreint à quelques fermes du territoire, il affecte actuellement plus largement les bassins de production de la Nouvelle-Calédonie. Cette épidémie est associée à une vibriose septicémique causée par une autre bactérie du genre *Vibrio*, *V. nigripulchritudo*, et causant des symptômes cliniques similaires à ceux énoncés précédemment. La maladie se caractérise par des flambées épizootiques brèves et chroniques se reproduisant d’une année sur l’autre en période chaude lorsque la température est supérieure à 25°C. Comme pour *V. penaeicida*, la maladie se développe exclusivement chez les stades juvéniles et adultes sans affecter les stades larvaires et post-larvaires. De plus, la pathogénicité bactérienne de ce *Vibrio* est liée à la présence de 2 plasmides et semble également être associée à la qualité des fonds de bassin et à une eutrophisation précoce du milieu d’élevage pouvant impacter la qualité de la colonne d’eau (Goarant et al. 2006; Lemonnier et al. 2006; Beliaeff et al. 2009; Le Roux et al. 2011).

PÉNURIES DE POST-LARVES – Depuis 2005, le nombre de post-larves produites par les écloséries a diminué d’environ 25%. Cette pénurie s’explique principalement par des mortalités larvaires importantes survenant au cours des 10 premiers jours d’élevage (Fig. 8) et dont les causes n’ont pas clairement été identifiées à l’heure actuelle (Pham et al. 2014). L’implication des agents pathogènes, *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo*, évoqués précédemment, a été écartée. En effet, bien que la bactérie *V. nigripulchritudo* ait été détectée dans les élevages larvaires, elle n’est pas pathogène pour les stades larvaires et sa présence n’est pas corrélée avec les mortalités observées (Goarant et al. 1998; Pham 2011). La bactérie *V. penaeicida* n’a quant à elle pas été identifiée dans les élevages larvaires et des infections expérimentales de larves avec ce *Vibrio* n’ont pas entraîné de mortalités (Goarant et al. 1998). Il existe également d’autres vibrioses connues dans la crevetteculture mondiale comme, par exemple, l’infection à *V. harveyi* touchant les larves de *P. vannamei* (Karunasagar et al. 1994). Néanmoins, à ce jour, aucune souche de bactérie *Vibrio* (ou d’autres genres) n’a pu être mise en évidence comme responsable des mortalités larvaires en éclosérie en Nouvelle-Calédonie. D’autres hypothèses, telle qu’une baisse de fécondité des géniteurs, due à une température de l’eau trop élevée en bassin ou à des facteurs de stress, ont également été écartées (Pham 2011). De même, l’occurrence variable des mortalités au sein d’élevages conduits dans une même eau avec des larves provenant de géniteurs communs ont contribué à rejeter les hypothèses relatives à une baisse de la qualité physico-chimique de l’eau d’élevage. Enfin, suite à l’introduction de souches hawaïennes de *P. stylirostris* dans le cadre d’un programme de génétique sur le territoire, le virus IHNV a été mis en évidence dans certains élevages calédoniens de crevettes adultes et a été suggéré d’impacter les performances zootechniques en éclosérie (Pham 2011). Néanmoins, cette contamination a pu être écartée et les mortalités larvaires ont persisté. De manière général, à l’heure actuelle, il n’existe aucune preuve d’infection virale dans les écloséries qui puissent expliquer les mortalités larvaires constatées en Nouvelle-Calédonie.

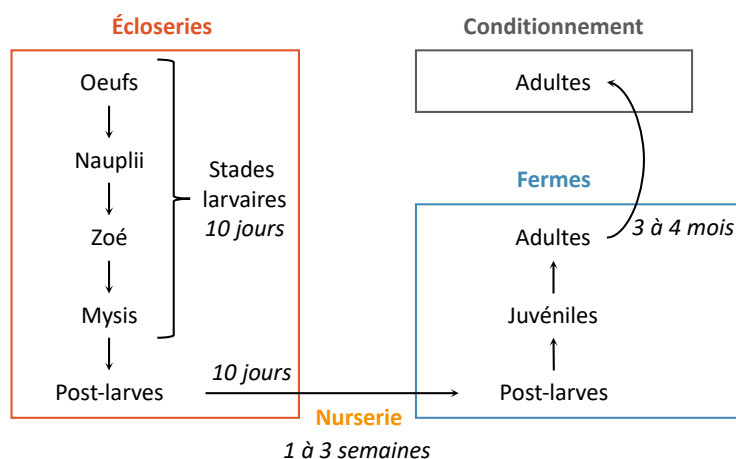


FIGURE 8 – Déroulement d’un élevage de crevettes, *Penaeus stylirostris*, en Nouvelle-Calédonie.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s’inscrit dans ce contexte de mortalités larvaires non expliquées en éclosion. Ce projet s’intègre dans le programme de recherche RESSAC (Ressources et Écosystèmes Aquacoles en Nouvelle-Calédonie), et plus précisément dans l’action IEMH (Interactions Environnement – Microbiote – Hôte), menés au sein de l’Unité de recherche LEAD-NC (Lagons, Écosystèmes et Aquaculture Durable en Nouvelle-Calédonie) à l’Ifremer.

1.2- *Penaeus stylirostris* : présentation du modèle d’étude

1.2.1- Présentation et morphologie de l’espèce

1.2.1.a- Origine et classification

La crevette bleue du Pacifique élevée en Nouvelle-Calédonie est une espèce de crevette pénéide originaire d’Amérique centrale et du Sud, vivant à faible profondeur (0 à 25m). Son aire de répartition se situe dans l’Océan Pacifique Est et s’étend des zones côtières du Mexique au Nord du Pérou. Sa classification phylogénétique est la suivante :

- Phylum : *Arthropoda*,
- Sous-phylum : *Crustacea*
- Classe : *Malacostraca*
- Sous-classe : *Eumalacostraca*
- Super-ordre : *Eucarida*
- Order : *Decapoda*
- Sous-ordre : *Dendrobranchiata*
- Super-famille : *Penaeoidea*
- Famille : *Penaeidae*
- Genre : *Penaeus* (Ma et al. 2011; Yang et al. 2023)
- Espèce : *Penaeus stylirostris* (Stimpson, 1871).



La première taxonomie des crevettes pénéides comportait 6 genres distincts (*Litopenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Fenneropenaeus*, *Marsupenaeus*, *Melicertus* et *Penaeus*). La crevette bleue du Pacifique a ainsi d’abord été nommée *Litopenaeus stylirostris*, nom scientifique employé dans les articles 1 à 3 présentés dans les chapitres IV et V. Cependant, ces nomenclatures ont été longuement débattues et ne sont plus à jour au moment de l’écriture de ce manuscrit (2023). En effet, les crevettes pénéides sont désormais regroupées au sein du genre unique *Penaeus* (Ma et al. 2011; Yang et al. 2023).

1.2.1.b- Morphologie

Comme tous les Arthropodes, le corps de *P. stylirostris* est métamérisé et ses métamères sont regroupés en 3 parties : la tête, le thorax et l’abdomen. Chez les crustacés décapodes, comme la crevette bleue du Pacifique, le thorax est incorporé dans la tête et forme ainsi le céphalothorax. Chez les crevettes pénéides, ce dernier comprend 5 paires de pattes marcheuses appelées péréiopodes. Le rostre, présentant des épines dorsales et ventrales, se situe également sur ce segment du corps tout comme les antennes et les yeux. L’abdomen, terminé par un segment nommé telson, se compose de 5 métamères présentant chacun une paire de pattes natatoires appelées pléopodes (Dakin 1938; Dall 1990; Felder et al. 2009) (Fig. 9).

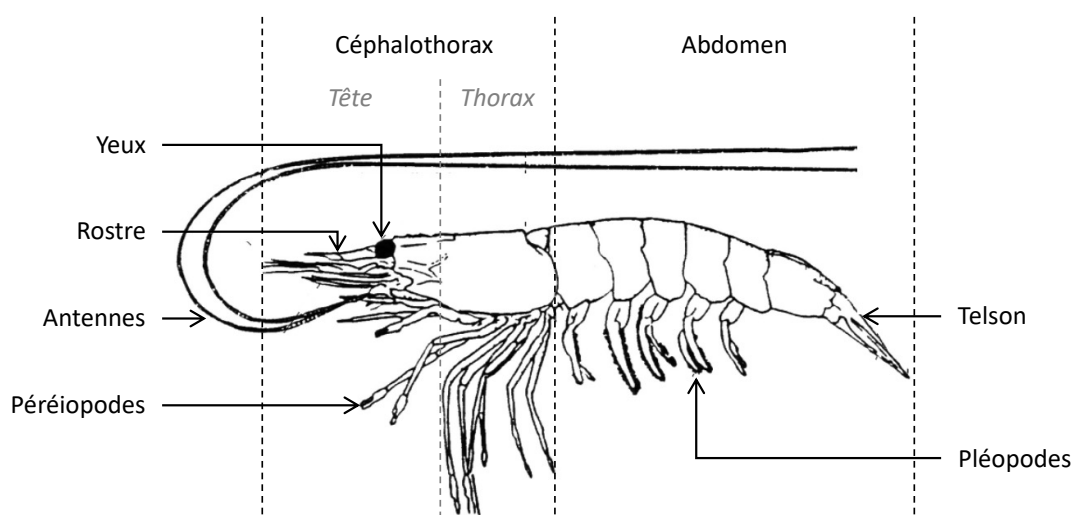


FIGURE 9 – Morphologie des crevettes pénéides.

Il existe un dimorphisme sexuel chez les crevettes pénéides. Les femelles possèdent des ovaires en position dorsale dans leur céphalothorax. Ils sont constitués de 8 lobes symétriquement disposés de part et d'autre de l'axe médian. Deux oviductes relient les lobes latéraux aux pores génitaux situés au niveau de l'abdomen où l'on trouve également un organe sexuel externe, appelé thélycum (Fig. 10A). Les mâles présentent quant à eux une paire de testicules au niveau de leur céphalothorax ainsi qu'un organe sexuel externe en position abdominal nommé pétasma (Fig. 10B). Des spermiductes permettent d'acheminer les spermatozoïdes vers les spermatophores (Fig. 10B), positionnés latéralement au niveau des pores génitaux (Fig. 10B) situés à la jonction entre le céphalothorax et l'abdomen.

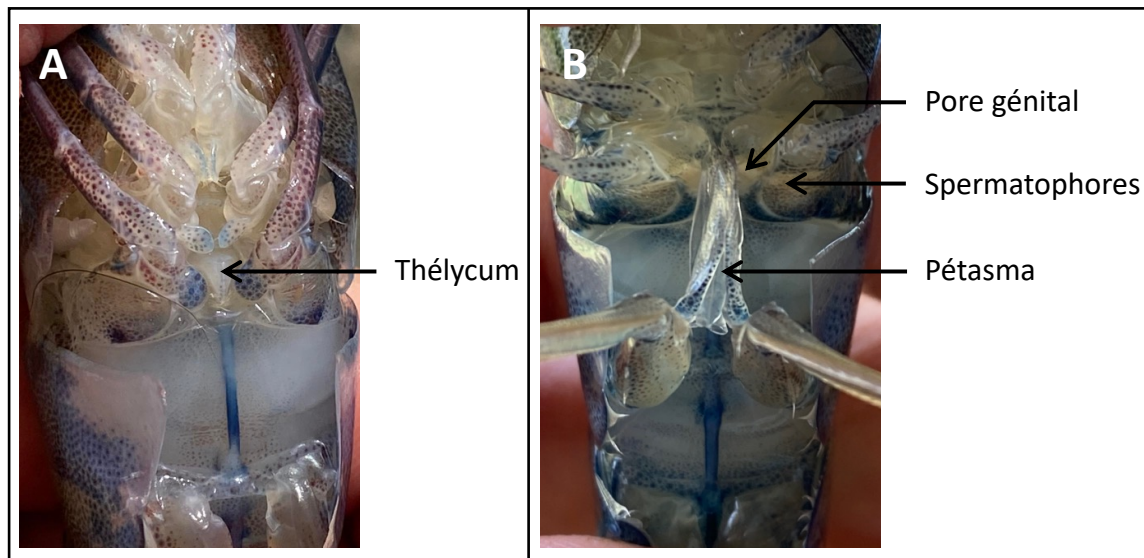


FIGURE 10 – Dimorphisme sexuel de la crevette bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris*. Morphologie de crevettes A) femelle et B) mâle (Source : N. Callac).

I.2.2- Reproduction et cycle de vie des crevettes péneïdes en milieu naturel

En milieu naturel, au moment de la reproduction qui a lieu en haute mer en saison chaude, le mâle dépose ses spermatophores, *via* son pétasma, au niveau du thélycum de la femelle. Quelques heures après la copulation, la femelle libère des ovules qui sont fécondés au contact de ces spermatophores. On parle de fécondation externe. La femelle nage lentement en effectuant des mouvements rapides avec ses pléopodes afin de disperser les œufs fécondés dans l’eau. Les œufs sédimentent sur les fonds marins. À l’intérieur des œufs ainsi libérés, le développement embryonnaire dure de 10 à 12h. L’éclosion des œufs libère les premiers stades larvaires appelés nauplii (larve nauplius). Le stade nauplius est ensuite suivi des stades zoé et mysis. Tous les stades larvaires présentent un mode de vie pélagique en mer (Fig. 11). À la suite du développement larvaire (environ 10 jours), des post-larves présentant la majorité des caractéristiques physiques des adultes sont obtenues. Au bout de 10 à 20 jours de croissance, ces post-larves se concentrent au niveau des estuaires et deviennent benthiques. Après 2 mois, les crevettes juvéniles acquièrent leur morphologie définitive et continuent leur croissance au niveau des estuaires et des lagunes où la nourriture est abondante. Au stade adulte, les crevettes rejoignent les eaux côtières où elles alternent des phases nocturnes d’activité (chasse, reproduction, mues) et des phases diurnes de repos jusqu’à la prochaine saison chaude (Dakin 1938; Dall 1990; Felder et al. 2009) (Fig. 11).

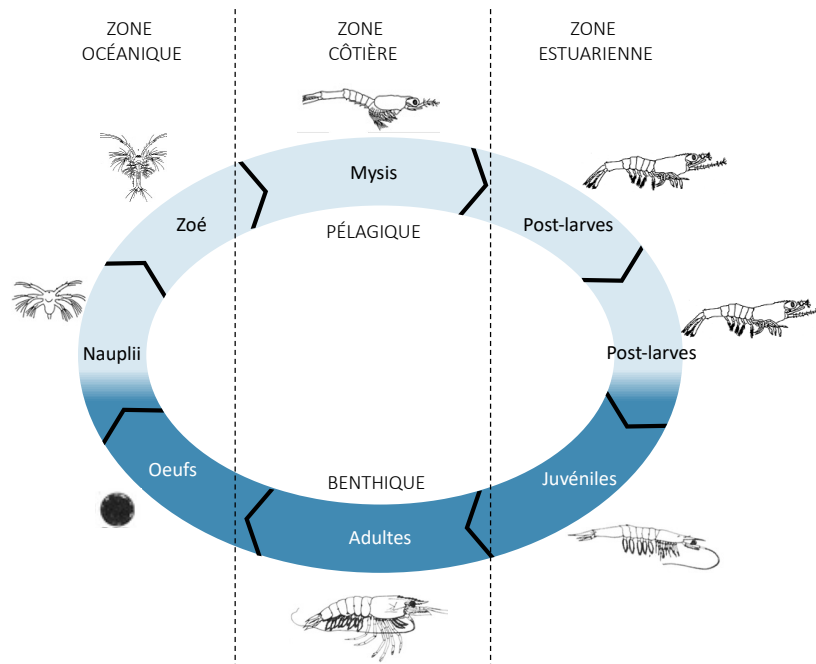


FIGURE 11 – Cycle de développement des crevettes pénaéides en milieu naturel.

1.2.3- Reproduction et cycle de vie de *Penaeus stylirostris* en conditions maîtrisées

1.2.3.a- Élevage des géniteurs en bassins

La crevetteculture calédonienne repose sur la maîtrise du cycle de développement de *P. stylirostris* présenté précédemment. Afin d’obtenir des géniteurs en condition d’élevage, des post-larves âgées de 30 à 40 jours sontensemencées dans des bassins de terre à raison d’un individu par m² (phase prégéniteur). Ces bassins de terre, d’une superficie moyenne de 2000 à 3000m², doivent avoir été mis en assec et labourés au minimum 3 semaines avant le début de l’élevage afin de permettre l’oxydation et la minéralisation des sédiments (Fig. 12A) (Della Patrona & Brun 2009). Dans ces bassins ensuite mis en eau (Fig. 12B) (salinité à 34‰ ± 1‰, pH = 8,3-8,4), les post-larves ensemencées sont nourries *ad libitum* avec de l’aliment commercial sous forme de granulés. Environ 5 à 20% de l’eau de mer du bassin d’élevage sont renouvelés quotidiennement. Au bout de 3 à 4 mois de développement, les crevettes pèsent entre 25 et 30g. À ce stade, elles sont triées selon leur sexe puis réensemencées en bassin à raison de 0,5 individu par m² et de 2 mâles pour 1 femelle (phase géniteur). Chaque semaine pendant 3 à 4 mois, un jour de jeûne est suivi d’un jour de ration de nourriture fraîche puis de 5 jours de ration sous forme de granulés. Les bassins sont vidangés lorsque les animaux adultes atteignent environ 50g pour les mâles et 60g pour les femelles (Wabete 2005). Lorsque la phase géniteur se déroule en saison chaude (de janvier à mars), les températures supérieures à 30°C peuvent altérer la qualité des spermatozoïdes et provoquer la maturation précoce des femelles en bassin. Une phase en bac de prématuration (Fig. 12C) peut alors s’avérer nécessaire afin de maintenir une qualité optimale des animaux. Pour cela, les géniteurs sont stockés dans des bacs circulaires de 10m³ avec de l’eau maintenue à une température de 26°C. L’eau de mer utilisée pour remplir ces bacs est préalablement décantée et filtrée sur 50µm puis renouvelée quotidiennement de 50 à 100% et aérée par bullage central. Les géniteurs obtenus sont ensuite transférés en bacs d’élevage dans la zone de maturation à l’écloserie (Fig. 12D).

1.2.3.b- Acclimatation et maturation des géniteurs

En zone de maturation (Fig. 12D), les femelles et les mâles sont maintenus séparés et sont transférés dans des bacs circulaires d'élevage à raison de 10 à 15 individus par m². Les bacs des mâles sont maintenus à température ambiante (ou réglée à 26°C) alors que ceux des femelles sont progressivement réchauffés jusqu'à 29° (après épédonculation, voir partie 1.2.3.c) afin de garantir une maturation sexuelle optimale. Pendant cette phase d'élevage, effectuée dans une salle fermée, la photopériode est contrôlée avec une période de jour de 19h à 9h (60W) et une période de nuit de 9h à 19h. Les œufs étant naturellement pondus 3 à 4h après la tombée de la nuit, cette photopériode permet de décaler la ponte des femelles en début d'après-midi suite aux inséminations artificielles réalisées entre 9h et 10h. Les géniteurs sont nourris avec de la nourriture fraîche qui est complémentée avec des granulés commerciaux.

1.2.3.c- Reproduction des géniteurs

Après 4 à 10 jours d'acclimatation en salle de maturation, les femelles sont épédonculées. Ce processus consiste à ligaturer ou cautériser (selon l'écloserie considérée) l'un des pédoncules oculaires de la femelle. Les pédoncules oculaires contiennent des glandes endocrines libérant une hormone capable d'inhiber le développement des ovaires. L'épédonculation permet ainsi de lever cette inhibition, ce qui a pour conséquence de stimuler et d'augmenter la fréquence des maturations ovariennes et d'obtenir 3 à 4 pontes par mois au lieu d'une seule. Les premières femelles sont prêtes à être fécondées 2 à 3 jours après l'épédonculation (coloration brune-orangée de leurs ovaires). Après prélèvement par pression dorso-ventrale des spermatophores mâles, le sperme récolté est déposé au niveau du thélycum des femelles (Fig. 10A). Généralement, les spermatophores de 2 mâles sont utilisés pour inséminer une femelle. Les femelles inséminées sont ensuite placées à l'obscurité dans des pondoirs (Fig. 12E) à raison d'un ou deux individu(s) par pondoir (selon l'écloserie considérée). Lorsque la ponte est terminée (en quelques heures), les femelles sont retirées.

1.2.3.d- Élevage larvaire en écloserie

Le lendemain de la ponte, l'éclosion ayant eu lieu, la totalité du contenu des pondoirs est récupérée. Les œufs non fécondés, les œufs fécondés non éclos, les coquilles et les larves au stade nauplius, sont ainsi recueillis. Les larves nauplii sont triées par phototropisme positif dans un éclosoir (Fig. 12F). En effet, lorsqu'une lumière est placée au-dessus de ce dernier, les larves au stade nauplius nagent en surface alors que le reste du contenu des pondoirs sédimente. Le nombre de nauplii ainsi obtenus par pondoir est déterminé par 3 comptages volumétriques. Les nauplii récupérés sont alors placés dans des bacs d'élevage en écloserie (Fig. 12G) à raison de 180 nauplii par litre d'eau. Le jour d'ensemencement des larves au stade nauplius est considéré comme le jour 0 (J0) de l'élevage larvaire (Fig. 13). Chaque écloserie possède des protocoles de traitement et de renouvellement de l'eau, de séquence alimentaire et de distribution d'antibiotiques qui leur sont propres. Ils seront détaillés dans le matériel et méthode (chap. II, partie II.1) de ce manuscrit. Le développement larvaire dure environ 10 jours pendant lesquels différents stades larvaires sont observés jusqu'à l'obtention de post-larves (Fig. 13). Les post-larves sont ainsi maintenues une dizaine de jours (P10) en élevage en écloserie avant d'être transférées en nurseries (Fig. 12H).

I.2.3.e- Élevage post-larvaire en nurserie

En nurserie, les post-larves sont progressivement acclimatées aux conditions d’élevage en bassins. Elles sont ainsi élevées d’une à 3 semaines dans des bacs extérieurs avant d’être transférées en bassin pour le grossissement.

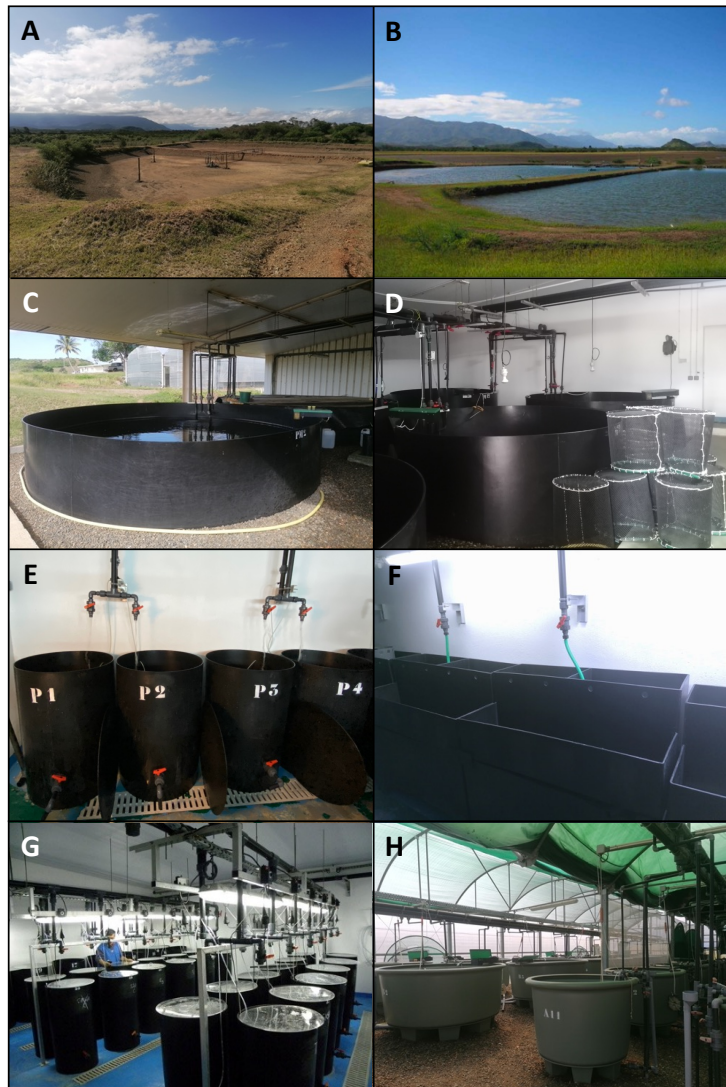


FIGURE 12 – Zones d’élevage de crevettes en conditions contrôlées à la Station Aquacole de Saint Vincent. A) Bassins de terre en assec. B) Bassins de terre en eau. C) Bacs d’élevage en zone de prématuration. D) Bacs d’élevage en salle de maturation. E) Pondoirs. F) Éclosoirs. G) Bacs d’élevage larvaire en écloserie. H) Bacs d’élevage en nurserie (Source : Ifremer).



FIGURE 13 – Succession des stades larvaires de *Penaeus stylirostris*. Z1, Z2 et Z3 représentent les larves au stade zoé ; M1, M2 et M3 celles au stade mysis ; PL signifie post-larve.

I.2.4- Présentation des stades larvaires

I.2.4.a- Le stade larvaire nauplius

Le nauplius est le premier stade larvaire de l'ensemble des espèces de crustacés. Les nauplii sont caractérisés par un œil médian et 3 paires d'appendices natatoires. Ils n'ont pas de bouche et sont vitellotrophes, c'est-à-dire qu'ils se nourrissent des réserves vitellines de l'œuf. Le stade nauplius présente 5 à 6 sous-stades (Fig. 14) durant chacun entre 8 et 10h. La croissance se fait par mues successives, les larves nauplii ont ainsi une taille variant de 200 à 250µm (Kitani, 1986). Comme énoncé précédemment, les larves au stade nauplius présentent un phototropisme marqué qui est exploité au cours de l'élevage larvaire maîtrisé.

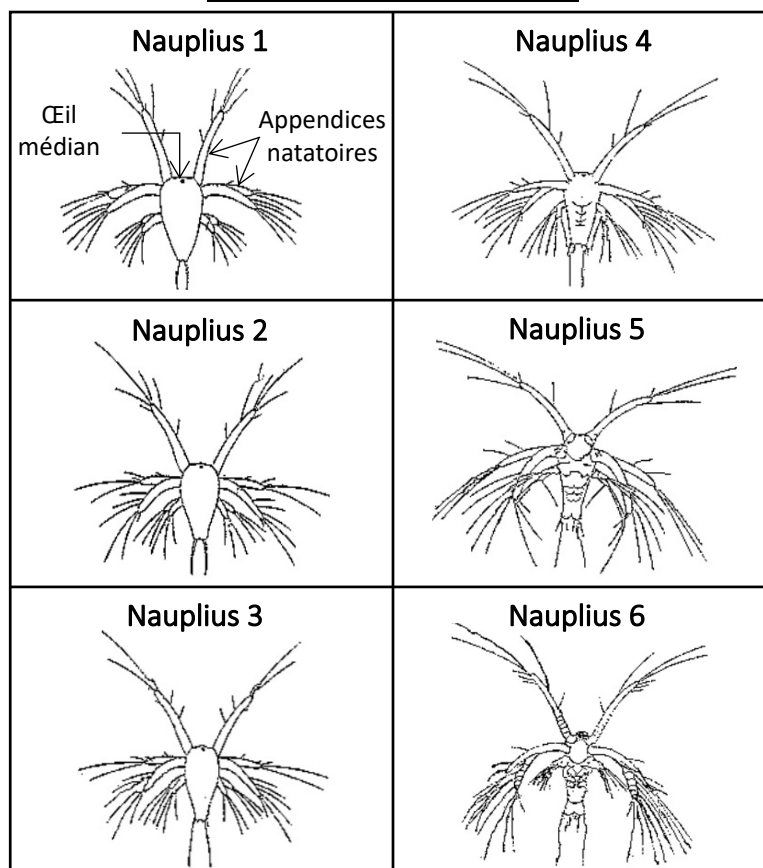


FIGURE 14 – Larves nauplii 1 à 6 (Modifié de Pham 2011).

I.2.4.b- Le stade larvaire zoé

Les larves nauplii se transforment en larves zoé, stade caractérisé par l’ouverture de la bouche et par la mise en place d’un tube digestif fonctionnel permettant l’alimentation. À ce stade, le céphalothorax, l’abdomen ainsi que le telson se distinguent. Les larves zoé présentent 3 sous-stades successifs allant de Z1 à Z3 et durant chacun plus de 24h. Les larves Z1 ne présentent pas de pédoncules oculaires. Ces derniers n’apparaissent qu’au stade Z2, en même temps que le rostre. Le stade Z3 se distingue par la présence d’un uropode biramé (Fig. 15). Tout comme les larves au stade nauplius, la taille augmente par mues successives et varie de 0,9 à 1,8mm (Kitani, 1986). Les larves Z1 et Z2 se nourrissent de microalgues alors que les Z3 présentent un régime alimentaire carnivore. Le protocole de nourrissage précis appliqué à l’élevage larvaire sera présenté dans le matériels et méthodes (chapitre II, partie II.1).

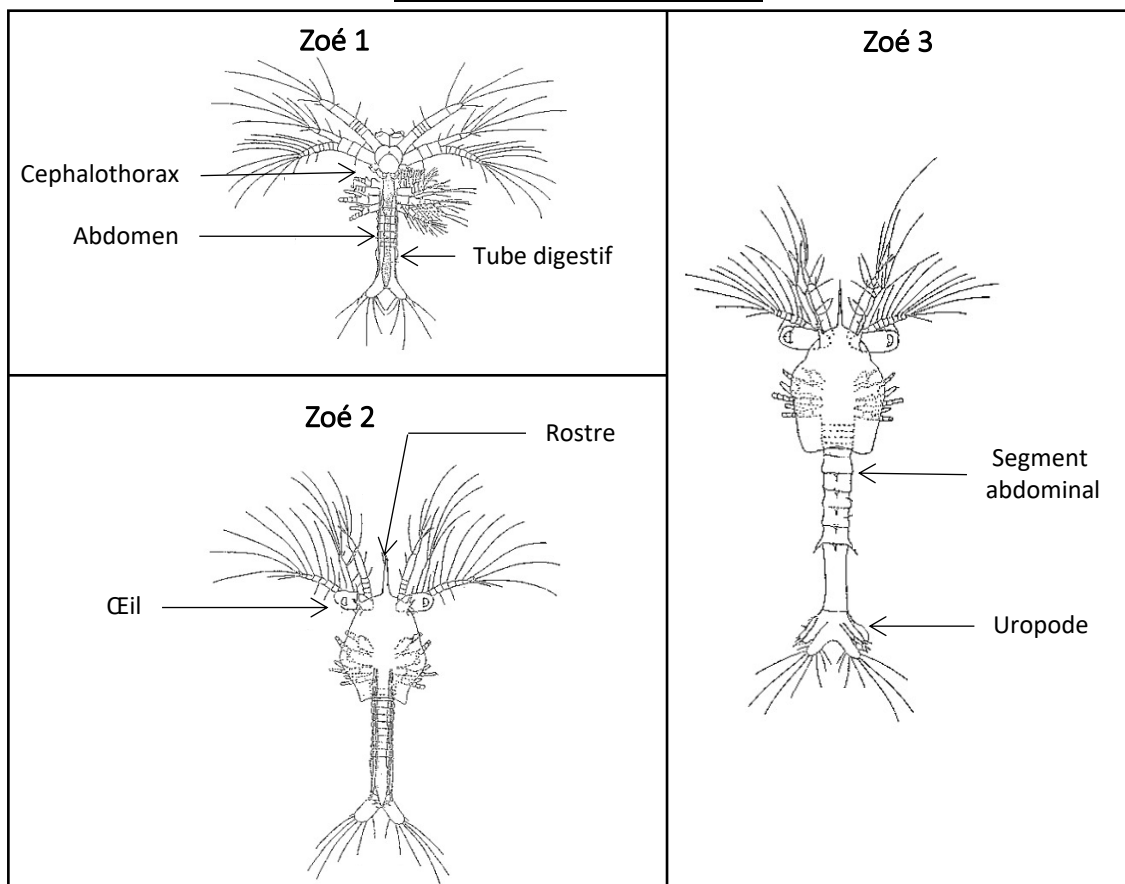


FIGURE 15 – Larves zoé 1 à 3 (Modifié de Pham 2011).

I.2.4.c- Le stade larvaire mysis

Les larves zoé se transforment ensuite en larves mysis, le dernier stade larvaire. Il est caractérisé par des pattes natatoires dépourvues de pinces, un appendice caudal et un rostre développé (Fig. 16). Les mysis présentent ainsi la morphologie d'une petite crevette. Alors que les larves zoé se déplacent de manière saccadée et à la verticale avec la tête en haut, les mysis se déplacent à reculons avec la tête vers le bas. À nouveau, 3 sous-stades (M1 à M3) d'environ 24h se succèdent et se distinguent par la longueur et le niveau de développement des pattes abdominales. La taille augmente par mues successives et varie de 2,6 à 3,5mm (Kitani, 1986).

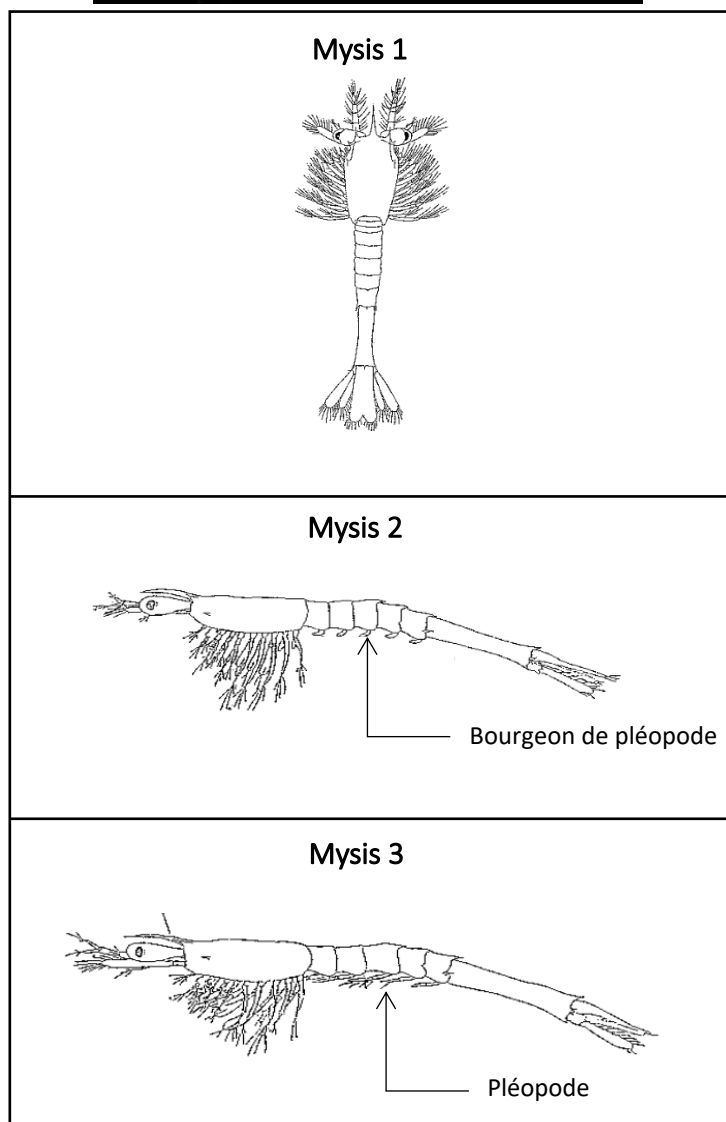


FIGURE 16 – Larves mysis 1 à 3 (Modifié de Pham 2011).

I.2.4.d- Post-larves

Au bout de 10 jours d’élevage larvaire, les larves mysis 3 se métamorphosent en post-larves ayant une apparence physique similaire à celle des adultes (Fig. 17). Elles se distinguent des mysis par la présence d’appendices abdominaux utilisés pour la nage. Les différents stades de post-larves sont identifiés par le nombre et la disposition de leurs épines rostrales. Le stade post-larvaire PLi est ainsi calculé par la relation $i = x - y$ où x et y désignent respectivement le nombre d’épines rostrales en position supérieure et inférieure. L’âge des post-larves est lui déterminé par le nombre de jour écoulé depuis la métamorphose (Pham 2011).

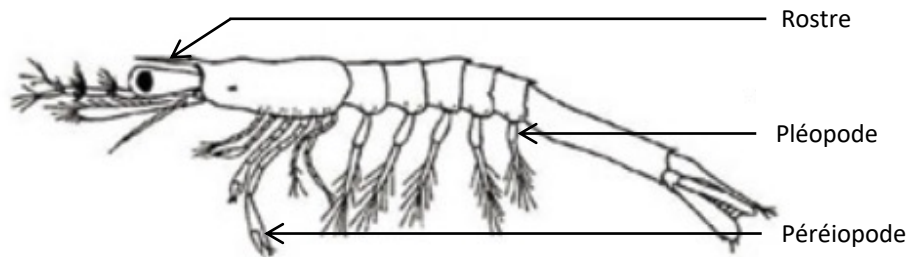


FIGURE 17 – Post-larve (Modifié de Pham 2011).

I.3- Le microbiote ou les microorganismes au service de leur hôte

I.3.1- Historique et définitions

I.3.1.a- Les 3 phases majeures de la microbiologie

Au cours des 4 derniers siècles, la microbiologie s’est développée en 3 phases majeures : l’observation, l’expérimentation et la spécialisation (Fig. 18). La phase d’observation a été initiée en 1668 par Antoine van Leeuwenhoek qui observe pour la première fois, sous microscope, des microorganismes qu’il appelle alors des « animalcules ». À la suite de cette prise de conscience d’un nouveau monde invisible à l’œil nu, il faudra attendre le 19^{ème} siècle et les travaux de Louis Pasteur et Robert Koch pour entrer dans la phase d’expérimentation de la microbiologie. Cette période a mis en évidence le rôle des microorganismes dans certaines maladies ainsi que dans la fermentation alimentaire. Les premières hypothèses selon lesquelles certains microorganismes pourraient être bénéfiques sont émises et les premières méthodes de culture ainsi que la pasteurisation sont mises au point. Au début du 20^{ème} siècle, observés par des microscopes de plus en plus performants, comme les microscopes électroniques, les microorganismes sont classés, par Édouard Chatton (Chatton 1937), en procaryotes (sans noyau cellulaire) et eucaryotes (avec noyau cellulaire) conduisant à des classifications microbiennes toujours plus précises. Un peu plus tard, dans les années 1940, Sergei Winogradsky met en évidence le rôle des microorganismes des sols et des eaux dans la transformation des composés minéraux (Winogradsky 1949). En parallèle, le scientifique hollandais Martinus Beijerinck parvient à isoler des souches bactériennes sulfato-réductrices et décrit ainsi l’implication des procaryotes dans la fixation de l’azote. Ces travaux représentent la spécialisation de la microbiologie dans l’écologie et donnent ainsi naissance à l’écologie microbienne. Au cours de la 2^{de} moitié du 20^{ème} siècle, la microbiologie continue sa spécialisation au sein de différents domaines tels que la physiologie, la biochimie, la génétique, etc. En 1977, Carl Woese et George Fox combinent

pour la première fois la microbiologie et la biologie moléculaire en utilisant le gène codant pour l’ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) comme marqueur moléculaire pour classifier les procaryotes. Leurs travaux conduisent à la définition de 2 règnes parmi ces derniers : les *Eubacteria*, renommées plus tard *Bacteria*, et les *Archaeobacteria*, classiquement nommées les *Archaea* (Woese & Fox 1977). Leur approche moléculaire est ensuite étendue au gène codant pour l’ARNr 18S pour les eucaryotes et devient la référence pour la classification des organismes vivants. En parallèle des travaux de Woese et Fox, au début des années 1980, une méthode permettant de déterminer la séquence nucléotidique d’un gène est mise au point, ce sont les débuts du séquençage. Depuis le début du 21^{ème} siècle, grâce à la spécialisation de la microbiologie dans la biologie moléculaire ainsi que le développement de la bioinformatique et du séquençage haut débit, on assiste à l’essor des méthodes haut débit dites « omics » (Fig. 19). Elles permettent d’étudier le contenu génétique (génomique), les ARNs transcrits (transcriptomique) ainsi que les protéines (protéomique) et les métabolites produits (métabolomique) à l’échelle d’un organisme unique mais aussi d’une communauté (méta-génomique, méta-transcriptomique, etc.). Les progrès récents dans ce domaine permettent même une application des méthodes « omics » à l’échelle d’une seule cellule (Lee et al. 2020).

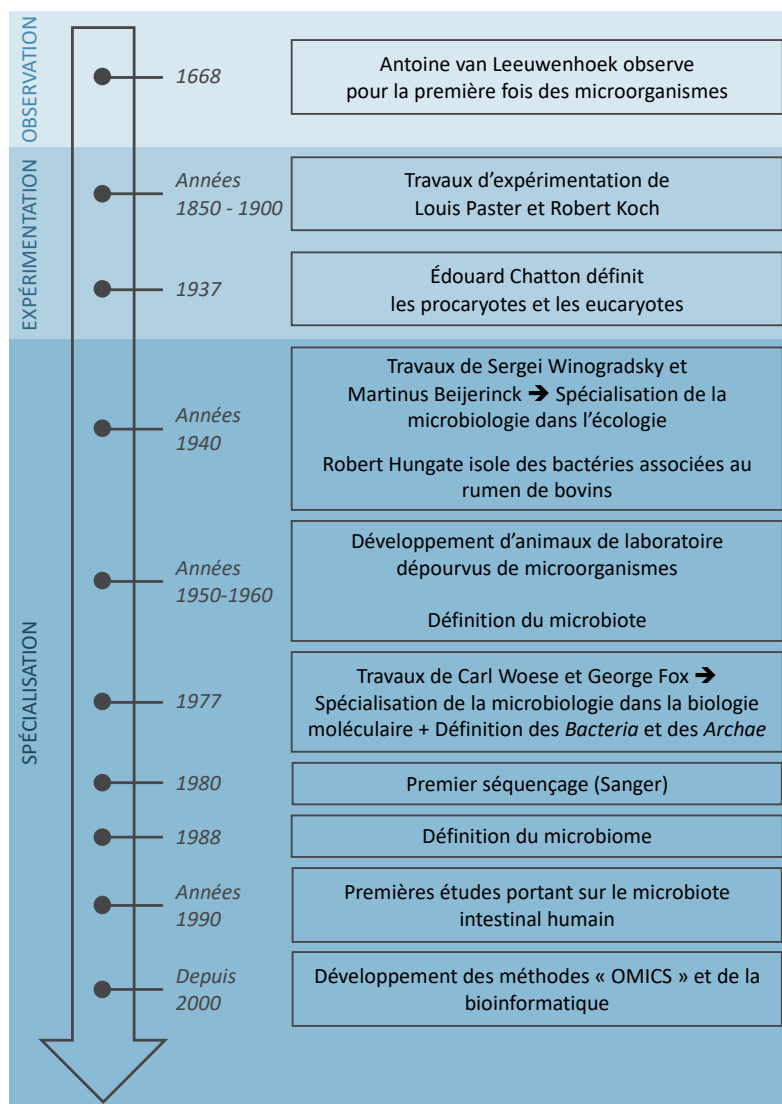


FIGURE 18 – Bref historique de la microbiologie.

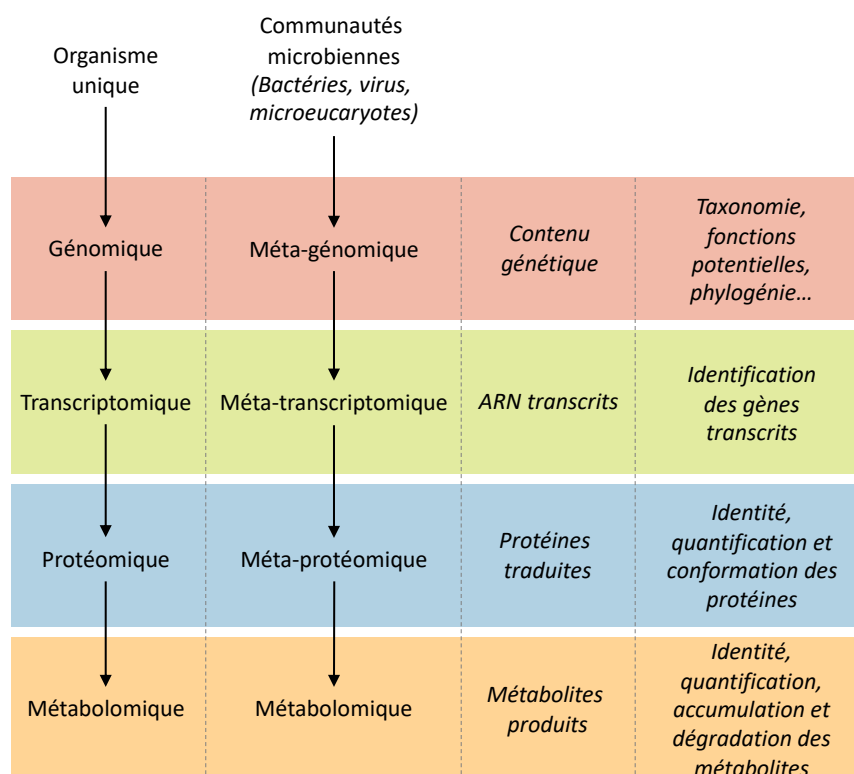


FIGURE 19 – État des lieux des méthodes « omics » (Adapté de Santiago-Rodriguez & Hollister 2021).

1.3.1.b- Caractérisation de l’holobionte

L’ensemble des travaux menés en microbiologie depuis plus de 300 ans ont permis de mettre en évidence la diversité métabolique et physiologique des microorganismes. Ces derniers ont été découverts dans tous les milieux étudiés sur Terre et se sont avérés essentiels à ces environnements. En effet, bien qu’il reste de nombreuses espèces microbiennes à découvrir, les microorganismes représentent une large part de la diversité génétique terrestre (Mora et al. 2011). Ils sont capables de produire des molécules entrant dans la composition de l’atmosphère ainsi que de catalyser des réactions essentielles des cycles biogéochimiques, processus permettant l’homéostasie de la biosphère (Whitman et al. 1998; Falkowski et al. 2008). Au-delà de l’intérêt écologique des microorganismes, leur capacité à coloniser divers autres organismes a également été mise en évidence. En effet, dès les années 1940, le microbiologiste Robert Hungate isole et cultive des bactéries anaérobies strictes associées au rumen de bovins et qui s’avèrent essentielles à la digestion de ces animaux. En parallèle, des lignées d’animaux de laboratoire dépourvus de microorganismes sont développées pour limiter les risques de contaminations pathogènes au cours des expérimentations. Les termes de microbiote et de microbiome apparaissent ainsi au cours de la 2^{de} moitié du 20^{ème} siècle pour désigner l’assemblage des microorganismes (microbiote) et de leurs génomes associés (microbiome) présents dans un environnement donné (Lane-Petter 1962; Whipps et al. 1988; Marchesi & Ravel 2015; Prescott 2017) (Fig. 18). Depuis 2006, le développement des méthodes « omics » couplé aux nouvelles approches de biologie moléculaire et de séquençage permettent une étude approfondie des communautés microbiennes associées à l’ensemble du règne du vivant. Ces recherches ont montré que les

microorganismes sont capables de coloniser n'importe quel tissu composé par des cellules épithéliales et en contact avec l'environnement extérieur (système digestif, voies respiratoires, cavité buccale, tractus reproducteur, peau...). Un seul organisme peut ainsi abriter plusieurs microbiotes ayant chacun des compositions et des fonctions particulières résultant d'une longue co-évolution entre l'hôte et ses communautés microbiennes (Huttenhower et al. 2012).

Une entité vivante composée d'un hôte et de l'ensemble de ses microorganismes associés est définie comme un holobionte (Faure et al. 2018). Ce concept est étroitement lié aux notions de mutualisme, de parasitisme et de commensalisme ; toutes regroupées sous le terme de symbiose qui désigne une interaction entre différents organismes où au moins l'une des parties dépend de cette association (Leung et al. 2021). Dans le cas où la symbiose est bénéfique à l'ensemble des organismes impliqués, on parle de mutualisme. Inversement, le parasitisme désigne une interaction néfaste pour l'un des organismes et bénéfique pour l'autre. Enfin, la notion de commensalisme fait référence à une association bénéfique pour l'une des parties mais sans effet sur l'autre (Martin & Schwab 2012; Leung et al. 2021). La symbiose peut être épibiotique dans le cas où le symbiote vit à la surface de l'hôte ou endobiotique si l'organisme symbiotique vit à l'intérieur des cellules ou des tissus de l'autre organisme. Un holobionte résulte de l'équilibre des multiples interactions entre l'hôte et ses communautés microbiennes provenant de ses parents (transmission verticale) ou de son environnement de vie (transmission horizontale). Cette notion d'état d'équilibre, aussi appelée homéostasie, s'oppose à la dysbiose qui fait état d'un déséquilibre au sein d'une communauté (Petersen & Round 2014). Dans le cas des communautés microbiennes, la dysbiose peut être caractérisée de 3 manières différentes (Fig. 20) :

- par la prédominance d'une espèce pathogène (ou opportuniste)
- par une perte de diversité des communautés microbiennes
- par la perte de communautés microbiennes bénéfiques.

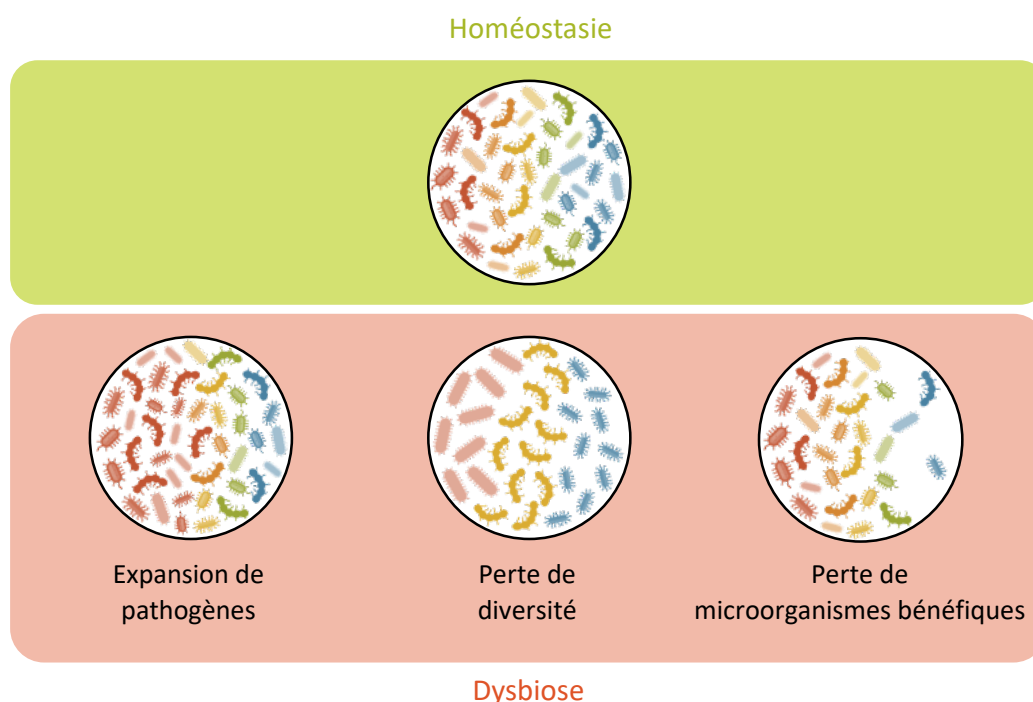


FIGURE 20 – Visualisation du phénomène de dysbiose (Adapté de Petersen & Round 2014).

I.3.2- Le microbiote intestinal humain

Le microbiote le plus connu et le plus étudié à ce jour est le microbiote intestinal humain. Les connaissances accumulées sur ce dernier ont montré le rôle essentiel des communautés microbiennes sur la physiologie et le maintien de la bonne santé de l'hôte et ont conduit à l'étude du microbiote d'autres espèces.

I.3.2.a- Quelques données clés

En moyenne, les recherches portant sur notre microbiote intestinal ont dénombré 10^{13} procaryotes capables de coloniser notre système digestif. Ils représentent au total un poids moyen de 1,5 à 2kg chez adulte. Les bactéries constituent ainsi environ 90% des microorganismes établis de l'estomac au côlon (Cassard & Thomas 2022). Considérant les conditions abiotiques du tube digestif (pH, disponibilités en substrats, anaérobiose), la majorité de ces communautés bactériennes sont complexes à cultiver. Les premières études portant sur le microbiote intestinal, et utilisant des techniques de biologie moléculaire et de séquençage, ont d'ailleurs mis en évidence plus de 80% de procaryotes qui n'avaient jamais été cultivés auparavant (Eckburg et al. 2005). Depuis, une grande partie de ces bactéries a pu être identifiée et ces dernières ont majoritairement été affiliées aux *Firmicutes*, aux *Bacteroidetes* ainsi qu'aux *Actinobacteria* (Turnbaugh et al. 2007). En une vingtaine d'années, le rôle essentiel des procaryotes du microbiote intestinal humain a clairement été mis en évidence avec des implications dans une multitude de processus physiologiques tels que la digestion, la synthèse de vitamines et de nutriments, la mise en place et l'activité du système immunitaire, le développement du système nerveux, le comportement, etc. Nous aborderons ici les 2 exemples les plus documentés : l'implication du microbiote intestinal dans la digestion des polysaccharides et dans l'immunité.

I.3.2.b- Rôle du microbiote intestinal humain dans la digestion et l'immunité

Notre régime alimentaire étant grandement constitué de produits d'origine végétale (céréales, fruits, légumes, etc.), il est très riche en polysaccharides, aussi appelés carbohydrates. Ces derniers sont des assemblages de plusieurs monosaccharides (ou oses) reliés entre eux par des liaisons dites glycosidiques. Lors de la digestion, ces liaisons doivent être clivées par des enzymes appelées CAZymes (carbohydrate active enzymes). Le génome humain ne code que pour une dizaine de CAZymes qui interviennent au niveau de l'intestin grêle et ne ciblent qu'un nombre restreint de polysaccharides. En revanche, les bactéries présentes dans le côlon codent pour plus de 10 000 CAZymes (Cantarel et al. 2012) et permettent ainsi de dégrader les polysaccharides non digérés en monosaccharides qu'elles fermentent ensuite en différents sous-produits. Une part importante de ces sous-produits est représentée par les acides gras à chaîne courte comme le butyrate, l'acétate et le propionate (Fig. 21). Ils constituent jusqu'à 10% de nos apports énergétiques journaliers et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la stimulation de la croissance des cellules du côlon et la modulation des dépenses énergétiques (McNeil 1984; Oliphant & Allen-Vercoe 2019).

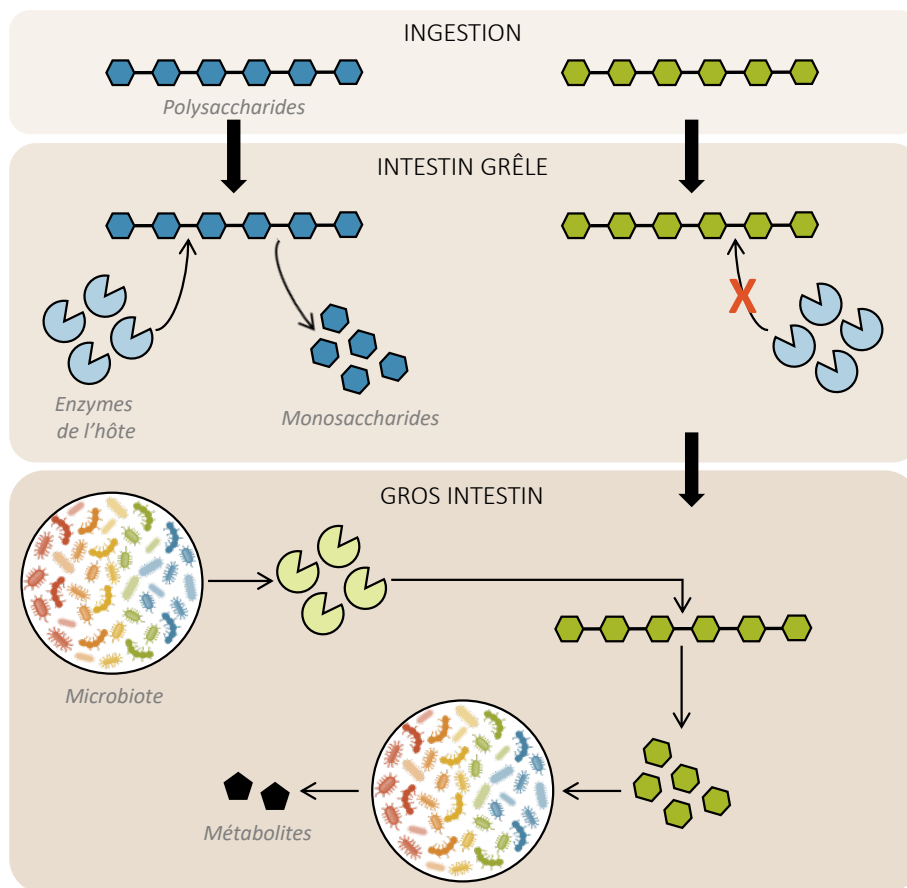


FIGURE 21 – Implication du microbiote intestinal humain dans la digestion.

Au-delà de son importance dans la digestion, le microbiote intestinal est également largement connu pour son implication dans le système immunitaire (Fig. 22). Chez l’Homme, l’immunité au niveau du système digestif est d’abord assurée par les cellules épithéliales intestinales qui produisent des molécules antimicrobiennes et du mucus constituant une barrière à l’entrée des pathogènes. Par la production de divers métabolites comme les acides gras à chaînes courtes évoqués précédemment, les bactéries du microbiote intestinal sont capables d’agir sur ces cellules épithéliales et modulent l’épaisseur et la qualité du mucus ainsi que l’expression de certains peptides antimicrobiens (Kamada et al. 2013). Le microbiote agit également directement sur la différenciation et la stimulation des cellules immunitaires (différenciation des lymphocytes T, stimulation de la sécrétion d’anticorps par les lymphocytes B, stimulation des phagocytes par production de peptidoglycanes, etc.). Au-delà de son action sur le système immunitaire, le microbiote peut également directement agir sur l’introduction de pathogènes par compétition « passive » (utilisation de nutriments essentiels, prolifération rapide au sein d’une niche écologique, etc.) ou « active » (production de métabolites affectant l’expression des gènes de virulence, production de molécules antimicrobiennes, production de toxines, etc.) (Ghoul & Mitri 2016). Par exemple, la bactérie *Bacteroides thetaioamicron* catabolise la mucine, protéine entrant dans la composition du mucus, pour produire du fucose qui inhibe l’expression des facteurs de virulence chez *Escherichia coli*.

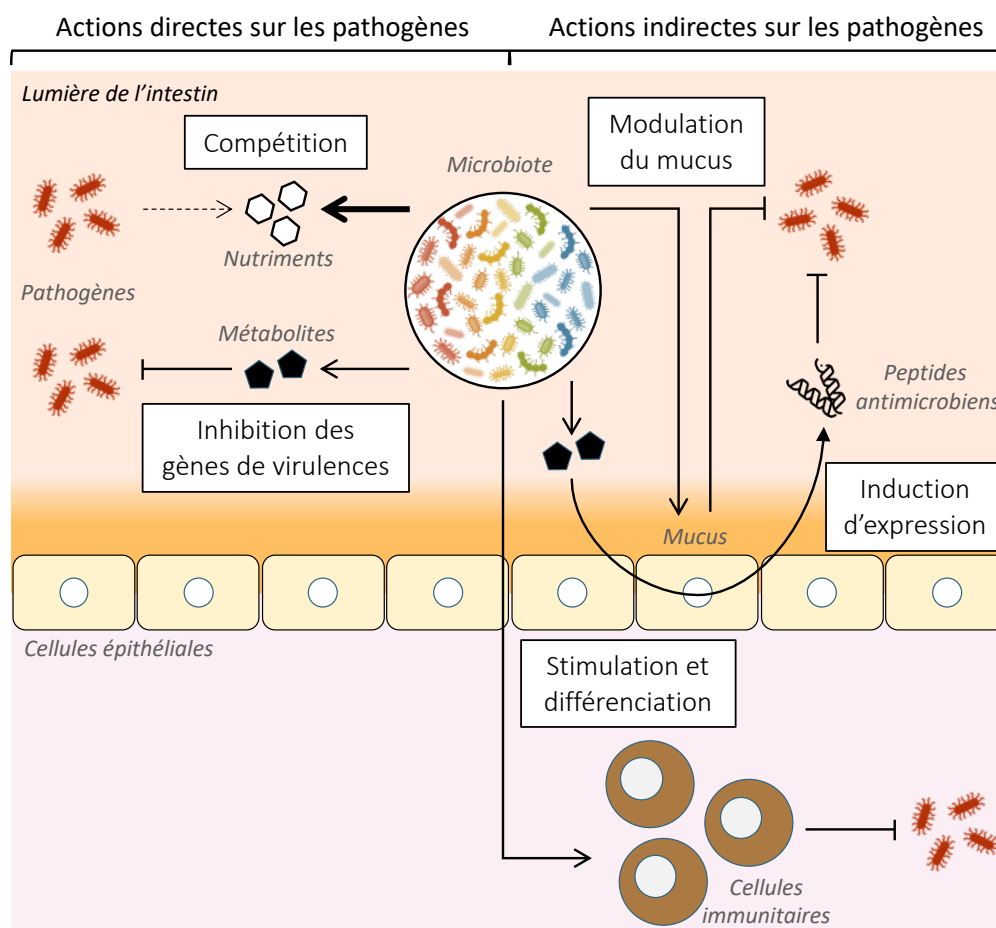


FIGURE 22 – Implication du microbiote intestinal humain dans l’immunité (Schéma simplifié de Kamada et al. 2013).

I.3.3- Microbiote d’espèces aquacoles d’intérêt économique

La prise de conscience de l’importance du microbiote dans la physiologie de l’hôte, ainsi que les perspectives thérapeutiques en santé humaine qui en découlent, ont conduit à une augmentation du nombre d’études portant sur les communautés microbiennes associées aux espèces d’intérêt agro-économique. En effet, de nombreux projets visent désormais à améliorer les rendements et la durabilité des productions agro-alimentaires *via* la maîtrise des microorganismes associés aux espèces élevées ainsi qu’à leur environnement. De par son rôle socio-économique majeur, l’aquaculture est désormais également concernée par ces nouvelles problématiques.

I.3.3.a- Microbiote et poissons

Comme beaucoup d’animaux marins ayant une phase larvaire, l’établissement des communautés microbiennes intestinales chez les poissons a lieu au cours du développement larvaire, au moment de l’ouverture de la bouche. À cette étape, les larves internalisent les microorganismes présents dans l’eau d’élevage et dans la nourriture ainsi que ceux associés à la surface (chorion) des œufs (Vargas-Albores et al. 2021). Une étude portant sur le Discus commun (*Symphysodon aequifasciatus*) suggère également une transmission verticale de certaines bactéries provenant du mucus des géniteurs (Sylvain & Derome 2017). Au stade

adulte, les communautés bactériennes du tube digestif des poissons, qu’ils soient marins ou d’eau douce, se regroupent en quelques phyla majoritaires : *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Fusobacterium* (Nayak 2010). Les poissons marins présentent quant à eux d’importantes proportions de bactéries affiliées aux genres *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Archomobacter*, *Corynebacterium*, *Alteromonas*, *Flavobacterium* et *Micrococcus* (Nayak 2010).

Malgré de nombreuses similitudes, des variations inter- et intra- espèces sont constatées tant au niveau de la structure que de la composition du microbiote intestinal. En effet, plusieurs facteurs tels que le stade de développement, l’alimentation et l’état de santé des animaux ainsi que les pratiques d’élevage et les conditions environnementales sont susceptibles de moduler les communautés bactériennes du tube digestif des poissons (Nayak 2010; Yukgehnaish et al. 2020; Vargas-Albores et al. 2021).

Au niveau fonctionnel, une étude comparative portant sur 2 espèces de poissons, (*Tilapia nilotica*, *Ictalurus punctatus*) a mis en évidence que les organismes présentant un microbiote intestinal enrichi en bactéries anaérobies produisaient plus de vitamine B₁₂ suggérant que ces microorganismes sont impliqués dans la synthèse d’éléments essentiels (Sugita et al. 1990). Le développement d’un organisme modèle, le poisson zèbre (*Danio rerio*), dépourvu de communautés microbiennes a également permis de mettre en évidence plusieurs autres rôles clés. En effet, l’absence de colonisation microbienne du tube digestif chez le poisson zèbre entraîne un dysfonctionnement des cellules épithéliales intestinales, une baisse de l’assimilation des nutriments, un métabolisme altéré, une immunosuppression, une sensibilité accrue aux pathogènes, une croissance réduite, des comportements différents et des taux de mortalité plus importants (Nayak 2010; Vargas-Albores et al. 2021).

Récemment, une étude a été menée sur les microorganismes associés aux branchies et à la peau de sérioles (*Yellowtail kingfish*) (Legrand et al. 2018). En comparant des individus sains ou atteints d’une entérite chronique, ils ont constaté un enrichissement de bactéries affiliées au phylum *Actinobacteria* dans les tissus des poissons malades montrant un lien entre l’état de santé intestinale des animaux et leur microbiote branchial et épidermique. Cette première étude offre ainsi de nouvelles perspectives dans la recherche de biomarqueurs non invasifs pour faciliter les diagnostics sanitaires chez les poissons et potentiellement chez d’autres espèces d’intérêt aquacole.

1.3.3.b- Microbiote et bivalves (mollusques)

La production aquacole mondiale de mollusques est dominée par les bivalves marins (FAO 2022) (Fig. 23). Les communautés microbiennes associées à ces organismes sont tissu-dépendantes (tube digestif, hémolymphe, branchies, etc.) suggérant des rôles physiologiques distincts pour chaque microbiote (Lokmer et al. 2016; Pierce & Ward 2018; Offret et al. 2022). Peu importe l’espèce de bivalves considérée, 2 phyla bactériens majoritaires sont mis en évidence au sein du microbiote intestinal de ces animaux : *Proteobacteria* et *Cyanobacteria* (Pierce & Ward 2018). Néanmoins, la mise en évidence de cyanobactéries, microorganismes autotrophes, paraît surprenante et plusieurs études relatives aux bivalves marins ne considèrent pas ce phylum (Offret et al. 2020; 2022). D’autres phyla ont également été mis en évidence dans le microbiote intestinal de plusieurs espèces d’huîtres, de moules et de palourdes : *Tenericutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Chlamydiae*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* et *Verrucomicrobia* (Pierce & Ward 2018).

Comme pour les poissons, le microbiote intestinal des bivalves présente des variations de composition et d’abondance relative attribuées à différents facteurs exogènes et

endogènes. En effet, les conditions environnementales liées aux marées, aux saisons et à la température ainsi qu’aux pollutions chimiques et plastiques sont susceptibles de moduler les microorganismes associés au tube digestif des animaux (Pierce & Ward 2018; Offret et al. 2020; 2022). L’alimentation est également un facteur exogène capable d’influencer le microbiote intestinal des bivalves (Pierce & Evan 2019). Des facteurs endogènes comme l’espèce, le stade de développement et l’état de santé des animaux sont aussi considérés comme de potentiels sources de variabilité microbienne (Pierce & Ward 2018; Paillard et al. 2022).

Quelques études portant sur les microorganismes associés aux branchies et à l’hémolymphe des bivalves sont disponibles et montrent une forte abondance de bactéries affiliées aux phyla *Proteobacteria* et *Bacteroidetes* dans ces tissus (Pierce & Ward 2018). Plusieurs études suggèrent que les microbiotes branchiaux et hémolympatiques sont fortement influencés par l’environnement (Lokmer et al. 2016) avec une contribution importante de la température (Lokmer & Wegner 2015). Cependant, Lokmer et al. (2016) ont émis l’hypothèse que ces communautés microbiennes pourraient également être modulées par des facteurs intrinsèques à l’hôte tels que l’état de santé. Par exemple, une chute de la diversité des bactéries branchiales chez l’huître, *Crassostrea gigas*, a été mise en évidence suite à l’infection expérimentale des animaux à *Vibrio* sp.. Une augmentation de l’abondance relative de bactéries affiliées au genre *Arcobacter* a également été constatée suggérant que la capacité du microbiote des branchies à rester stable pourrait conférer une résistance à certaines maladies (Lokmer & Wegner 2015).

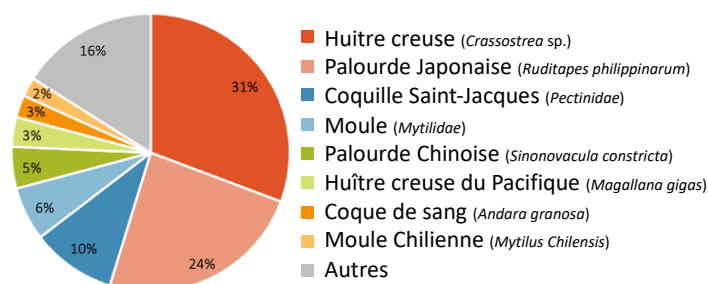


FIGURE 23 – Espèces de mollusques les plus cultivées en aquaculture en 2022 (Source : FAO 2022).

Les 8 espèces les plus cultivées (84%) sont des bivalves marins.

1.3.3.c- Microbiote et crustacés marins

Les études portant sur le microbiote intestinal de différentes espèces de crabes (*Eriocheir sinensis*, *Portunus trituberculatus*, *Scylla* sp.), de langoustes (*Panulirus* sp.) et de homards (*Homarus gammarus*) rapportent que les bactéries associées au tube de digestif de ces animaux sont majoritairement affiliées aux phyla *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*. Des abondances relatives plus faibles de *Tenericutes*, *Actinobacteria* et *Firmicutes* sont également observées (Zhang et al. 2016a; Ding et al. 2017; Sun et al. 2018a; Yang et al. 2019; Sun et al. 2020; Guo et al. 2021; Holt et al. 2021; Lein et al. 2022). Ces phyla ont également été mis en évidence chez les larves du crabe *P. trituberculatus* (Lu et al. 2022).

Comme précédemment, les variations du microbiote intestinal des crustacés sont liées à divers facteurs exogènes et endogènes. Parmi les facteurs exogènes, l’environnement et les méthodes d’élevage sont les plus énoncés chez plusieurs espèces (Holt et al. 2020; Zhang et al. 2016a; Lein et al. 2022). Par exemple, Holt et al. (2020) ont montré une augmentation de la diversité procaryotique intestinale chez des homards élevés en mer en comparaison à des

homards élevés en bassin. En conséquence, les auteurs suggèrent un impact positif sur la croissance et la résistance des animaux au vu des meilleures performances constatées lors des élevages en mer. L'alimentation utilisée au cours de l'élevage est également susceptible d'influencer le microbiote intestinal des crustacés. En effet, malgré la persistance d'un core microbien (80% de similarités), c'est-à-dire d'un ensemble de microorganismes communs à tous les échantillons étudiés (Shade & Handelsman 2012), une étude comparative de crabes *E. sinensis* mâles et femelles nourris avec différents régimes alimentaires montre un enrichissement de certaines communautés bactériennes entre les animaux nourris avec des régimes alimentaires distincts (Sun et al. 2020). En étudiant des crabes *P. trituberculatus* nourris avec différentes concentrations de lipides (5, 10 et 15%), Sun et al. (2018a) remarquent des taux de survie plus faibles chez les individus nourris avec le plus fort taux de lipides. Cette observation est associée à un enrichissement du tube digestif des animaux en bactéries pathogènes opportunistes affiliées aux *Vibrionaceae* et aux *Rickettsiales*. Inversement, en enrichissant la nourriture de crabes *E. sinensis*, avec du L-tryptophane (acide aminé essentiel), Yang et al. (2019) observent des survies améliorées après infection expérimentale des animaux. Ils remarquent également une augmentation de l'abondance relative de certains taxa bactériens ainsi qu'un enrichissement des fonctions microbiennes associées au métabolisme énergétique, au métabolisme des carbohydrates et au métabolisme des acides aminés impliquant un potentiel rôle du microbiote intestinal du crabe dans la digestion ainsi que dans l'immunité. Hormis l'état de santé des animaux, d'autres facteurs endogènes comme l'âge et le stade de développement des individus ainsi que le développement des organes ont été mis en évidence (Ooi et al. 2017; Lein et al. 2022). Les effets de différents stress ont également été testés. Des crabes *E. sinensis* soumis à des stress thermiques ou oxydatifs montrent un enrichissement de leur microbiote intestinal en pathogènes opportunistes (Guo et al. 2021; Li et al. 2023). Ainsi, Li et al. (2023) émettent l'hypothèse que la dysbiose causée par le stress des animaux contribue à réduire l'implication du microbiote intestinal dans la digestion. Au-delà du stress, les infections pathogènes peuvent également impacter les communautés microbiennes des crustacés. Par exemple, en observant le microbiote intestinal de crabes *E. sinensis* après infection au virus du syndrome white spot (WSSV, White Spot Syndrom Virus), Ding et al. (2017) observent une augmentation de plusieurs bactéries pathogènes : *Arcobactera*, *Aeromonas* et *Cyanobacteria*. Ils précisent que ces taxa sont aussi présents chez les individus contrôles non infectés mais dans des abondances relatives moindres et concluent qu'une infection virale pourrait affaiblir le système immunitaire de l'hôte et entraîner une prolifération des communautés microbiennes.

Comme pour les autres espèces d'intérêt aquacole présentées précédemment, des études portant sur les communautés microbiennes associées à d'autres organes des crustacés ont également été publiées. En étudiant des crabes *Scylla paramamosain*, Sun et al. (2018b) sont parvenus à inactiver, par ARNi, 2 oxydases (SpDUOX1 et 2, normalement exprimées au cours d'une infection bactérienne). Cette inactivation conduit à une augmentation de bactéries pathogènes opportunistes affiliées aux *Flavobacterium* et *Acinetobacter* suggérant que les oxydases jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie du microbiote de l'hémolymphe. Zhang et al. (2020) concluent également que la bonne santé de *S. paramamosain* est liée à la capacité de l'animal à maintenir une faible abondance microbienne dans l'hémolymphe. Ils émettent également l'hypothèse que la majorité des bactéries de l'hémolymphe provient de l'intestin et de l'hépatopancréas et non de l'environnement extérieur.

I.3.4- Le microbiote des crevettes, de la larve à l’adulte

Dans ce contexte, les crevettes sont étudiées dans le but de mettre en évidence un microbiote optimal qu’il serait possible d’influencer par des techniques d’élevage et ainsi limiter la sensibilité des animaux aux potentiels pathogènes microbiens.

I.3.4.a- Le microbiote larvaire

Les larves de crevettes élevées en aquaculture peuvent être soumises à des mortalités causées par des pathogènes bactériens (*Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, etc.), des mycoses (*Legenidium* sp., *Sirolopidium* sp., etc.), des protozoaires (*Zoothamnium*, *Vorticella*, etc.) ainsi que des virus (*Baculovirus penaei*, IHNV, WSSV, etc.) (Lightner et al. 1989; Karunasagar et al. 2001; Austin & Zhang 2006). Les premiers stades de vie de la crevette peuvent également être impactés par des syndromes dont les causes ne sont pas établies comme les syndromes zoé 2 ou mysis (Vandenberghé et al. 1999; Sathish Kumar et al. 2017). Malgré cette sensibilité des larves de crevettes en contexte aquacole, leur microbiote n’a été que très peu étudié en utilisant les nouvelles techniques de séquençage et de bioinformatique. En effet, à ce jour, les recherches se focalisent sur le microbiote intestinal des juvéniles et des adultes alors que très peu d’études portant sur les communautés microbiennes larvaires et leur environnement sont recensées (Zheng et al. 2017; Xue et al. 2018; Wang et al. 2020a; b) (Tab. 1). Par séquençage des ADNs bactériens extraits, ces recherches se concentrent sur l’étude des communautés procaryotiques associées aux larves de *Penaeus vannamei* et à leur environnement.

TABLEAU 1 – Principales publications traitant du microbiote larvaire de crevettes d’intérêt aquacole et utilisant une technique de séquençage.

Les méthodologies décrites sont détaillées dans le chapitre III (partie III.2.2) et en annexe (annexes 1 à 3).

PUBLICATION	ESPÈCE ETUDIÉE	STADES LARVAIRES	EAU ET NOURRITURE	MÉTHODOLOGIE
Zheng et al. 2017	<i>P. vannamei</i>	- Zoé 1 & 3 - Mysis 1 & 3 - Post-larve 1, 3 & 6	Eau d’élevage associée	Métabarcoding des ADNs extraits et séquencés par 454 (région V3-V6)
Xue et al. 2018	<i>P. vannamei</i>	- Nauplii - Zoé 2 - Mysis 1 - Post-larve		Métabarcoding des ADNs extraits et séquencés par 454 (région V4)
Wang et al. 2020a	<i>P. vannamei</i>	- Nauplii - Zoé 2 - Mysis 2 - Post-larve 2	Eau d’élevage associée Nourriture	Métabarcoding des ADNs extraits Illumina HiSeq (région V4)
Wang et al. 2020b	<i>P. vannamei</i>	- Nauplii - Zoé 1, 2 & 3 - Mysis - Post-larve		Métabarcoding des ADNs extraits et séquencés par Illumina MiSeq (région V4)

Bien que ces études utilisent des méthodologies différentes pour étudier le microbiote larvaire, de nombreuses similitudes se dégagent ; notamment concernant les communautés microbiennes prédominantes. En effet, toutes concluent que les *Proteobacteria* (essentiellement *Alphaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*) et les *Bacteroidetes* sont les phyla bactériens les plus abondants au sein des échantillons prélevés (Zheng et al. 2017; Xue et al. 2018; Wang et al. 2020a; b) (Fig. 24). Des proportions importantes d'*Actinobacteria* (Zheng et al. 2017; Xue et al. 2018; Wang et al. 2020b), de *Firmicutes* (Xue et al. 2018; Wang et al. 2020a) et de *Chloroflexi* (Wang et al. 2020b) sont également mises en évidence. Bien que des communautés microbiennes communes se détachent et persistent au cours de l'élevage, tous les auteurs remarquent des variations importantes des microorganismes procaryotiques associés aux larves et à leur environnement au cours du développement. Dans un premier temps, des différences de richesse et d'équitabilité sont mises en évidence (Wang et al. 2020a,b). Ces termes désignent respectivement le nombre de communautés microbiennes en présence et l'uniformité de ces communautés au sein des échantillons, indiquant ainsi des variations de la diversité procaryotique au cours de l'élevage (ces notions seront détaillées dans le chapitre II, partie III.5.3, Tab. 8). Au niveau taxonomique, des modifications sont également constatées. Par exemple, dans l'eau d'élevage, Zheng et al. (2017) remarquent une augmentation significative des *Flavobacteriaceae* au moment du stade zoé, des *Actinobacteria* au stade mysis et des *Microbacteriaceae* au stade post-larve (Fig. 25). De la même manière, Wang et al. (2020a) parviennent, grâce à une analyse discriminante linéaire (LDA) avec effet de taille (Linear discriminant analysis with Effect Size, LEfSe), à mettre en évidence des genres bactériens spécifiquement enrichis dans les larves selon le stade de développement. Ils démontrent ainsi que les genres *Vibrio*, *Pseudalteromonas*, *Thalassolituus* et *Kordia* sont enrichis au stade nauplii, que *Gilvibacter* prédomine dans les larves zoé, que *Tenacibaculum* et *Shimia* sont plus abondants dans les larves mysis et que les post-larves sont dominées par les *Thalassotalea*. Néanmoins, les auteurs précisent que malgré une grande variation de la taxonomie microbienne au cours de l'élevage, une stabilité phylogénétique est conservée. Ils démontrent également que le microbiote larvaire est largement influencé par l'eau d'élevage, surtout au moment du stade zoé où l'ouverture de la bouche a lieu. Ils émettent ainsi l'hypothèse qu'à partir de ce stade de développement des communautés microbiennes spécifiques sont recrutées dans l'eau d'élevage par le système digestif immature des larves. Ils remarquent d'ailleurs que les microalgues du régime alimentaire des larves entraînent un apport non négligeable de bactéries du genre *Nautella* au sein du microbiote des larves aux stades nauplii et zoé. De manière intéressante, ce genre bactérien est également mis en évidence par Zheng et al. (2017) mais dans un contexte totalement différent. En effet, en recherchant des biomarqueurs microbiens de l'état de santé des larves dans leur eau d'élevage, les auteurs concluent que les *Nautella* sont des indicateurs d'un mauvais état de santé alors que les *Meridianimaribacter* sont des indicateurs d'un bon état de santé.

En conclusion, malgré le faible nombre d'études portant sur le microbiote larvaire des crevettes en contexte aquacole, il a été montré que les communautés procaryotiques associées aux larves sont influencées par le stade de développement ainsi que par l'environnement des animaux aussi bien au niveau de l'eau d'élevage que de l'alimentation. Cependant, les recherches menées concernent essentiellement la crevette *P. vannamei*. Or, il a été montré que l'acquisition du microbiote pouvait être espèce-dépendante (Hansen & Olafsen 1999; Maraci et al. 2021). De plus, les études mentionnées se focalisent sur l'analyse des ADNs bactériens et ne prennent ainsi pas en compte uniquement la fraction active de la

diversité microbienne. L’analyse des ARNs totaux permettrait de déterminer plus précisément les communautés procaryotiques impliquées et d’affiner les recherches menées sur le microbiote associé aux élevages larvaires de crevette (Yates et al. 2021).

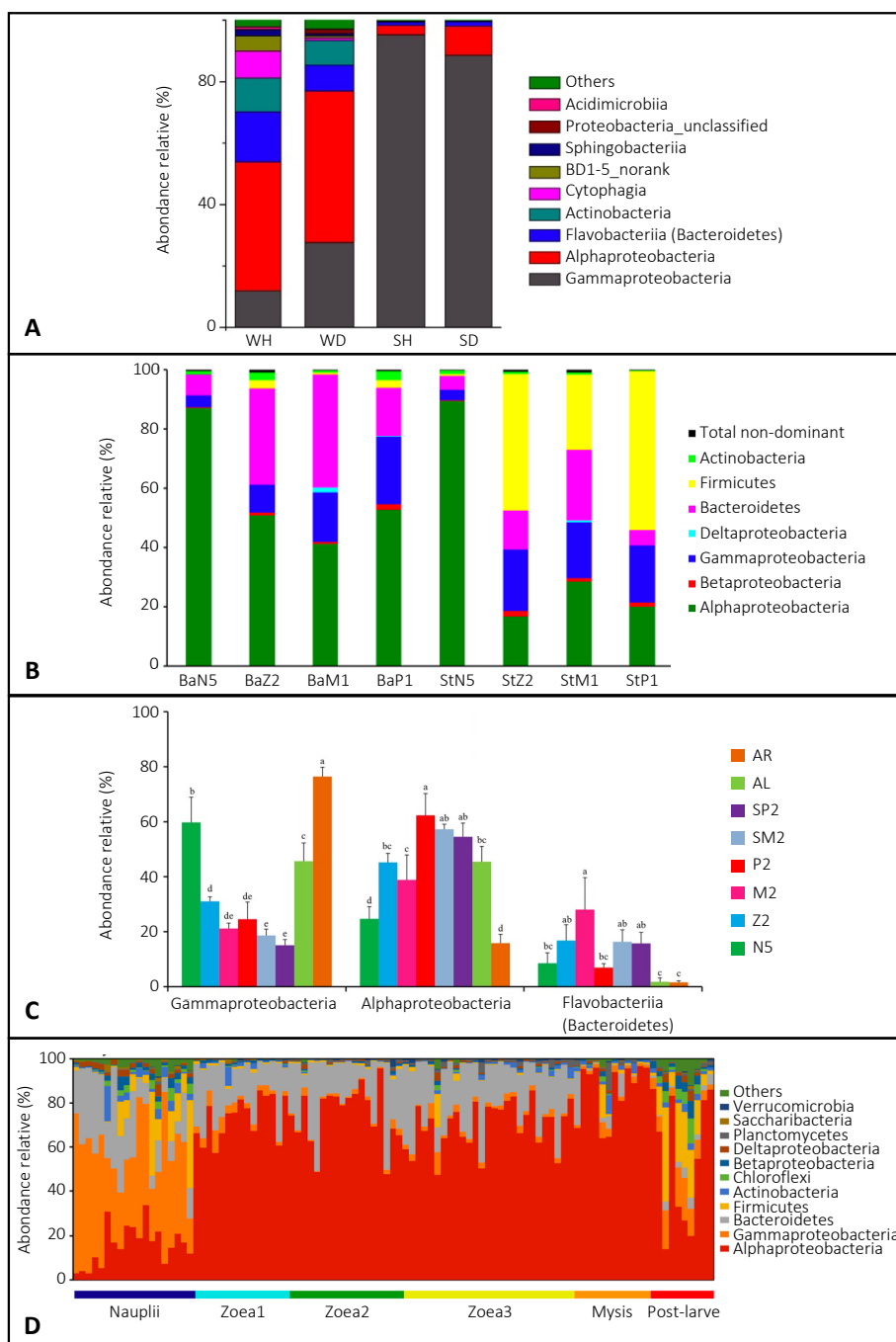


FIGURE 24 – Communautés microbiennes majoritaires mises en évidence dans la littérature traitant des microorganismes associés aux larves de crevettes, *Penaeus vannamei*, et à leur environnement. Traduit et adapté de A) Zheng et al. 2017, B) Xue et al. 2018, C) Wang et al. 2020a et D) Wang et al. 2020b.

WH et WD désignent respectivement des échantillons d’eau d’élevage de larves en bonne et en mauvaise santé. SH et SD désignent respectivement des larves en bonne et en mauvaise santé. N5, Z2, M1, M2, P1 et P2 désignent respectivement des larves aux stades nauplii 5, zoé 2, mysis 1, mysis 2, post-larve 1 et post-larve 2. SM2, SP2, AL et AR désignent des sources de nourriture (SM2 pour particules à mysis 2, SP2 pour particules à post-larve, AL pour algue et AR pour larves d’*Artemias* sp.).

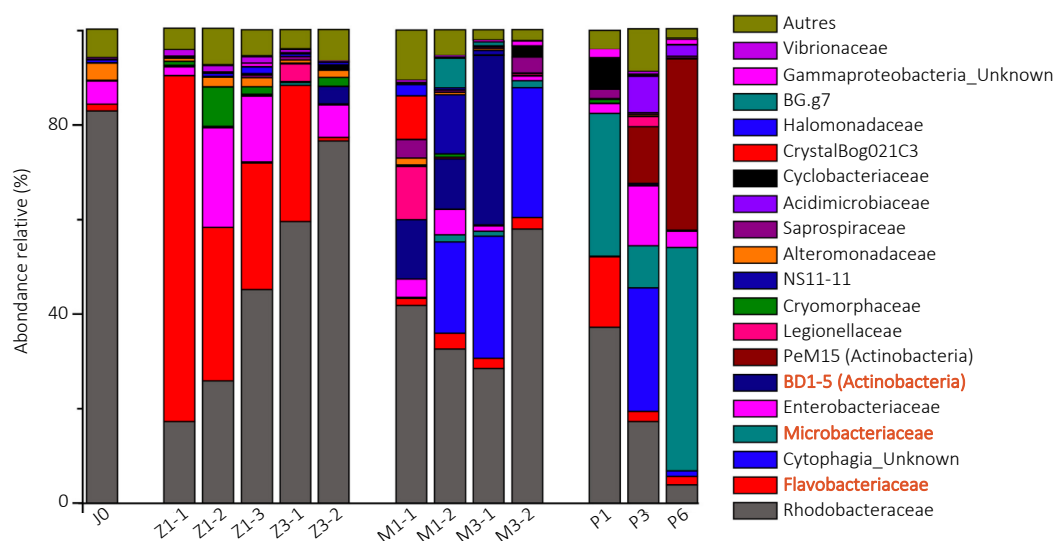


FIGURE 25 – Familles bactériennes mises en évidence par Zheng et al. (2017) dans l’eau d’élevage des larves aux stades zoé 1 (Z1), zoé 3 (Z3), mysis 1 (M1), mysis 3 (M3), post-larve 1 (P1), post-larve 3 (P3) et post-larve 6 (P6) (Traduit de Zheng et al. 2017).

L’eau des larves zoé et mysis a été échantillonnée en triplicat (1 à 3) ou en duplicat (1 et 2). L’eau d’élevage avant introduction des larves est désignée par J0. Les familles bactériennes notées en rouge sont celles dont les abondances sont statistiquement différentes entre les stades. Le terme « unknown » signifie que l’assignation taxonomique jusqu’au niveau de la famille n’était pas possible.

1.3.4.b- Microbiote et crevettes adultes

Les études portant sur les communautés microbiennes associées aux crevettes adultes et juvéniles se focalisent sur le microbiote intestinal. Cela s’explique par son rôle essentiel dans la physiologie de l’hôte, mais également par le fait que sa diversité est bien plus importante comparée à celle du microbiote d’autres tissus comme l’hépatopancréas, les branchies ou même l’organisme entier (Cornejo-Granados et al. 2018). Comme pour le microbiote larvaire, les microorganismes associés au système digestif des crevettes adultes sont largement dominés par des bactéries affiliées aux phyla des *Proteobacteria* ainsi qu’aux *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes* dans des proportions moins importantes (Li et al. 2018; Cornejo-Granados et al. 2018). Malgré ces communautés prédominantes, les crevettes sont également associées à des bactéries plus spécifiques dont l’abondance peut varier selon différents facteurs.

Tout d’abord, le microbiote intestinal de différentes espèces de crevettes d’eau douce et marines est largement influencé par la croissance des animaux (Cornejo-Granados et al. 2018). Par exemple, au cours des 20 premiers jours d’élevage post-larvaires de *P. vannamei*, une prédominance de la famille des *Vibrionaceae* est observée puis disparaît ensuite totalement pour laisser place aux *Intraspongiaceae* et aux *Rhodobacteraceae* (Garibay-Valdez et al. 2020). Zeng et al. (2017) montrent que la diversité des communautés microbiennes intestinales augmente entre les post-larves et les adultes de *P. vannamei* avec une diminution de la prévalence des *Proteobacteria* au cours du grossissement. Ils démontrent également que des microorganismes spécifiques et communs existent entre les post-larves et les adultes suggérant l’existence de communautés modulables et d’un core microbien persistant tout au long de la vie de l’animal. En comparant des crevettes *P. vannamei* élevées sous les mêmes

conditions mais présentant des taux de croissance différents, [Xiong et al. \(2017\)](#) suggèrent que les variations microbiennes observées sont dues à des variations de l’activité digestive des animaux. Cela est également fortement lié au régime alimentaire de la crevette qui change tout au long de son cycle de vie. Des études montrent d’ailleurs que la composition lipidique et glucidique de l’alimentation de *P. vannamei* est susceptible d’influencer la composition du microbiote intestinal à l’âge adulte. En effet, en comparant des crevettes nourries avec des sources lipidiques variées ou uniques, [Zhang et al. \(2014a\)](#) remarquent que la diversification des lipides dans l’alimentation entraîne un meilleur rendement de croissance, corrélé à une plus forte abondance de la famille des *Rhizobiaceae* ; et ce malgré l’existence de communautés microbiennes communes. De la même manière, des crevettes *P. vannamei* nourries avec des sources glucidiques différentes présentent des microbiotes intestinaux distincts malgré une large prédominance de *Proteobacteria* ([Qiao et al. 2017](#)). Les crevettes nourries avec de l’aliment enrichi en fécule de maïs et présentant un plus faible taux de survie arborent ainsi un microbiote enrichi en pathogènes opportunistes contrairement aux crevettes nourries avec des aliments enrichis en glucose ou en sucrose. Au-delà du régime alimentaire, les techniques d’élevage peuvent également influencer les communautés microbiennes associées aux animaux ([Huang et al. 2018](#)). En effet, des crevettes *P. vannamei* adultes récoltées en milieu naturel présentent un microbiote plus diversifié que celui des crevettes adultes de la même espèce, prélevées en élevage ([Cornejo-Granados et al. 2017](#)). De plus, plusieurs études montrent que la composition microbienne des intestins et des sédiments des bassins d’élevage des crevettes sont similaires ([Cornejo-Granados et al. 2018](#); [Huang et al. 2018](#); [Fan et al. 2019](#)). De la même manière, la qualité de l’eau d’élevage ainsi que la fréquence de renouvellement de cette eau sont également susceptibles de modifier le microbiote des animaux ([Huang et al. 2018](#); [Chen et al. 2019](#)). Des études montrent l’impact de variations de température ([Al-Masqari et al. 2022](#)) et de salinité ([Zhang et al. 2016b](#)) sur le microbiote intestinal des crevettes *P. vannamei*. Enfin, un facteur important étroitement lié avec le microbiote intestinal des crevettes est l’état de santé des animaux. [Xiong et al. \(2015\)](#) démontrent d’ailleurs que 38 familles bactériennes sont différentiellement abondantes dans le tube digestif entre des crevettes *P. vannamei* en bonne et en mauvaise santé. Les auteurs indiquent également que la gravité de la dégradation de l’état de santé des animaux est fortement liée aux changements microbiens observés.

Ainsi, les crevettes en élevage sont soumises tout au long de leur développement et de leur grossissement à de nombreux facteurs endogènes ou exogènes ([Fig. 26](#)). Ces facteurs de sélection exercent une pression sur leur microbiote intestinal qui est ainsi modulé selon les besoins physiologiques de l’animal ([Xiong et al. 2017](#)). Deux mécanismes de sélection sont possibles. Les microorganismes peuvent directement être impactés par le facteur de sélection. Par exemple, une communauté est sélectionnée dans un milieu à une certaine salinité et / ou à une certaine température du fait de ses capacités de croissance dans cet environnement. Inversement, l’hôte peut être impacté par le facteur de sélection et entraîner un bouleversement du microbiote. Par exemple, des variations de salinité et / ou de température entraînent un stress de l’hôte résultant en la modification de ses communautés microbiennes.

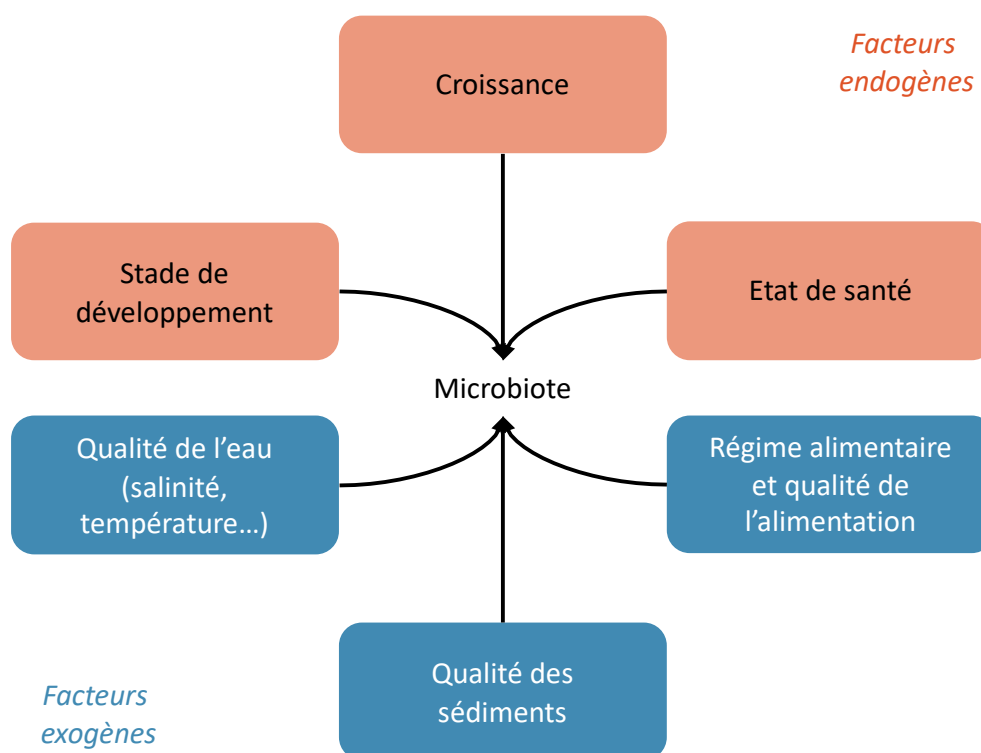


FIGURE 26 – Facteurs susceptibles d’influencer le microbiote intestinal des crevettes adultes.

Bien que le microbiote intestinal associé aux crevettes adulte soit le plus étudié, plusieurs études ont été publiées sur l’analyse des communautés microbiennes associées à l’hémolymphe, à l’hépatopancréas ainsi qu’aux branchies de différentes espèces de pénéides. En comparant les microorganismes associés aux intestins et à l’hépatopancréas de *P. vannamei*, [Cornejo-Granados et al. \(2017\)](#) remarquent une diversité bactérienne plus faible dans l’hépatopancréas et une dominance de taxa affiliés aux genres *Pseudomonas*, *Vibrio* et *Escherichia*. Les auteurs mettent également en évidence des compositions procaryotiques hépatopancréatiques distinctes entre des crevettes sauvages ou élevées ainsi qu’entre des crevettes saines ou infectées à *V. parahaemolyticus*, suggérant un impact des conditions d’élevage et de l’état de santé des animaux sur ces microorganismes. Pour aller plus loin, des expérimentations ont été menées en inactivant la réponse immunitaire humorale de crevettes *P. japonicus* et *P. vannamei* ([Fagutao et al. 2009](#); [Wang et al. 2014](#)). [Fagutao et al. \(2009\)](#) inactivent la prophénol-oxidase, initiatrice de cascades de réactions immunitaires, alors que [Wang et al. \(2014\)](#) inactivent la lectine de type-C qui participe à la reconnaissance des pathogènes. Les 2 études constatent une prolifération des microorganismes présents dans l’hémolymphe ainsi qu’une mortalité accrue des animaux. Récemment, un article sur le microbiote branchial de *P. vannamei* met en évidence une modification des communautés microbiennes de ce tissu suite à une infection à *V. parahaemolyticus* affectant l’hépatopancréas, ouvrant ainsi la voie à la recherche de méthodes de détection biosanitaire moins invasives chez les crevettes d’intérêt aquacole ([Lv et al. 2020](#)).

I.4- Analyses multivariées et méta-analyses pour étudier le microbiote

I.4.1- Définitions

I.4.1.a- Analyses multivariées

Les analyses multivariées consistent en l’analyse statistique simultanée de plusieurs variables et permettent ainsi la visualisation et l’exploration de données multidimensionnelles. La notion de dimension statistique fait référence au nombre d’attributs d’un ensemble de données. Prenons l’exemple de l’analyse des communautés microbiennes associées à un organisme et son environnement. Ces dernières sont susceptibles d’être modifiées sous l’influence de processus multifactoriels. Il est donc nécessaire de multiplier le nombre d’individus et de facteurs considérés lors de l’analyse du microbiote afin de tenir compte de la complexité des interactions et des variabilités existantes. En conséquence, des tableaux contenant plus de 2 variables (régime alimentaire, caractéristiques du milieu de vie, usage d’antibiotique, stade de développement, état de santé de l’hôte...) réparties au sein de plus de 2 unités statistiques (plusieurs individus, plusieurs échantillons environnementaux) sont obtenus. En d’autres termes, l’analyse du microbiote génère des jeux de données à plusieurs dimensions à partir desquels différentes analyses multivariées aux objectifs multiples peuvent être réalisées. En effet, lorsque ces dernières sont descriptives ou exploratoires, l’objectif est de structurer et de résumer le jeu de données en réduisant le nombre de dimensions de celui-ci. Les variables considérées ont alors toutes le même poids au sein de l’analyse. En revanche, lorsque les analyses multivariées sont explicatives ou décisionnelles, l’objectif est d’établir un lien de causalité ou de corrélation entre une variable dite dépendante et plusieurs variables explicatives indépendantes (Ramette 2007). Il existe ainsi une multitude d’analyses multivariées dont le choix dépend du questionnement scientifique, de la nature des données et du nombre de tableaux qui les contiennent (Tab. 2).

I.4.1.b- Méta-analyses

La méta-analyse est définie comme une analyse statistique qui combine ou intègre les résultats de plusieurs expérimentations indépendantes mais considérées comme comparables (Glass 1976). Cette méthode analytique est utilisée depuis plus de 50 ans et est actuellement reconnue comme le niveau de preuve le plus élevée dans le domaine de la recherche médicale (Haidich 2010) (Fig. 27). Les analyses multivariées sont utilisées en routine lors de l’étude du microbiote. Lorsque ces analyses multivariées sont combinées à des méta-analyses, un grand nombre de paramètres expérimentaux peuvent être considérés et ainsi augmenter la résolution spatio-temporelle et la précision des études portant sur le microbiote.

TABLEAU 2 – Liste non exhaustive des analyses multivariées les plus utilisées pour l’analyse du microbiote.

OUTIL	TYPE D’ANALYSE	NOMBRE DE TABLEAUX	TYPE DE VARIABLE	PRINCIPE
Analyse en Composantes Principales (ACP)	Exploratoire	1	Variables quantitatives	Analyse et visualisation de la corrélation ou de la covariance
Analyse en Coordonnées Principales (PCoA), Non-Metric Dimensional Scaling (NMDS)	Exploratoire	1	Matrice de distances	Analyse et visualisation d’une matrice de distance entre individus.
Analyse des Correspondances Multiples (ACM)	Exploratoire	1	Variables qualitatives	Pendant qualitatif de l’ACP.
Analyse Factorielle Multiple (AFM)	Exploratoire	>2	Tableaux de variables quantitatives et / ou tableaux de variables qualitatives	Visualisation simultanée de plusieurs tableaux de variables de nature différente.
Méthodes de classification (Classification Ascendante Hiérarchique ou CAH, k-means...)	Exploratoire	1	Variables quantitatives	Partitionnement des données dans des clusters selon leur degré de similarité.
Modélisation statistique (régression, ANOVA...)	Décisionnelle (Causalité)	1	Une variable à expliquer et plusieurs variables explicatives quantitatives ou qualitatives	Description des processus générant les données et estimation de prédictions.
Analyse Canonique des Corrélations	Décisionnelle (Corrélation) ou Exploratoire	2	Deux tableaux de variables quantitatives	Analyser les corrélations existantes entre 2 tableaux.
Analyse Canonique des Correspondances (ACC)	Décisionnelle (Causalité) ou Exploratoire	2	Un tableau de contingence et un tableau explicatif de variables quantitatives ou qualitatives	Analyser les liens unimodaux existant entre 2 tableaux.
Analyse de Redondance (RDA)	Décisionnelle (Causalité)	2	Un tableau de contingence et un tableau explicatif de variables quantitatives ou qualitatives	Analyser les liens linéaires existant entre 2 tableaux.

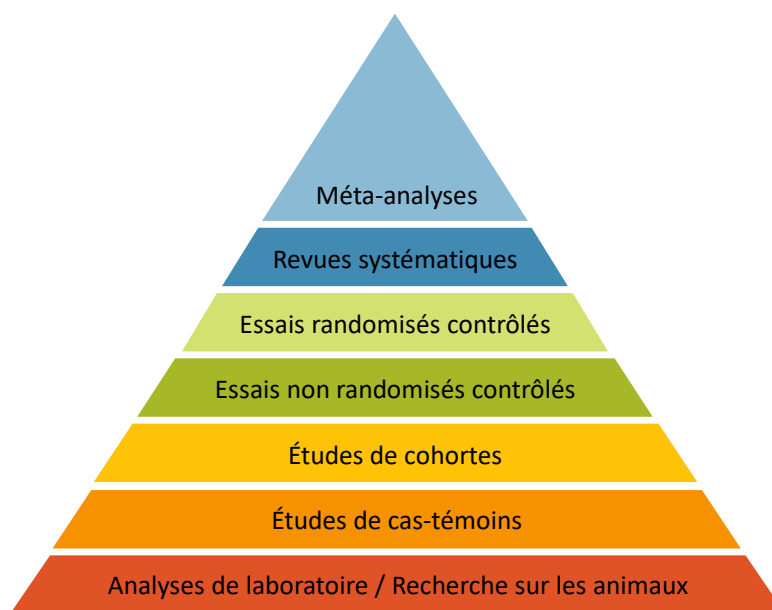


FIGURE 27 – Pyramide de la hiérarchie des preuves en recherche médicale (Modifié de Heidich 2010).

1.4.2- Méta-analyses pour l’étude du microbiote des crevettes

Au cours des 5 dernières années, 3 méta-analyses ont été conduites afin d’étudier le microbiote associé à des crevettes marines et d’eau douce. En 2018, la première méta-analyse a été publiée par [Cornejo-Granados et al. \(2018\)](#). Ils identifient 16 publications traitant du microbiote des crevettes dans la littérature et extraient 199 échantillons (Fig. 28, Tab. 3). Les auteurs démontrent par l’analyse de l’ensemble de ces échantillons que le facteur biologique influençant le plus le microbiote associé aux crevettes est l’environnement (marin ou eau douce). En effet, ils montrent que les *Proteobacteria* constituent 88,6% de l’abondance relative totale du microbiote des crevettes marines alors qu’ils ne représentent que 52,4% du microbiote des crevettes d’eau douce. Inversement, les *Firmicutes* sont plus abondants chez les espèces d’eau douce (32,1%) par rapport aux espèces marines (1,2%). Les auteurs concluent également que les familles *Rhodobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Helicobacteraceae* et *Pseudoalteromonadaceae* dominent les échantillons provenant de l’environnement marin alors que les *Oxalobacteraceae*, les *Comamonadaceae* et les *Bacillaceae* sont prépondérants dans les crevettes d’eau douce. En considérant uniquement les échantillons de crevettes marines, ils identifient d’autres facteurs biologiques susceptibles d’influencer la diversité du microbiote : le mode de vie, le tissu, le stade de développement et l’état de santé. En effet, ils mettent d’abord en évidence une diversité bactérienne accrue chez les animaux sauvages comparés aux animaux de laboratoire et d’élevage. Ils montrent ensuite que la diversité bactérienne est plus grande chez les adultes comparés aux autres stades de développement, dans les intestins en comparaison des autres organes et chez les individus sains par rapport aux individus en mauvaise santé. Grâce à cette méta-analyse, [Cornejo-Granados et al. \(2018\)](#) parviennent ainsi, avec une analyse unique, à identifier une multitude de facteurs influençant le microbiote associé aux crevettes tout en hiérarchisant l’importance de contribution de ces facteurs.

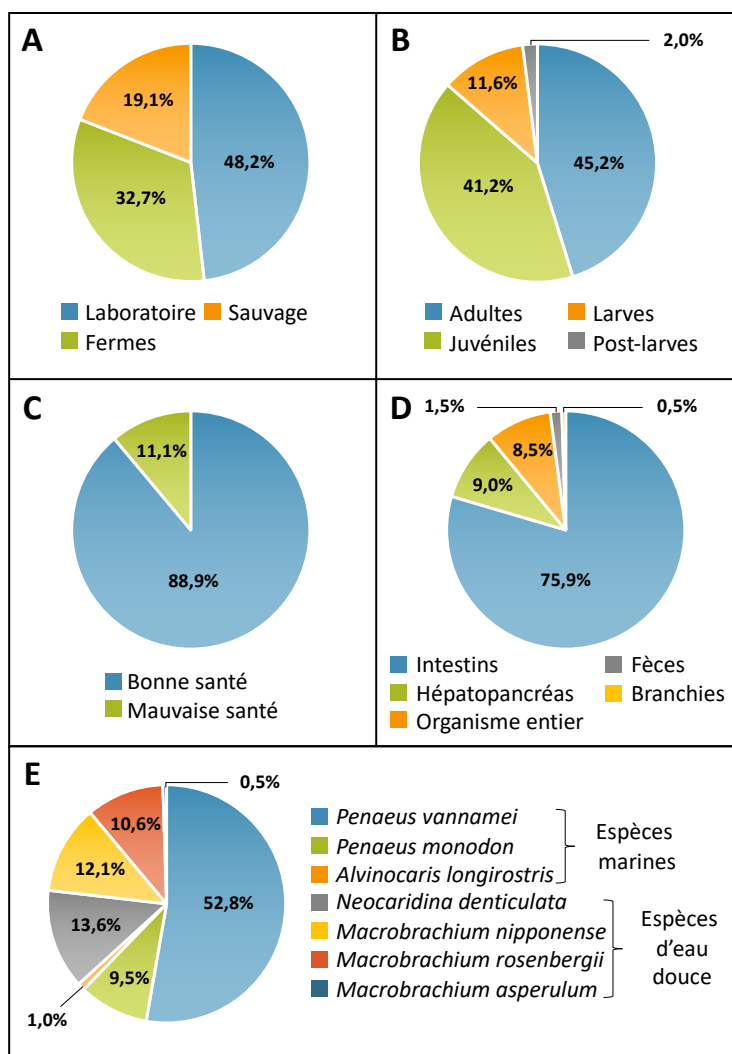


FIGURE 28 – Répartition des échantillons considérés par la méta-analyse de Cornejo-Granados et al. (2018) selon A) la provenance, B) le stade de développement, C) l’état de santé, D) le tissu d’extraction et E) les différentes espèces de crevettes étudiées.

TABLEAU 3 – Techniques utilisées par les études considérées dans la méta-analyse de Cornejo-Granados et al. (2018).

Les méthodologies décrites sont détaillées dans le chapitre III (partie III.2.2) et en annexe (annexes 1 à 3).

RÉGION HYPERVARIABLE Du gène codant pour l’ARNr 16S	TECHNOLOGIES DE SÉQUENÇAGE	NOMBRE D’ÉTUDES
V1-V2	illumina MiSeq	2
	Roche 454	1
V2-V3	Ion Torrent	1
V1-V3	Ion Torrent	1
V3-V4	Roche 454	3
	illumina MiSeq	1
V3-V6	Roche 454	2
V4-V5	illumina MiSeq	4
V2, V3, V4, V5, V6-V7, V8, V9	Ion Torrent	1

En 2018, Yu et al. (2018) publient également une méta-analyse portant sur le microbiote des crevettes. Ils se focalisent sur des études considérant les communautés procaryotiques larvaires mais aussi intestinales de *P. vannamei* juvéniles et adultes. Ils sélectionnent ainsi 5 études représentant un total de 99 échantillons (Fig. 29, Tab4). Les auteurs mettent en évidence 5 phyla bactériens majoritaires (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Tenericutes*) ayant des abondances variables selon l’état de santé des animaux. Par exemple, les *Gammaproteobacteria* sont enrichies dans les échantillons de crevettes en mauvaise santé alors que les *Alphaproteobacteria* et les *Actinobacteria* tendent à diminuer dans ces mêmes échantillons en comparaison des animaux en bonne santé. Yu et al. (2018) remarquent également que la diversité du microbiote est diminuée chez les individus malades par rapport aux individus sains. Néanmoins, ils précisent que les individus malades et les cohortes saines associées présentent des microbiotes plus similaires que les différents stades de développement considérés. En utilisant une méthode de modélisation prédictive (randomForest, ensemble de méthodes de classification et régression visant à construire un arbre décisionnel), les auteurs mettent en évidence 11 ordres bactériens identifiés comme des biomarqueurs universels de mauvaise santé chez les crevettes (*Alteromonadales*, *Aeromonadales*, *Thiotricales*, *Oceanospirillales*, *Caulobacterales*, *Pseudanabaenales*, *Caldilineales*, *Chlamydiales*, *Cytophagales*, *Actinomycetales*, *Acidimicrobiales*). Ils remarquent que l’abondance relative de ces taxa varie entre les individus en bonne et en mauvaise santé. Par exemple, les *Acidimicrobiales* et les *Actinomycetales* sont toujours en plus petite proportion chez les individus malades et inversement pour les *Aeromonadales* et les *Alteromonadales*. Cette nouvelle méta-analyse permet ainsi d’identifier pour la première fois de potentiels biomarqueurs bactériens de l’état de santé d’une espèce de crevette d’intérêt aquacole. Cependant, ces indicateurs ont été mis en évidence à partir de prélèvements intestinaux nécessitant le sacrifice des animaux, compliquant ainsi leur utilisation en routine pour contrôler l’état de santé des crevettes.

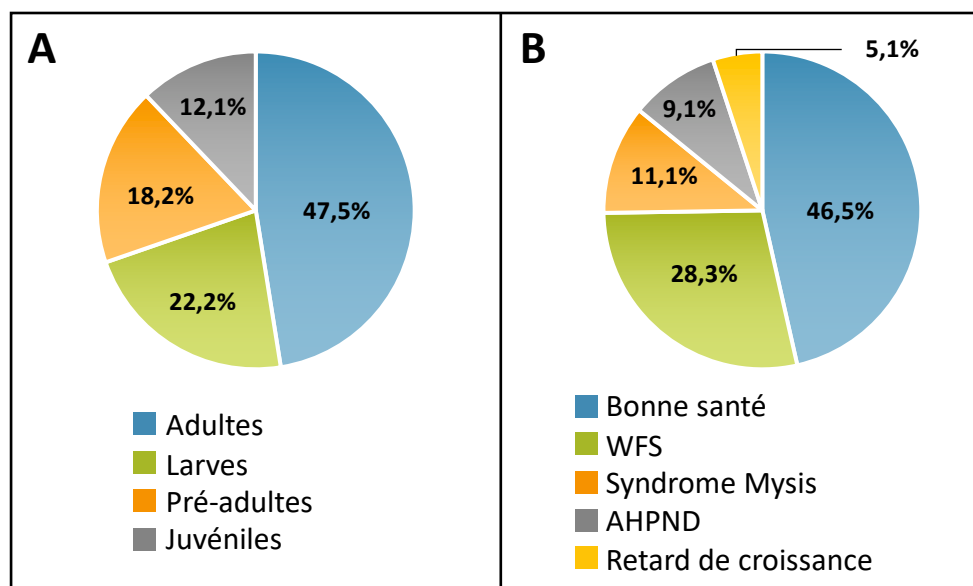


FIGURE 29 – Répartition des échantillons considérés par la méta-analyse de Yu et al. (2018) selon A) le stade de développement et B) l’état de santé des animaux étudiés.

WFS désigne le white feces syndrome et AHPND désigne la maladie de la nécrose hépatopancréatique aigue.

TABEAU 4 – Techniques utilisées par les études considérées dans la méta-analyse de Yu et al. (2018).

Les méthodologies décrites sont détaillées dans le chapitre III (partie III.2.2) et en annexe (annexes 1 à 3).

RÉGION HYPERVARIABLE du gène codant pour l’ARNr 16S	TECHNOLOGIE DE SEQUENÇAGE	NOMBRE D’ETUDES
V3-V4	Illumina MiSeq	3
V3-V6	Roche 454	1
V4	Illumina MiSeq	1

Plus récemment, en 2022, [Sha et al. \(2022\)](#) ont également cherché à identifier des taxa bactériens indicateurs d’un mauvais état de santé chez *P. vannamei*. Pour arriver à cet objectif, les auteurs rassemblent les données issues de 10 études portant sur le microbiote intestinal de cette espèce. Ils considèrent ainsi 261 échantillons (Fig. 30, Tab. 5). Les auteurs remarquent une grande variabilité des phyla dominants (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*) et attribuent ces variations à l’état de santé et au stade de développement des animaux. Ils montrent aussi que les *Actinobacteria* augmentent chez les crevettes en bonne santé. Ces 2 premières conclusions rejoignent les observations précédemment faites par [Yu et al. \(2018\)](#). En revanche, [Sha et al. \(2022\)](#) ne remarquent aucune variation en termes de diversité bactérienne. En sélectionnant au hasard 171 échantillons, les auteurs mettent au point un modèle prédictif. Ils identifient alors 18 taxa bactériens communs à l’ensemble des individus malades et dont l’abondance varie au sein des échantillons (*Cellvibrionales*, *Erysipelotrichaceae*, *Rubritaleaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Spongiimonas*, *Photobacterium*, 2 *Pseudoalteromonas*, 2 *Vibrio*, *Gloeobacter*, *Candidatus Bacilloplasma*, *Silicimonas*, *Bauldia*, *Fulvivirga*, *Actibacterium*). Les auteurs concluent finalement que leur modèle est fiable à 90% en prédisant l’état de santé des 90 échantillons non considérés lors de la construction du modèle. Comme l’étude précédente, il est cependant important de noter que ces bioindicateurs ont été identifiés à partir d’échantillons intestinaux.

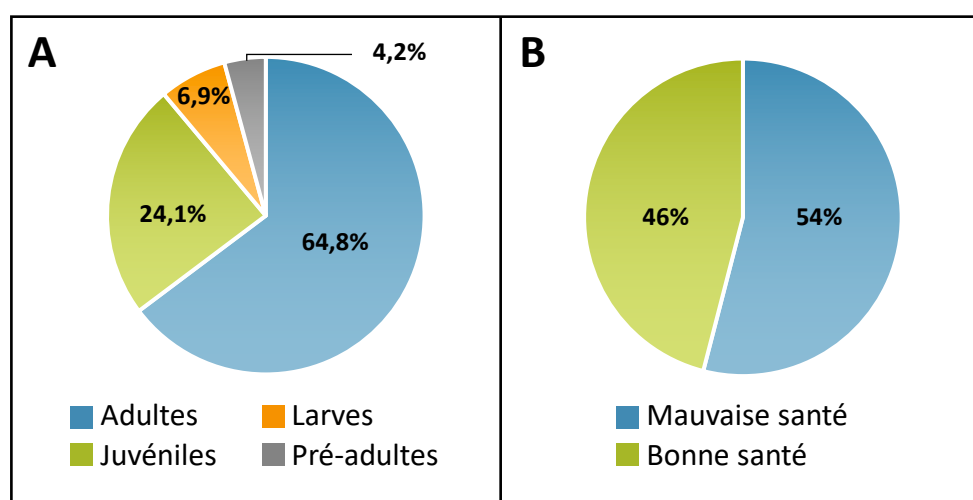


FIGURE 30 – Répartition des échantillons considérés par la méta-analyse de Sha et al. (2022), selon A) le stade de développement et B) l’état de santé des animaux étudiés.

TABLEAU 5 – Techniques utilisées par les études considérées dans la méta-analyse de Sha et al. (2022).

Les méthodologies décrites sont détaillées dans le chapitre III (partie III.2.2) et en annexe (annexes 1 à 3).

RÉGION HYPERVARIABLE du gène codant pour l’ARNr 16S	TECHNOLOGIES DE SEQUENÇAGE	NOMBRE D’ETUDES
V1-V2	Ion Torrent	1
V3-V4	Illumina MiSeq	6
V3-V6	Roche 454	1
V4	Illumina MiSeq	1
	Illumina HiSeq	1

I.4.3- Limites des méta-analyses

Malgré l’avancement que représentent les méta-analyses dans la compréhension de la dynamique du microbiote associé à des crevettes d’intérêt aquacole, il est nécessaire d’évoquer plusieurs limites. [Cornejo-Granados et al. \(2018\)](#) le soulignent d’ailleurs dans leur étude. En effet, en prenant en compte l’ensemble des facteurs susceptibles d’influencer le microbiote des animaux considérés, ils mettent en évidence que les 3 premières variables impactant la structure des communautés procaryotiques ne sont pas des facteurs biologiques mais des facteurs liés à la méthode expérimentale. Le choix de la région hypervariable du gène codant pour l’ARNr 16S est ainsi le premier facteur expliquant les variabilités du microbiote suivi par le choix des amorces utilisées et de la technologie de séquençage employée (ces notions seront abordées dans le chapitre III, partie III.2 et en annexe). De plus, aucune des méta-analyses présentées ne prend en compte les biais analytiques pouvant être liés au choix du kit d’extraction des ADNs. Or, [Xue et al. \(2018\)](#) ont montré que cela pouvait entraîner des différences concernant les microorganismes mis en évidence au cours des analyses microbiennes en aval. Ainsi la résolution des méta-analyses pourrait être grandement augmentée en considérant des échantillons traités de la même manière et séquencés avec la même technologie. Cela permettrait de réduire les biais expérimentaux pour mieux mettre en évidence les facteurs biologiques en jeu. Dans le cas des études portant sur la recherche de bioindicateurs microbiens de l’état de santé des animaux, il semble également important d’essayer d’identifier des indicateurs autres que ceux intrinsèques à l’animal pour pouvoir développer des méthodes (outils de détection) facilement utilisables en routine.

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

II- Chapitre II – Matériels et méthodes

II.1- Élevages larvaires réalisés dans le cadre de cette thèse et échantillonnages

Les échantillons analysés au cours de ce projet de thèse ont été récoltés lors de plusieurs campagnes de prélèvements conduites entre septembre 2018 et mai 2021 au sein de différentes écloséries du territoire (Fig. 31). Au total, 3 écloséries ont été considérées : l'éclosérie basée à la Station Aquacole de Saint Vincent (SASV) à Boulouparis et 2 écloséries privées. Globalement, ces écloséries suivent le protocole d'élevage larvaire décrit dans le chapitre I (partie I.2.3.d) ; c'est-à-dire des inséminations artificielles réalisées avec des géniteurs élevés en bassins de terre puis un ensemencement des larves obtenues (180 nauplii / l) dans des bacs d'élevage remplis avec de l'eau de mer traitée et provenant du lagon. Cependant, chacune des écloséries présente des spécificités détaillées ci-dessous.

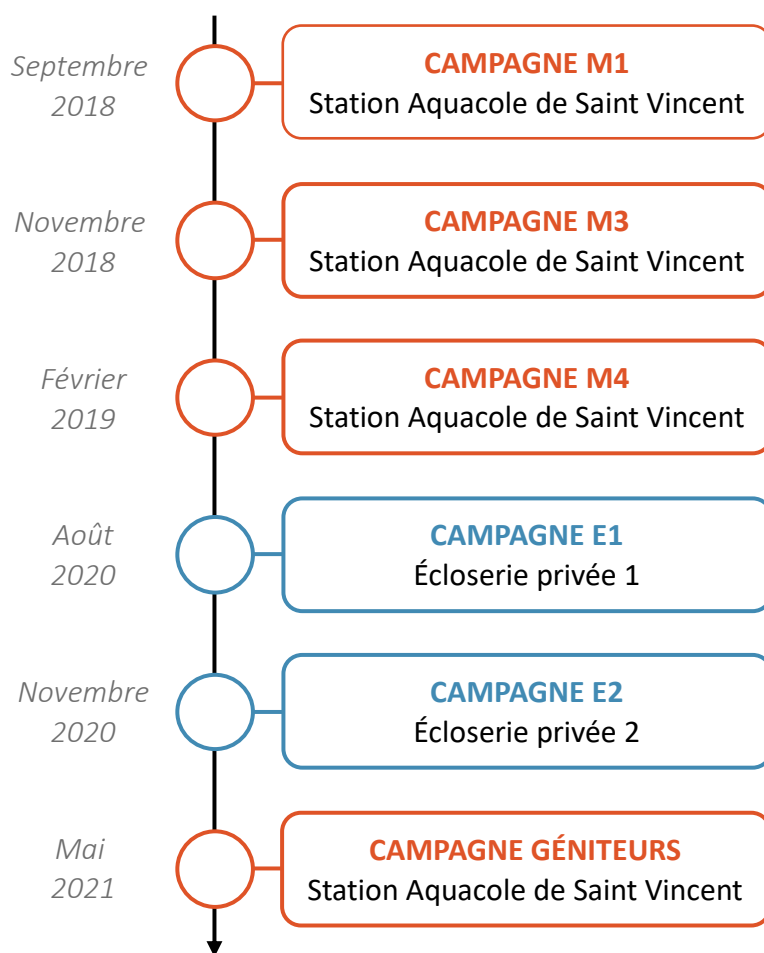


FIGURE 31 – Chronologie des campagnes de prélèvements des échantillons analysés au cours du projet de thèse.

II.1.1- Élevage larvaire à la Station Aquacole de Saint-Vincent (SASV)

II.1.1.a- Traitement de l'eau de la baie de Saint Vincent aux bacs d'élevage larvaire

À la SASV, l'eau de mer du lagon est pompée à travers une crépine, de la baie de Saint Vincent (Boulouparis) vers une réserve primaire extérieure de 800m³ (Fig. 32A). Dans cette réserve, l'eau est décantée pendant 2 à 5 jours avant de passer par un filtre à sable et un filtre à poche de 10µm. Elle est ensuite stockée dans une réserve secondaire intérieure de 50m³. Un système de recirculation de l'eau, impliquant un écumeur et des filtres à poche de 10 et 5µm, est alors appliqué pendant 3 jours. À sa sortie de la réserve secondaire, l'eau est filtrée par un filtre à poche de 1µm avant de passer par une chambre UV (ultra-violet) et un échangeur thermique où elle est chauffée à 30°C (Fig. 32B). À J0, l'eau ainsi traitée est utilisée pour remplir des bacs d'élevage larvaire de 100l où 5g.m⁻³ d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) sont ajoutés quelques heures avant l'ensemencement des larves. Pendant toute la durée du développement larvaire, de J0 à J9, aucun renouvellement d'eau n'a lieu et un bullage central ainsi qu'une photopériode contrôlée (14h jour / 10h nuit) sont appliqués. La température de l'eau est également maintenue à 30°C (±1°C) grâce à des résistances chauffantes et un aérotherme. À partir de J3, 2ppm d'érythromycine (antibiotique) sont ponctuellement ajoutés (J5, J7, J9) dans les bacs d'élevage larvaire (Fig. 33). Ce protocole est celui classiquement utilisé à la SASV. Cependant, des élevages larvaires basés sur des protocoles différents en termes de traitement de l'eau et d'ajout d'antibiotiques ont été analysés au cours de ce projet de thèse. Concernant le traitement de l'eau de remplissage des bacs d'élevage larvaire, des essais ont été réalisés en supprimant le processus de recirculation appliqué dans la réserve secondaire ainsi que le passage par la chambre UV. Ainsi, seuls le passage sur 5µm avant le remplissage des bacs d'élevage ainsi que le bullage central et l'ajout d'EDTA ont été conservés (Fig. 32B). Les échantillons récoltés au cours de ces élevages seront nommés « non traités » (NT) au moment de l'analyse des résultats (en opposition aux échantillons « traités » nommées T). Concernant l'usage de l'érythromycine, des essais sans ajout d'antibiotique et avec ajout d'antibiotique à J0, J3, J5, J7 et J9 ont été effectués (Fig. 33). Les échantillons concernés seront respectivement nommés « sans antibiotique » (SA) et « antibiotique J0 » (A0) en opposition à « antibiotique J3 » (A3) (Tab. 6).

TABLEAU 6 – Détails des élevages larvaires réalisés à la Station Aquacole de Saint Vincent et analysés au cours du projet de thèse.

CAMPAGNES	ÉLEVAGES LARVAIRES
M1 (septembre 2018)	- Eau traitée avec antibiotique à J3 (TA3)
M3 (novembre 2018)	- Eau traitée avec antibiotique à J0 (TA0)
	- Eau traitée sans antibiotique (TSA)
	- Eau non traitée avec antibiotique à J0 (NTA0)
	- Eau non traitée sans antibiotique (NTSA)
M4 (février 2019)	- Eau traitée avec antibiotique à J3 (TA3)
	- Eau traitée sans antibiotique (TSA)
	- Eau non traitée avec antibiotique à J0 (NTA0)
	- Eau non traitée avec antibiotique à J3 (NTA3)
	- Eau non traitée sans antibiotique (NTSA)

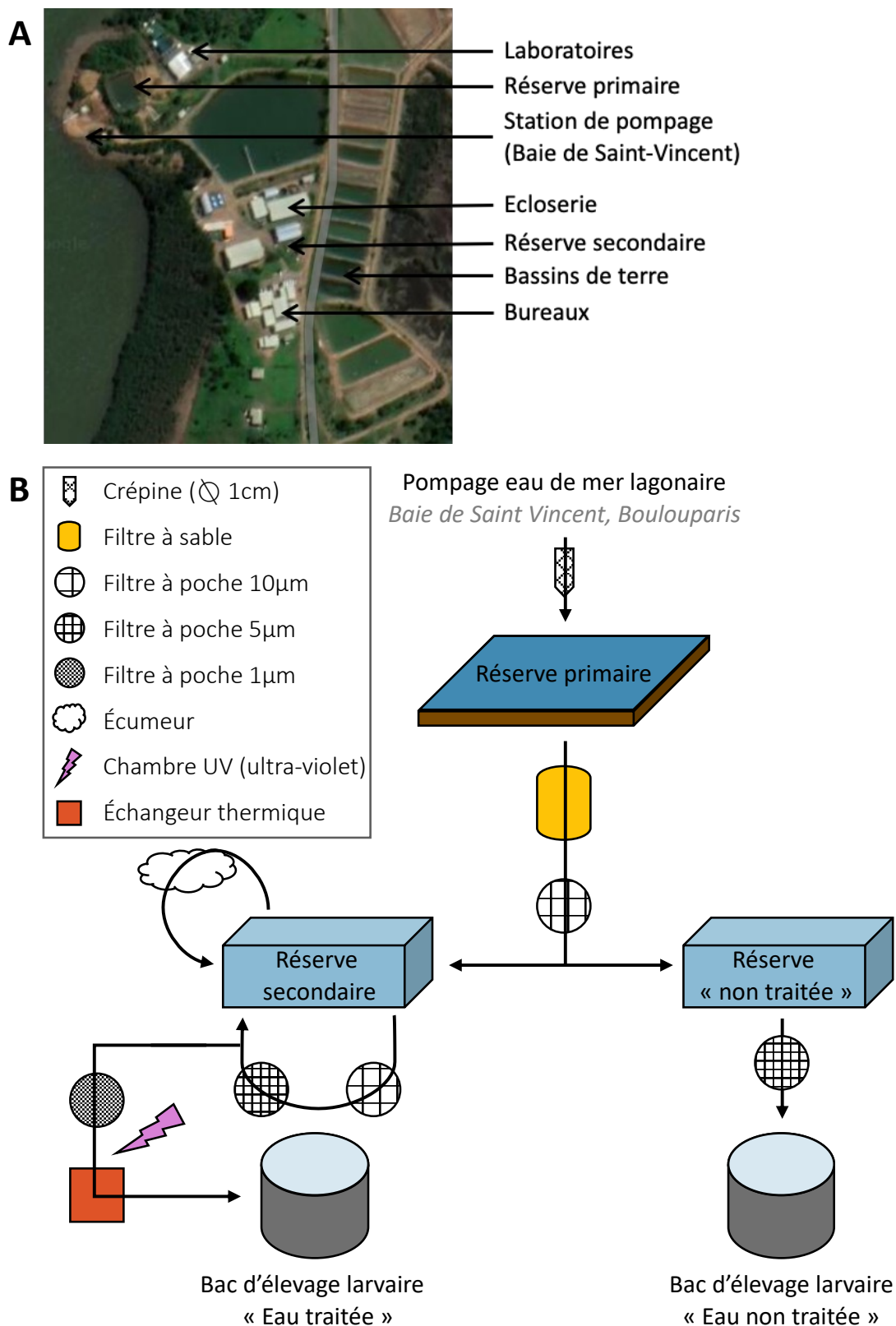


FIGURE 32 – Traitement de l'eau de remplissage des bacs d'élevage larvaire utilisé à la Station Aquacole de Saint Vincent. A) Vue aérienne de la station. B) Circuit détaillé du traitement de l'eau.

II.1.1.b- Nourrissage des larves à la SASV

Le nourrissage des larves commence à J1 avec des microalgues congelées *Tetraselmis* sp. (Fig. 33). De J2 à J4, les larves zoé 1 et 2 sont ensuite nourries avec des microparticules de 5 à 50 μ m (aliment commercial sous forme de granulés) à raison de 6 fois par jour. L'alimentation algale est également maintenue et donnée 1 fois par jour au cours de cette période. De J5 à J9, les larves zoé 3 et mysis ainsi que les premières post-larves sont nourries avec des microparticules de 50 à 100 μ m. L'alimentation algale est alors remplacée par une supplémentation en proies vivantes (80 nauplii d'*Artemia* sp. / larve / jour). Pendant tout le déroulé de l'élevage larvaire, la période de nourrissage s'étend de 6h à 20h. L'alimentation étant dépendante du stade larvaire, le protocole de nourrissage présenté est ajusté selon le développement des animaux.

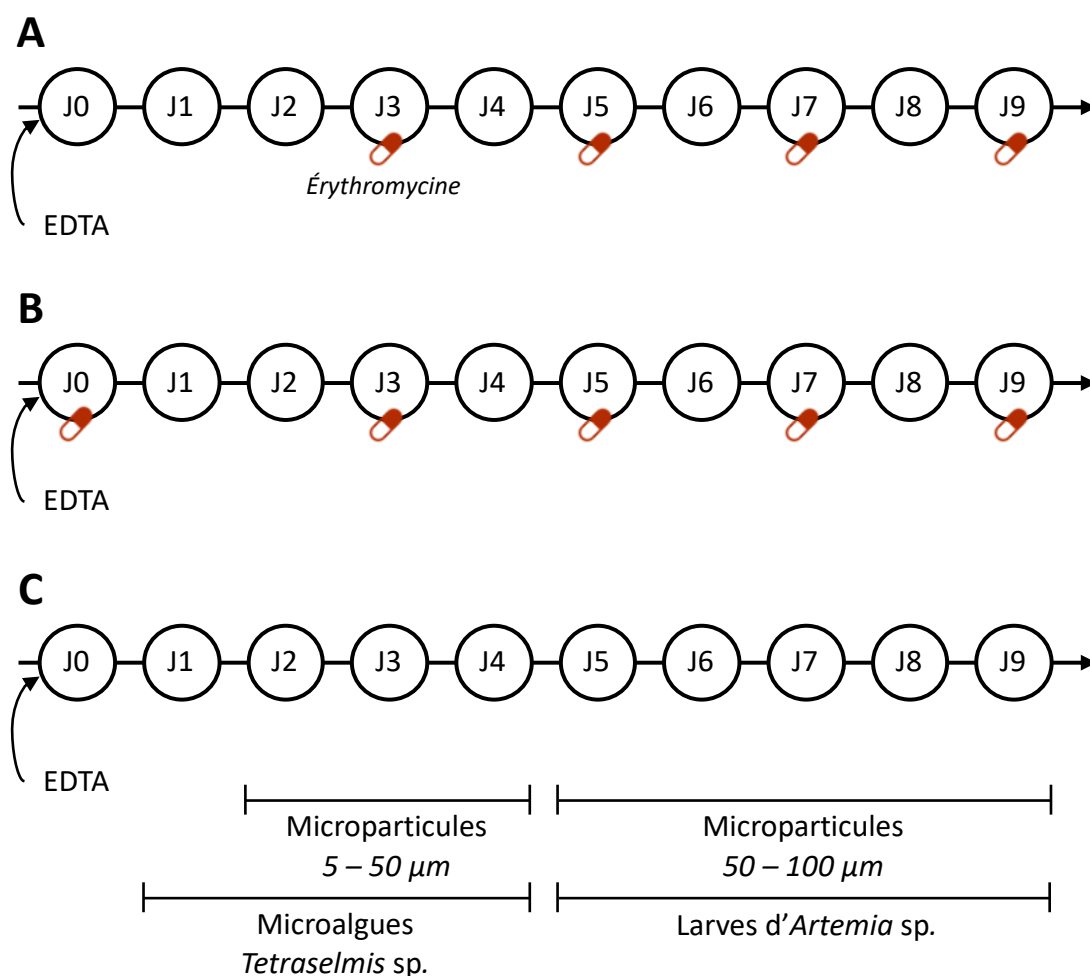


FIGURE 33 – Protocoles d'élevages larvaires réalisés à la Station Aquacole de Saint Vincent. A) Antibiotique (érythromycine) ajouté à J3, J5, J7 et J9. B) Antibiotique ajouté à J0, J3, J5, J7 et J9. C) Pas d'ajout d'antibiotique.

Tous les protocoles utilisent la même séquence alimentaire (microparticules, microalgues *Tetraselmis* sp. et larves d'*Artemia* sp.) présentée en bas de la figure, mais elle peut être adaptée selon le développement larvaire.

II.1.2- Élevage larvaire à l'écloserie privée 1

II.1.2.a- Traitement de l'eau de la baie aux bacs d'élevage larvaire

Deux élevages larvaires consécutifs (A et B) ont été analysés lors de la campagne de prélèvements (E1) réalisée à l'écloserie privée 1. Ces élevages ont été réalisés avec une même eau d'élevage mais avec des larves issues de 2 pontes successives (lots de géniteurs différents). Chaque élevage a été conduit en triplicats.

Dans cette écloserie, l'eau de mer lagonaire est pompée et filtrée par un filtre à sable avant d'être acheminée vers une réserve primaire extérieure de 180m³. Dans cette réserve, un système de dégazage est utilisé afin d'augmenter le pH de l'eau qui est également recirculée sur un écumeur. Après 3 jours, l'eau est filtrée par une succession de filtres à poche de 25, 10, 5 et 1µm, puis est stockée dans une réserve secondaire intérieure de 150m³. Un processus de recirculation de l'eau, impliquant une chambre UV et un échangeur thermique (28°C), est alors appliqué pendant environ 2 jours. À J0, l'eau ainsi traitée est utilisée pour remplir des bacs d'élevage larvaire de 10m³ où 15g.m⁻³ d'EDTA sont ajoutés quelques heures avant l'ensemencement des larves (Fig. 34). Pendant toute la durée du développement larvaire, de J0 à J9, aucun renouvellement d'eau n'a lieu et un bullage central ainsi qu'une photopériode contrôlée (14h jour / 10h nuit) sont appliqués. Grâce à des résistances chauffantes, la température est augmentée à 30°C au moment de la transition entre les stades larvaires nauplius et zoé (entre J1 et J2) puis est maintenue constante jusqu'à la fin du développement des animaux. À partir de J4, et jusqu'à J9, de l'oxytétracycline (OTC) (antibiotique) est ajoutée quotidiennement dans tous les bacs d'élevage larvaire. Une première dose de 70ppm est utilisée à J4, puis les doses sont réduites à 17ppm les jours suivants (Fig. 35).

II.1.2.b- Nourrissage des larves à l'écloserie privée 1

À J1, des microparticules de type CAR (aliment commercial sous forme de granulés) sont ajoutées dans les bacs. Ensuite, tout au long de l'élevage, 3 mélanges distincts de différents types de microparticules (taille et valeurs nutritionnelles) sont utilisés en fonction du stade de développement larvaire des animaux (stades zoé, transition entre les stades zoé et mysis, stades mysis et post-larve). Entre J4 et J5, au moment de la transition entre les stades larvaires zoé 2 et 3, des larves d'*Artemia* sp. congelées sont ajoutées à l'alimentation (Fig. 35). La nourriture est donnée toutes les 2h sur une période de nourrissage s'étendant de 4h à 22h, en alternant microparticules et larves d'*Artemia* sp..

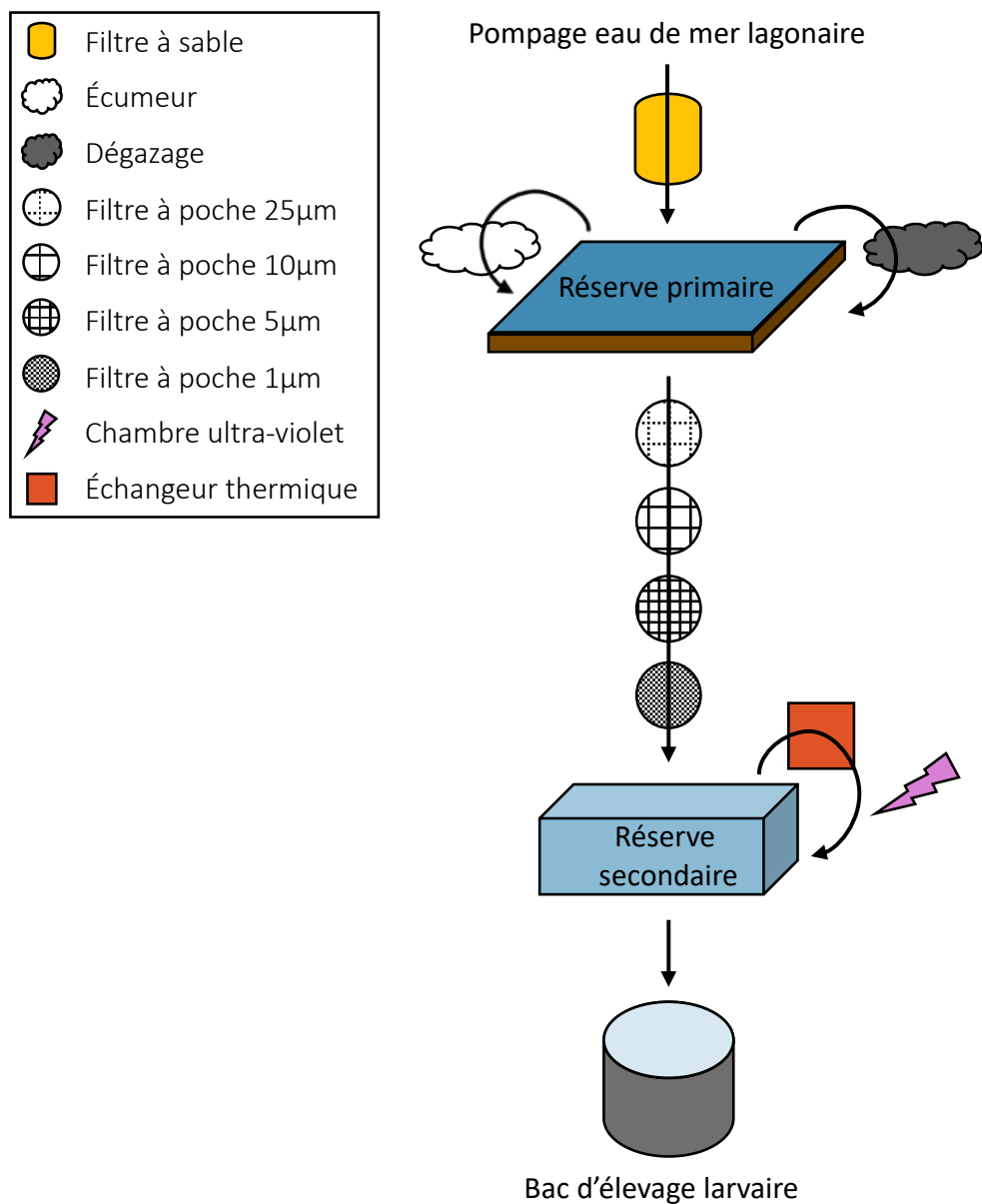


FIGURE 34 – Traitement de l'eau de remplissage des bacs d'élevage larvaire utilisé à l'écloserie privée 1.

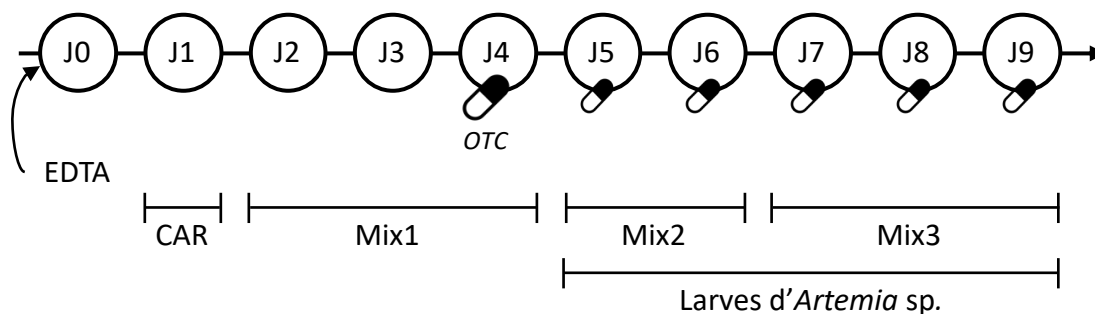


FIGURE 35 – Protocole d'élevage larvaire appliqué à l'écloserie privée 1. L'antibiotique, oxytétracycline (OTC), est ajouté de J4 à J9. Le protocole de nourrissage est composé de différents types de microparticules (CAR, Mix1, Mix2, Mix3) ainsi que de larves d'Artemia sp..

II.1.3- Élevage larvaire à l'écloserie privée 2

II.1.3.a- Traitement de l'eau de la baie aux bacs d'élevage larvaire

Deux élevages larvaires consécutifs (A et B) ont été analysés lors de la campagne de prélèvements (E2) réalisée à l'écloserie privée 2. Ces élevages ont été réalisés avec une même eau d'élevage mais avec des larves issues de 2 pontes successives (lots de géniteurs différents), comme pour l'écloserie 1. Chaque élevage a été conduit en triplicats.

Dans l'écloserie privée 2, l'eau de mer lagonaire pompée est directement acheminée vers une réserve primaire extérieure de 140m³. L'eau y est décantée pendant 3 jours avant d'être filtrée par un filtre à sable et stockée dans une réserve secondaire intérieure de 120m³. Un système de recirculation de l'eau, impliquant un filtre à poche de 5µm, une chambre UV, un écumeur et un filtre à charbon actif, est alors appliqué pendant 3 à 4 jours. À sa sortie de la réserve secondaire, l'eau est chauffée à 29°C par un échangeur thermique (Fig. 36). À J0, des bacs d'élevage larvaire de 10m³ sont remplis avec 7m³ d'eau ainsi traitée et 10g.m⁻³ d'EDTA sont ajoutés quelques heures avant l'ensemencement larvaire. Contrairement aux éclosiers précédentes, un complément d'eau de 3m³ est effectué à J3. Ce complément nécessite un nouvel ajout d'EDTA à 10g.m⁻³. Pendant toute la durée du développement larvaire, de J0 à J9, un bullage central ainsi qu'une photopériode contrôlée (14h jour / 10h nuit) sont appliqués. La température est également maintenue constante grâce à des résistances chauffantes. À partir de J3, et jusqu'à J9, de l'oxytétracycline (OTC) (antibiotique) est ajoutée quotidiennement dans tous les bacs d'élevage larvaire. Une première dose de 75ppm est utilisée à J3, puis les doses sont réduites à 13,5ppm les jours suivants (Fig. 37).

II.1.3.b- Nourrissage des larves à l'écloserie privée 2

Les larves aux stades zoé 1 et 2 (de J1 à J4) sont nourries avec des microparticules CAR (identiques à celles de l'écloserie 1) ainsi qu'avec des microalgues *Tetraselmis* sp. fraîches. Comme pour l'écloserie privée 1, différents mélanges de différents types de microparticules (taille et valeurs nutritionnelles) sont utilisés au cours de l'élevage en fonction du stade de développement des larves. Un premier mix est ainsi utilisé pour nourrir les larves de la fin du stade zoé jusqu'au stade mysis 2. Un second mix est ensuite donné aux larves jusqu'à la fin de l'élevage. Au moment de la transition zoé / mysis, des larves d'*Artemia* sp. congelées remplacent l'alimentation algale (Fig. 37). Comme pour l'écloserie 1, la nourriture est donnée toutes les 2h sur une période de nourrissage s'étendant de 5h à 23h, en alternant microparticules et microalgues fraîches ou larves d'*Artemia* sp. congelées.

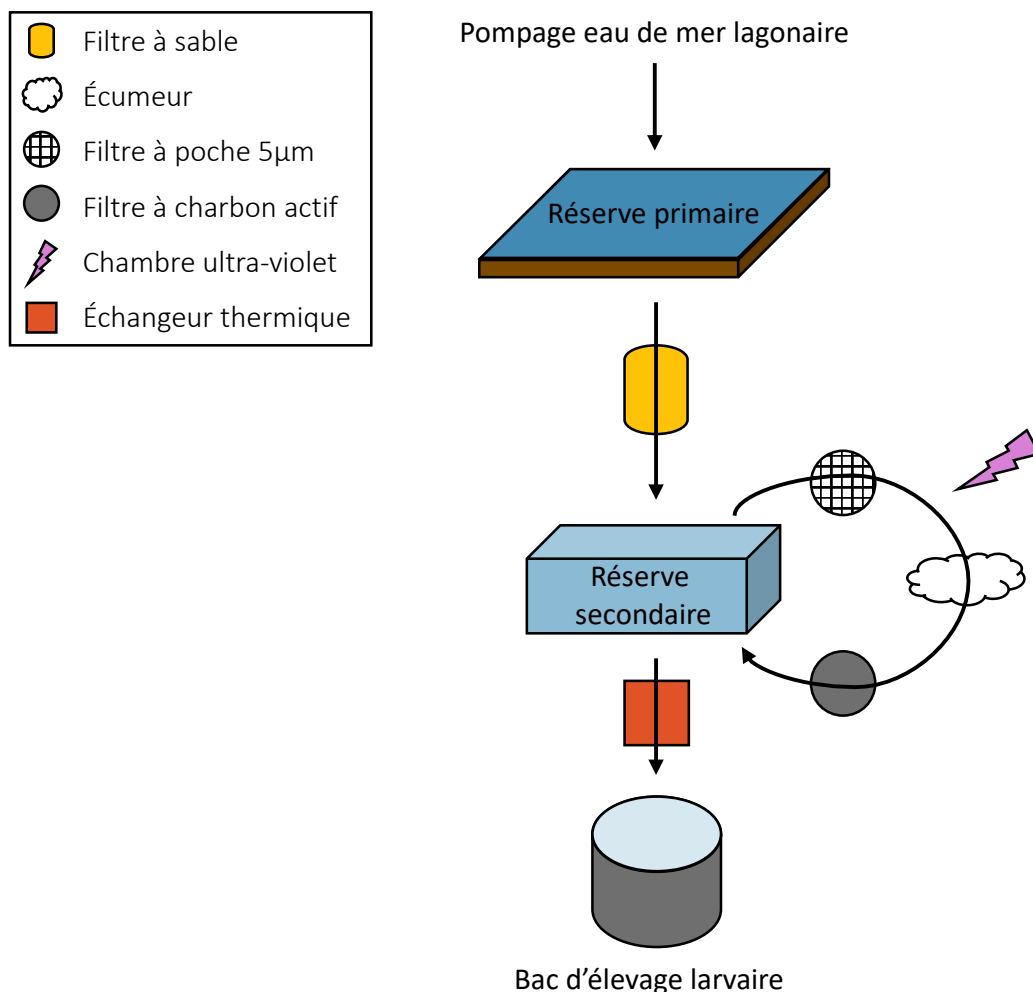


FIGURE 36 – Traitement de l'eau de remplissage des bacs d'élevage larvaire utilisé à l'écloserie privée 2.

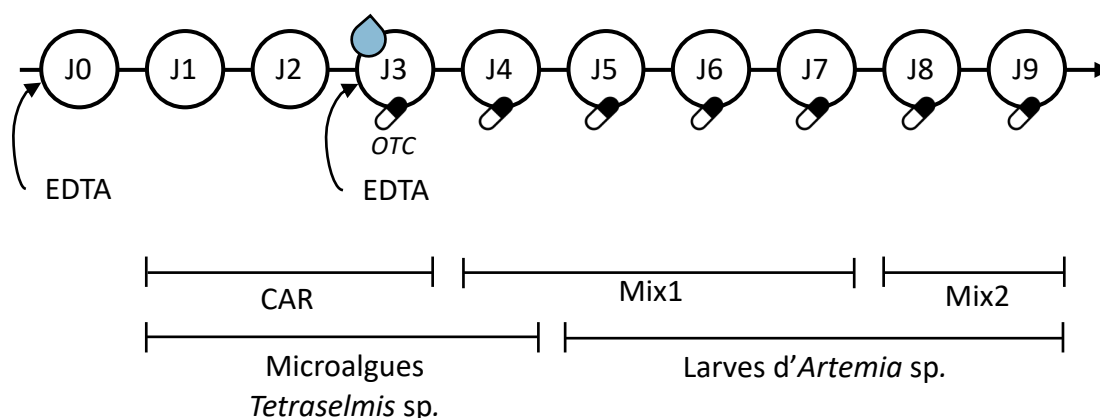


FIGURE 37 – Protocole d'élevage larvaire appliqué à l'écloserie privée 2.

À la différence de l'écloserie de la Station Aquacole de Saint Vincent et de l'écloserie privée 1, 3 m³ d'eau sont ajoutés à J3 (goutte bleue sur le schéma). L'antibiotique, oxytétracycline (OTC), est ajouté de J3 à J9. Le protocole de nourrissage est composé de différents types de microparticules (CAR, Mix1, Mix2) ainsi que de microalgues, *Tetraselmis sp.*, et de larves d'*Artemia sp.*.

II.2- Échantillonnages

Comme évoqué précédemment, les échantillons issus de plusieurs campagnes de prélèvements ont été analysés au cours de ce projet de thèse (Fig. 31, partie II.1). Les campagnes M1, M3 et M4 ont concerné des élevages larvaires réalisés à la SASV (Tab. 6, partie II.1.1.a) alors que les campagnes E1 et E2 ont été réalisées dans des élevages larvaires de 2 écloséries privées du territoire. En mai 2021, une campagne d'échantillonnage des géniteurs a également été mise en place à la SASV dans l'objectif de récolter des échantillons d'organes reproducteurs de géniteurs mâles et femelles ainsi que des œufs et des nauplii obtenus par fécondation biparentale de ces géniteurs. Dans cette partie, nous allons détailler les protocoles d'échantillonnage appliqués dans l'ensemble des élevages larvaires ainsi que ceux utilisés au cours de l'échantillonnage des géniteurs.

II.2.1- Échantillonnages en élevage larvaire

II.2.1.a- Échantillons d'eau

Pour chaque éclosérie considérée, des échantillons d'eau de mer lagunaire, d'eau de réserve primaire et d'eau de réserve secondaire ont été prélevés. Ces échantillonnages ont été effectués en amont des élevages, avant et après chaque traitement, en utilisant des pots de prélèvement en polyéthylène opaque de 2l préalablement acidifiés (acide chlorhydrique, HCl 10%) et rincés à l'eau ultra-pure. Ensuite, au cours de l'ensemble des élevages larvaires considérés, 1l d'eau sans larve a été quotidiennement prélevé dans chaque bac avant nourrissage en utilisant des pots de prélèvement (identiques à ceux ci-dessus) et des casques désinfectés avec une maille de 200µm permettant de ne pas prélever de larves (Fig. 38). Pour chaque campagne d'échantillonnage, un bac contrôle équipé d'un bullage central et contenant la même eau que les bacs d'élevage mais sans larves ni nourriture, a été considéré et échantillonné de la même manière que les bacs d'élevage larvaire. Tous les échantillons d'eau récoltés ont été filtrés sur 0,22µm (S-PAK membrane filters, Milipore) en utilisant des unités de filtration montées sur des bouteilles en verre de 1,5l préalablement autoclavées (20min, 121°C) et calcinées (6h, 450°C) (Fig. 39). Les filtres obtenus ont été conservés à -80°C dans des tubes DNase / RNase free de 2ml jusqu'aux analyses de biologie moléculaire. De l'eau filtrée a aussi été sous-échantillonnée dans des flacons stériles en polyéthylène de 40ml conservés à -20°C jusqu'aux dosages de sels nutritifs (SRP - Soluble Reactive Phosphorus, phosphates et TAN - Total Ammonia Nitrogen, ammonium). Des flacons en verre de 50ml préalablement acidifiés (HCl 10%), rincés à l'eau ultra-pure et calcinés (6h, 450°C), ont également été remplis avec le filtrat et conservés à 4°C jusqu'aux analyses de matière organique dissoute colorée (CDOM) qui ont été effectuées au plus tard dans la semaine suivant les prélèvements.

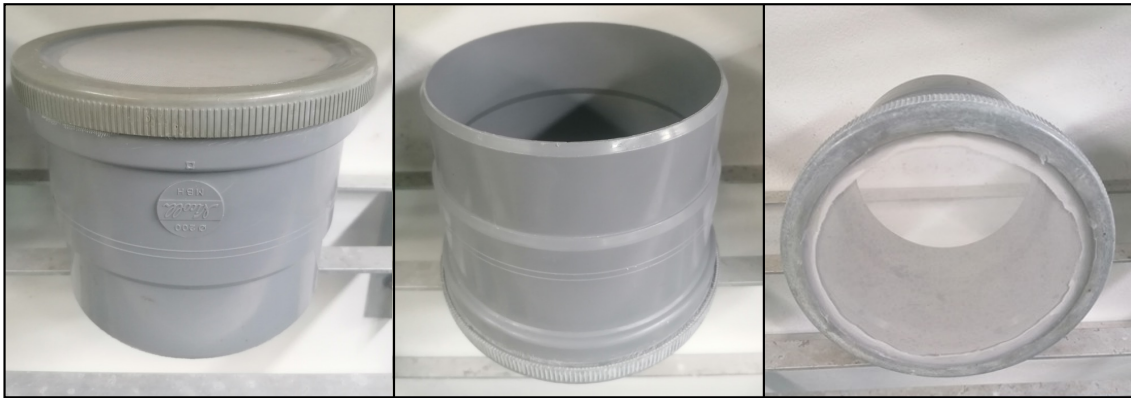


FIGURE 38 – Casque de prélèvement de l'eau.

Un casque est muni d'une maille de 200 μ m permettant de prélever de l'eau sans prélever des larves.

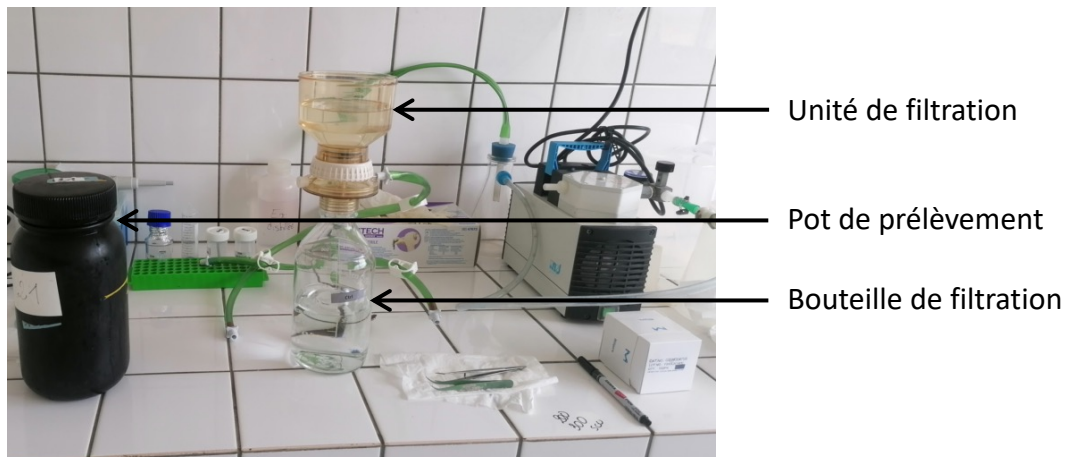


FIGURE 39 – Poste de filtration des échantillons d'eau.

II.2.1.b- Échantillons de larves

En amont de chaque élevage, le jour précédant l'ensemencement des larves dans les bacs (J-1), des échantillonnages d'œufs ont été effectués en sélectionnant au hasard plusieurs pondoirs. Ensuite, de J0 à J9, des prélèvements quotidiens de larves ont été réalisés dans chaque bac considéré. L'ensemble de ces prélèvements ont été réalisés selon le protocole suivant : environ 500 œufs ou une centaine de larves contenus dans 1l d'eau ont été concentrés sur une maille de 120 μ m, préalablement désinfectée, puis récoltés grâce à des pinces ou spatules stériles. Tous les échantillons prélevés ont été conservés à -80°C dans des tubes DNase / RNase free de 2ml jusqu'aux analyses de biologie moléculaire.

II.2.1.c- Échantillons de nourriture

Toutes les sources de nourriture de l'ensemble des élevages larvaires considérés ont été prélevées au moment de leur premier ajout dans la séquence alimentaire en utilisant des pinces ou spatules stériles. Les échantillons ont été collectés dans des tubes DNase / RNase free de 2ml et conservés à -80°C jusqu'aux analyses de biologie moléculaire.

II.2.2- Échantillonnages des géniteurs

En mai 2021, une campagne d'échantillonnages des géniteurs a été réalisée à la SASV dans le but d'étudier de potentiels phénomènes de transmission verticale des communautés procaryotiques. Pour cela, 3 familles biparentales ont été considérées en inséminant artificiellement 3 femelles avec 3 mâles. Le jour des fécondations, des pondoirs de 100l ont été remplis avec de l'eau de mer traitée selon le protocole de la SASV (II.1.1.a). Cette eau a été échantillonnée comme décrit précédemment (II.2.1.a). Après les inséminations artificielles, les femelles ont été individuellement placées à l'obscurité dans les pondoirs et les mâles ont été sacrifiés dans bain de glace puis disséqués afin de récupérer leurs organes reproducteurs. Après la ponte, les femelles ont également été sacrifiées dans un bain de glace puis disséquées. Toutes les dissections ont été réalisées avec du matériel stérile et les organes prélevés ont été rincés à l'eau de mer stérile. En parallèle, une centaine d'œufs a été prélevée dans chaque pondoir. Le jour suivant, après éclosion, une centaine de nauplii a également été récoltée pour chaque famille biparentale considérée (Fig. 40). Les échantillonnages d'œufs et de larves ont été effectués selon le protocole détaillé dans la partie précédente (II.2.1.b). L'ensemble des échantillons obtenus ont été conservés à -80°C dans des tubes DNase / RNase free de 2ml jusqu'aux analyses de biologie moléculaire.

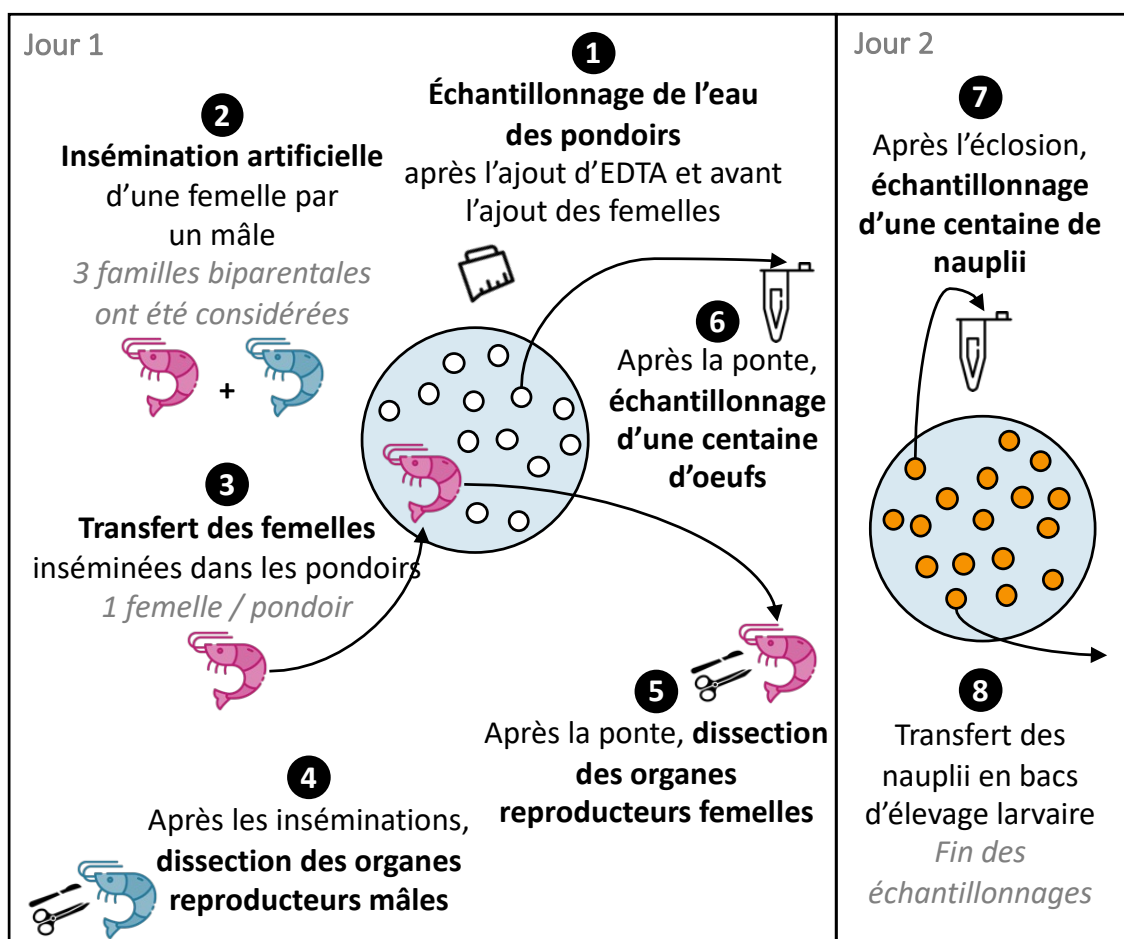


FIGURE 40 – Protocole d'échantillonnage employé lors de la campagne géniteurs en mai 2021 à la Station Aquacole de Saint Vincent.

II.3- Paramètres zootechniques

II.3.1- Taux de survie larvaire

Les taux de survie larvaire ont été quotidiennement déterminés grâce à des comptages volumétriques (moyenne de 3 comptages par bac d'élevage larvaire). Ils ont ensuite été calculés en utilisant la relation suivante :

$$\frac{n}{N} \times 100$$

avec n la moyenne des 3 comptages volumétriques effectués au jour d'élevage considéré et N le nombre de larvesensemencées dans le bac considéré à J0 (~ 180 larves / litre).

II.3.2- Indice de croissance

Des observations quotidiennes sous loupe binoculaire ont également permis de calculer l'indice de croissance larvaire pour chaque bac d'élevage considéré en utilisant la relation modifiée de Maddox & Manzi (1976) :

$$\frac{0 \times N_{ii} + 1 \times Z1 + 2 \times Z2 + 3 \times Z3 + 4 \times M1 + 5 \times M2 + 6 \times M3 + 7 \times PL}{n}$$

avec N_{ii} , $Z1$, $Z2$, $Z3$, $M1$, $M2$, $M3$ et PL , le nombre de larves observées aux stades nauplii, zoé 1, zoé 2, zoé 3, mysis 1, mysis 2, mysis 3 et post-larve, et n le nombre total de larves observées.

II.4- Paramètres de qualité physico-chimique de l'eau

II.4.1- Température, pH et salinité

Pour chaque échantillon d'eau prélevé dans les écloséries privées, les données de température, pH et salinité ont quotidiennement été mesurées en utilisant une sonde multiparamètre pH/Cond 3320 (Mettler Toledo).

II.4.2- Paramètres de matière organique dissoute colorée (CDOM)

Les paramètres CDOM ont été mesurés dans une cuve en quartz de 10cm avec un spectrophotomètre (Shimadzu© UV-1800) connecté au logiciel UV Probe (v2.61). Une lecture spectrale s'étendant de 200 à 700nm avec un pas de 1nm a été faite après avoir effectué un auto-zéro avec de l'eau ultra-pure. Au total, quatre paramètres CDOM ont été considérés :

- les coefficients d'absorption
- les pentes spectrales $S_{275-295}$ et $S_{350-400}$
- le ratio des pentes spectrales (Slope Ratio, SR)
- le coefficient d'absorption à 325nm.

En premier lieu, les coefficients d'absorption ont été calculés de la manière suivante :

$$a\lambda = \frac{2,303 \times A\lambda}{L}$$

avec 2,303 le facteur de transformation des logarithmes décimaux en logarithmes népériens, $A\lambda$ l'absorbance mesurée à la longueur d'onde λ (de 200 à 700nm) et L la longueur du trajet optique (10cm).

Ensuite, les pentes des courbes d'évolution de ces coefficients d'absorption de 275 à 295nm ($S_{275-295}$) et de 350 à 400nm ($S_{350-400}$) ont été déterminées. Le ratio entre ces 2 pentes, correspondant au ratio entre les molécules de petits et de hauts poids moléculaires, a ainsi été calculé :

$$SR = \frac{S_{275-295}}{S_{350-400}}$$

Enfin, le coefficient d'absorption à 325nm a également été déterminé car il est considéré comme un indicateur de la concentration relative en CDOM (Sadeghi-Nassaj et al. 2018).

II.4.3- Dosage des sels nutritifs

Deux types de dosages des sels nutritifs ont été réalisés à partir des échantillons d'eau prélevés : TAN (total ammonium nitrogen, $\text{NH}_3\text{-N}$ et NH_4^+) et SRP (soluble reactive phosphorus, PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} et H_2PO_4^-). Pour effectuer ces analyses, les échantillons ont été décongelés à température ambiante et des flacons en verre de 50ml préalablement acidifiés (HCl 10%), rincés à l'eau ultra-pure et mis à sécher à l'air libre ont été utilisés. Pour chaque dosage, une gamme étalon de concentration connue a été réalisée en amont des analyses (gammes allant de 0 à 40 μM de NH_4^+ pour les dosages TAN et de 0 à 10 μM de PO_4^{3-} pour les dosages SRP).

II.4.3.a- Dosage des TAN (Total Ammonium Nitrogen, $\text{NH}_3\text{-N}$ et NH_4^+)

Les dosages TAN ont été effectués selon la méthode fluorimétrique de Holmes et al. (Holmes et al. 1999) après préparation du réactif (Tab. 7). Après ajout de 10ml de ce réactif à 40ml de chaque échantillon, la réaction a été incubée à l'obscurité pendant 6h à température ambiante. Après lecture au spectrofluoromètre (Shimadzu©, RF-6000) avec une cuve en méthacrylate de 1cm (longueur d'onde d'excitation = 365nm, longueur d'onde d'émission = 425nm), les concentrations en ammonium ont été calculées avec la relation suivante :

$$[\text{TAN}] = \frac{A}{a}$$

avec A la valeur d'absorbance de l'échantillon après soustraction de la valeur d'absorbance du blanc de réaction (réactif ajouté à de l'eau de mer artificielle NaCl à 600mM, NaHCO_3 à 2,4mM, eau ultra-pure) et a la pente de la gamme étalon.

II.4.3.b- Dosage des SRP (Soluble Reactive Phosphorus, PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} et H_2PO_4^-)

Les dosages SRP ont été effectués d'après la méthode colorimétrique d'Aminot & Kérouel (2004) selon Murphy & Riley (1962). Après préparation des 2 réactifs d'intérêt (Tab. 7), 2ml de chacun de ces réactifs ont successivement été ajoutés à 40ml de chaque échantillon, et la réaction a eu lieu à l'obscurité pendant 7min. Après lecture au spectrophotomètre UV (Shimadzu© UV-1800) avec une cuve en verre de 10cm, les concentrations en phosphate ont été calculées avec la relation suivante :

$$[\text{SRP}] = \frac{A}{a}$$

avec A la valeur d'absorbance de l'échantillon après soustraction de la valeur d'absorbance du blanc de réaction (réactifs ajoutés à de l'eau de mer artificielle NaCl à 600mM, NaHCO₃ à 2,4mM) et a la pente de la gamme étalon.

TABLEAU 7 – Composition des réactifs des dosages TAN (Total Ammonium Nitrogen) et SRP (Soluble Reactive Phosphorus).

RÉACTIF TAN	<ul style="list-style-type: none">- Borax 3,90.103mM- Sulfite de sodium 3,11.10¹mM- Orthophtalaldéhyde 1,46.10²mM
RÉACTIF SRP 1	<ul style="list-style-type: none">- Acide ascorbique 2,84.10²mM- Acide sulfurique 2,9.10⁻³mM
RÉACTIF SRP 2	<ul style="list-style-type: none">- Heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté 2,10.10¹mM- Oxytartrate d'antimoine de potassium 0,18.10¹mM- Acide sulfurique 2,9.10⁻³mM

II.5- Méthodes de biologie moléculaire et évaluation de la diversité microbienne active

II.5.1- Extractions ARNs, rétrotranscriptions ADNc et séquençage

Les extractions d'ARNs ont été réalisées en utilisant le RNeasy PowerWater kit (Qiagen) pour les échantillons d'eau et le RNeasy minikit (Qiagen) pour les autres échantillons (œufs, larves et nourriture). Les ARNs ainsi extraits ont ensuite été rétro-transcrits en ADNc (ADN complémentaire) en ajoutant 200ng d'ARNs à un réactif (tampon 5X, dNTP 10mM, random hexamers 50µM, « reverse »-transcriptase M-MLV (PROMEGA) 200u.µl⁻¹, eau RNase / DNase free). La réaction de rétro-transcription a été réalisée dans un thermocycleur pendant 10 minutes à 25°C, 2h à 42°C et 5min à 85°C. Pour les campagnes de prélèvements réalisées avant mars 2020, les ADNc ainsi obtenus ont été envoyés pour séquençage. Cependant, en raison de la crise sanitaire de la COVID-19, les temps d'envoi des échantillons au séquenceur ont été allongés (plus de 3 semaines). En conséquence, pour les échantillons récoltés après mars 2020, une seconde étape de rétro-transcription utilisant le Second Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFisher) a été ajoutée afin d'obtenir des ADNc double brin plus stables. Quelle que soit la méthode utilisée précédemment, les échantillons ont été envoyés à la plateforme de séquençage MrDNA (Shallowater, TX, USA) dans l'objectif d'amplifier et de séquencer la région V4 du gène codant pour l'ARNr 16S en utilisant les amorces 515F/806R (Caporaso et al. 2011). Au total, 3 séquençages Illumina HiSeq 2x150pb « paired-end » ont été réalisés en :

- février 2019 : campagnes M1 et M3 (profondeur de séquençage = 20k)
- novembre 2019 : campagnes M3 et M4 (profondeur de séquençage = 50k)
- juillet 2021 : campagnes écloséries privées et géniteurs (profondeur de séquençage = 50k, la notion de profondeur de séquençage sera abordée dans le chapitre III, partie III.4.1).

II.5.2- Traitement des données de séquençage

À l'heure actuelle, de nombreux outils permettent de traiter les données de séquençage dans l'objectif de déterminer la diversité microbienne associée aux échantillons. La première étape de ce projet de thèse a donc été de choisir l'outil le plus adapté. Ce travail sera présenté dans le chapitre III de ce manuscrit. Cependant, dans cette partie, nous allons brièvement détailler la méthode sélectionnée pour analyser l'ensemble des données de séquençage récoltées.

Les séquences obtenues ont d'abord été démultiplexées en utilisant l'outil fastqSplitter disponible sur le site internet de la plateforme de séquençage MrDNA (<https://www.mrdnalab.com/mrdnafreesoftware/fastq-splitter.html>). Le package DADA2 (Callahan et al. 2016) implémenté dans le logiciel RStudio (RStudio Team, 2020) a ensuite été utilisé. Les séquences démultiplexées ont été filtrées en utilisant la fonction « filterAndTrim » avec une erreur attendue fixée à 2. Un modèle d'erreur a ensuite été établi à partir de ces séquences avec la fonction « learnErrors ». La fonction « dada » a permis l'inférence des ASVs (Amplicon Sequence Variants définis dans le chapitre III, partie III.3.3.a). Une étape de suppression des chimères basée sur la méthode « consensus » a été réalisée en utilisant la fonction « removeBimeraDenovo ». La taxonomie des séquences finales a été assignée grâce à la fonction « assignTaxonomy » et la base de données SILVA 138 (Quast et al. 2013). Enfin, les données obtenues ont été normalisées avec la méthode CPM (Count Per Million définie dans le chapitre III, partie III.4.2.b) en utilisant la fonction « normalize » du package phyloseq (McMurdie & Holmes 2013) dans RStudio. L'ensemble de ces étapes seront détaillées dans le chapitre III (parties III.3.2 et III.4.2.b).

II.5.3- Analyses de la diversité microbienne

Les indices de diversité ont été calculés en utilisant la fonction « plot_richness » implémentée dans le package phyloseq (McMurdie & Holmes 2013) sous RStudio. Au total, 4 indices de diversité ont été considérés : Chao1, ACE (Abundance-based Coverage Estimator), Shannon et inverse Simpson (Tab. 8).

En utilisant la méthode de Ward, le package vegan (Oksanen et al. 2020) a permis la construction de dendrogrammes à partir de matrices de distance de Bray-Curtis. Les analyses en coordonnées principales (PCoA) ont été réalisées avec les fonctions « ordinate » et « plot_ordination » du package phyloseq. Les analyses discriminantes (LDA) avec effet de taille (LEfSe : Linear discriminant analysis with Effect Size) et les corrélogrammes ont été construits en utilisant respectivement le package microbiomeMarker (Cao, 2020) et le package microeco (Liu et al. 2021). L'outil proposé par le site internet jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) a permis de mettre au point les diagrammes de Venn. Enfin, des tests statistiques non-paramétriques de Kruskal-Wallis et des tests post-hoc de Wilcoxon ont été effectués en utilisant le package rstatix. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque la p -value était inférieure à 0,05.

TABLEAU 8 – Présentation des indices de diversité utilisés au cours de cette thèse (Traduit de Kim et al. 2017).

Les termes ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) et OTUs (*Operationnal Taxonomic Units*) sont détaillés dans le chapitre III (partie III.3.3.a).

INDICES DE DIVERSITÉ	DESCRIPTION	CALCUL	RÉFÉRENCE
Chao1	Estimation de la richesse (nombre d'ASVs ou d'OTUs présents dans un échantillon)	$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1(F_1 - 1)}{2(F_2 + 1)}$ <p>F_1 et F_2 : nombre de singletons (ASVs ou OTUs avec une abondance égale à 1) et de doubletons (ASVs ou OTUs avec une abondance supérieure à 1) S_{obs} : nombre d'ASVs ou d'OTUs observés</p>	Chao 1984
ACE (Abundance-based Coverage Estimator)	Estimation de la richesse	$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{F_A}{C_{ACE}} V_{ACE}^2$ <p>S_{abund} et S_{rare} : nombre d'ASVs ou d'OTUs abondants et rares C_{ACE} : « sample abundance coverage estimator » F_1 : nombre de singletons V_{ACE}^2 : coefficient de variation estimé (Kim et al. 2017)</p>	Chao & Lee 1992 Chao & Yang 1993
Shannon	Estimation de la richesse et de l'équitabilité (uniformité des ASVs ou des OTUs au sein d'une communauté)	$H = - \sum_{i=1}^S (p_i \ln p_i)$ <p>S : nombre d'ASVs ou d'OTUs p_i : abondance relative de l'ASV ou de l'OTU i dans un échantillon</p>	Lemos et al. 2011 Magurran 2004
Inverse Simpson	Estimation de la richesse et de l'équitabilité	$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^S p_i^2}$ <p>S : nombre d'ASVs ou d'OTUs p_i : abondance relative de l'ASV ou de l'OTU i dans un échantillon</p>	Simpson 1949 Lemos et al. 2011

II.6- Méta-analyse

Pour chaque condition d'élevage considérée, une table d'ASVs a été construite en utilisant le package DADA2 (Callahan et al. 2016) selon le protocole décrit précédemment (chap. II, partie II.5.2). Toutes les tables obtenues ont été fusionnées avec la fonction merge sous Rstudio (RStudio Team, 2020), en considérant les ASVs spécifiques et communs à chaque table. Dans l'objectif de regrouper des séquences génétiquement et écologiquement similaires, la table globale produite a été traitée avec l'outil dbOTU3, disponible sous qiime (Olesen et al. 2017). Les séquences finalement obtenues ont été taxonomiquement assignées en utilisant la base de données SILVA 138 spécifique de la région V4 (Quast et al. 2013). Un arbre phylogénétique a été construit avec qiime en utilisant la méthode fasttree (Price et al. 2009). Une table d'ASVs finale contenant 14819 ASVs et 833 échantillons (eau d'élevage, larves, eau contrôle, œufs, eau de réserve, eau de remplissage provenant du lagon, nourriture) a ainsi été produite.

Dans un premier temps, seules les données d'élevage (eau d'élevage et larves de J0 à J9) ont été considérées. Après normalisation par la méthode DESeq2 (Anders & Huber 2010) ou par la méthode CPM (chap. III, parties III.4.2.b), des NMDS (non-metric dimensional scaling) basées sur différentes matrices de distances (Bray-Curtis, Jaccard, UniFrac et weighted UniFrac) (Fig. 41) ont été construites avec les fonctions « ordinate » et « plot_ordination » du package phyloseq (McMurdie & Holmes 2013). Les cores microbiens basés sur la présence / absence des ASVs et associés à l'ensemble des échantillons d'eau d'élevage ou de larves ont été mis en évidence puis comparés par un diagramme de Venn construit avec l'outil jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>). Les ASVs différentiellement abondants par stade larvaire en fonction de l'état de santé des élevages

ont ensuite été mis en évidence à l'aide de l'outil ANCOM-BC (Mandal et al. 2015; Lin & Peddada 2020) disponible dans le package ANCOMBC sous RStudio. Des graphiques construits avec le package UpSetR (Conway et al. 2017) ont ensuite permis de mettre en évidence des ASVs partagés ou spécifiques entre les larves en bonne ou en mauvaise santé et les eaux d'élevage hébergeant ces larves en bonne ou mauvaise santé. Les abondances relatives des ASVs mis en évidence par les graphiques UpSetR ont été calculées en utilisant le package microbiomeutilities (Lahti & Shetty 2020).

Dans un second temps, grâce à des heatmaps construites avec le package ggplot2 (Wickham, 2016), un suivi de l'ensemble des ASVs mis en évidence a été effectué en considérant les intrants (eau de remplissage provenant du lagon, eau de réserve, œufs, microalgues, microparticules et larves d'*Artemia* sp.) de tous les élevages.

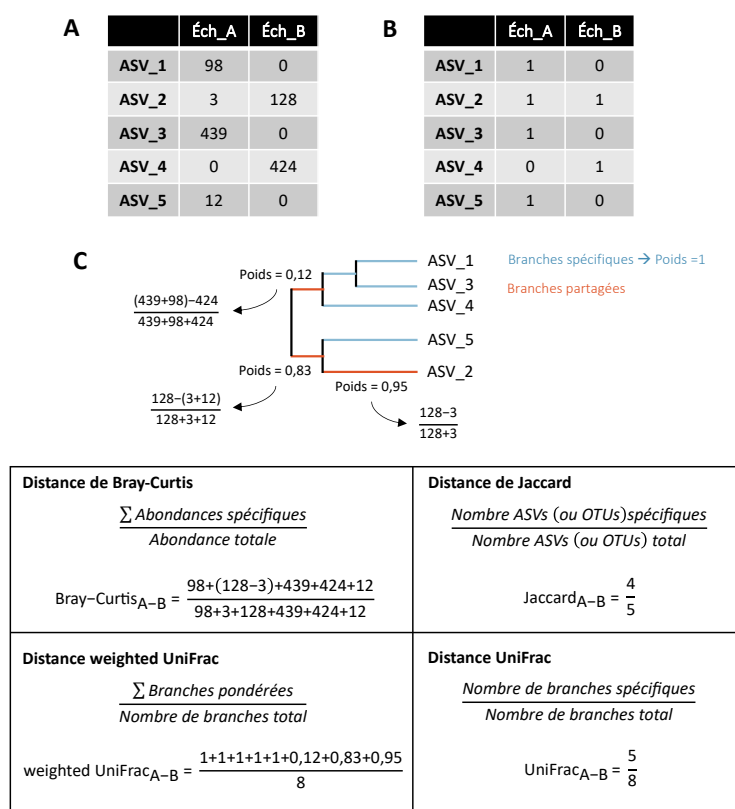


FIGURE 41 – Méthodes de calcul des distances de Bray-Curtis, Jaccard, weighted UniFrac et UniFrac entre les échantillons A et B (Éch A et Éch B). Les distances de Bray-Curtis et weighted UniFrac se basent sur A) l'abondance des ASVs (Amplicon Sequence Variant, notion détaillée dans le chapitre III, partie III.3.3.a) (ou des OTUs, Operational Taxonomic Unit, notion détaillée dans le chapitre III, partie III.3.3.a). Les distances de Jaccard et UniFrac se basent sur la B) présence/absence des ASVs (ou des OTUs). Les distances weighted UniFrac et UniFrac se basent également sur C) l'arbre phylogénétique associé aux ASVs (ou aux OTUs).

La distance weighted UniFrac utilise le poids des branches. Toutes les branches spécifiques (ASV ou OTU uniquement identifié dans un échantillon) ont un poids égal à 1. Lorsque les branches sont partagées (ASVs ou OTUs identifiés dans les 2 échantillons), le poids est calculé selon l'abondance spécifique des ASVs (ou des OTUs) et leur abondance totale. Pour toutes les distances, plus la valeur calculée est faible, plus les compositions microbiennes des échantillons associés sont proches. Les méthodes basées sur l'abondance des ASVs (ou OTUs) (Bray-Curtis et weighted UniFrac) sont sensibles à la méthode de normalisation choisie. Les méthodes basées sur la présence / absence des ASVs (ou OTUs) (Jaccard et UniFrac) mènent souvent à des interprétations biologiques similaires.

CHAPITRE III

**De l'échantillon aux analyses de
diversité : choix d'une méthode
optimale**

III- Chapitre III – De l'échantillon aux analyses de diversité : choix d'une méthode optimale

La première partie de ce travail de thèse a consisté à choisir une méthode d'analyse permettant de passer des échantillons récoltés aux analyses de diversité microbienne qui seront présentées dans les chapitres IV à VII. En effet, l'essor technologique et bioinformatique de ces dernières années a conduit à une multiplication des outils disponibles concernant, non seulement, les méthodes d'extraction d'ADN et d'ARN, mais aussi de séquençage de ces acides nucléiques. Diverses méthodes d'analyse et de normalisation des données de séquençage ont également vu le jour. Un premier travail de recherche a donc consisté à comprendre les méthodes à disposition pour choisir la démarche la plus optimale. Dans ce chapitre, nous expliquerons ainsi le choix d'étudier les communautés procaryotiques actives, puis nous aborderons un bref historique des méthodes de séquençage qui ont mené à l'essor du métabarcoding. La technologie de séquençage Illumina, utilisée au cours de ce projet de thèse, sera également détaillée. Enfin, nous présenterons les principales méthodes disponibles pour analyser les résultats de séquençage, mais aussi pour normaliser les données finalement obtenues. À chaque étape, les choix faits au cours de cette thèse seront présentés.

III.1- ARN et ADNc pour étudier les communautés microbiennes actives

Au cours de cette thèse, les ARNs totaux de l'ensemble des échantillons ont été extraits puis rétro-transcrits en ADNc dans l'objectif d'étudier les communautés procaryotiques actives. En effet, en conséquence de sa courte durée de vie, l'ARN est considéré comme un meilleur outil pour détecter les populations microbiennes récentes ou pour mettre en évidence des assemblages de microorganismes vivants (Cristescu 2019). Pour ces raisons, l'analyse des procaryotes actifs a été recommandée dans le cadre d'expérimentations consacrées à la surveillance biologique des communautés microbiennes (Yates et al. 2021). Il existe différents types d'ARNs impliqués dans la synthèse et la régulation protéiques : l'ARN messager (ARNm), l'ARN de transfert (ARNt) et l'ARN ribosomique (ARNr). L'ARNm est transcrit à partir de l'ADN puis traduit en protéines sous l'action des ARNt et des ARNr. Chez les procaryotes, il existe d'autres ARNs non codant et impliqués dans la régulation de l'expression protéique, appelés small RNA (sRNA) (Brosnan & Voinnet 2009).

III.2- Le séquençage

Dans son sens littéral, le séquençage consiste à déterminer l'ordre linéaire des composants d'une macromolécule. Il englobe ainsi aussi bien la détermination de l'ordre des acides aminés au sein d'une protéine que des nucléotides d'un acide nucléique.

III.2.1- Historique du séquençage

Les prémices du séquençage des acides nucléiques ont débuté en 1965 avec Robert Holley qui parvient à déterminer la séquence de l'ARNt^{Ala} (alanine) d'une souche de levure en utilisant une combinaison d'enzymes et de ribonucléases. En 1972, grâce à une succession de réactions enzymatiques couplées à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, Walter

Fiers isole chaque nucléotide d'un gène et déduit ainsi sa séquence. Le tournant majeur du séquençage a lieu en 1977 lorsque Frederick Sanger propose une nouvelle méthode basée sur le radiomarquage de nucléotides modifiés (Fig. 42 et Annexe 1). Sa méthode est ensuite améliorée et automatisée par Leroy Hood et Michael Hunkapiller qui utilisent des di-désoxyribonucléotides fluoromarkés pour permettre une analyse informatique du signal lumineux (Annexe 1). En 1996, une nouvelle méthode de séquençage appelée pyroséquençage est développée en se basant sur l'émission de pyrophosphate lors de la synthèse d'un brin d'ADN (Annexe 2). Elle sera automatisée en 2005 par le système Roche-454 et permet alors le séquençage simultané de plusieurs molécules d'ADN. Cette étape clé marque ainsi le début du séquençage haut débit (ou NGS pour Next Generation Sequencing) et de la 2^{ème} génération de séquençage (Fig. 42 et Tab. 9). Cette dernière comprend aussi les séquençages Illumina et IonTorrent (Annexe 3) qui ont respectivement vu le jour en 2007 et 2010. Depuis 2010, de nouvelles technologies de séquençage haut débit dites de 3^{ème} génération ont été développées (PacBio ou Nanopore par exemple). La 2^{ème} génération de séquençage englobe les technologies nécessitant une étape d'amplification des molécules d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction). Elle s'oppose à la 3^{ème} génération qui comprend les technologies permettant le séquençage d'une seule molécule d'ADN (Desai & Jere 2012). Dans le cadre de cette thèse, nous ne détaillerons que l'une des technologies de séquençage de 2^{ème} génération, le séquençage Illumina que nous avons utilisé.

III.2.2- Le séquençage Illumina

Le séquençage Illumina est un processus de séquençage par synthèse qui consiste tout d'abord à liguer des adaptateurs à chaque extrémité de la séquence nucléotidique d'intérêt. Ces adaptateurs sont complémentaires d'oligonucléotides fixés sur une « flowcell » et permettent ainsi l'hybridation de la molécule d'intérêt sur cette dernière. Après hybridation, le brin complémentaire de la séquence d'intérêt est synthétisé et les séquences non fixées sur la flowcell sont lavées. Les brins d'ADN sont ensuite amplifiés par une succession d'amplifications par pont conduisant à la formation de clusters de séquence nucléotidiques identiques sur la flowcell. Les brins anti-sens («reverse») sont alors clivés et éliminés. Le brin sens («forward») est séquencé par l'ajout de dNTP fluoromarkés dont le signal lumineux est enregistré à chaque incorporation. Une fois le brin sens séquencé, les brins non fixés à la flowcell sont éliminés et une nouvelle amplification par pont a lieu. Les brins sens sont clivés et lavés afin de permettre le séquençage du brin anti-sens (Fig. 43). Plusieurs séquençages Illumina HiSeq (2x150pb) (Tab. 9) ont été réalisés pour analyser les données récoltées dans le cadre de ce projet.

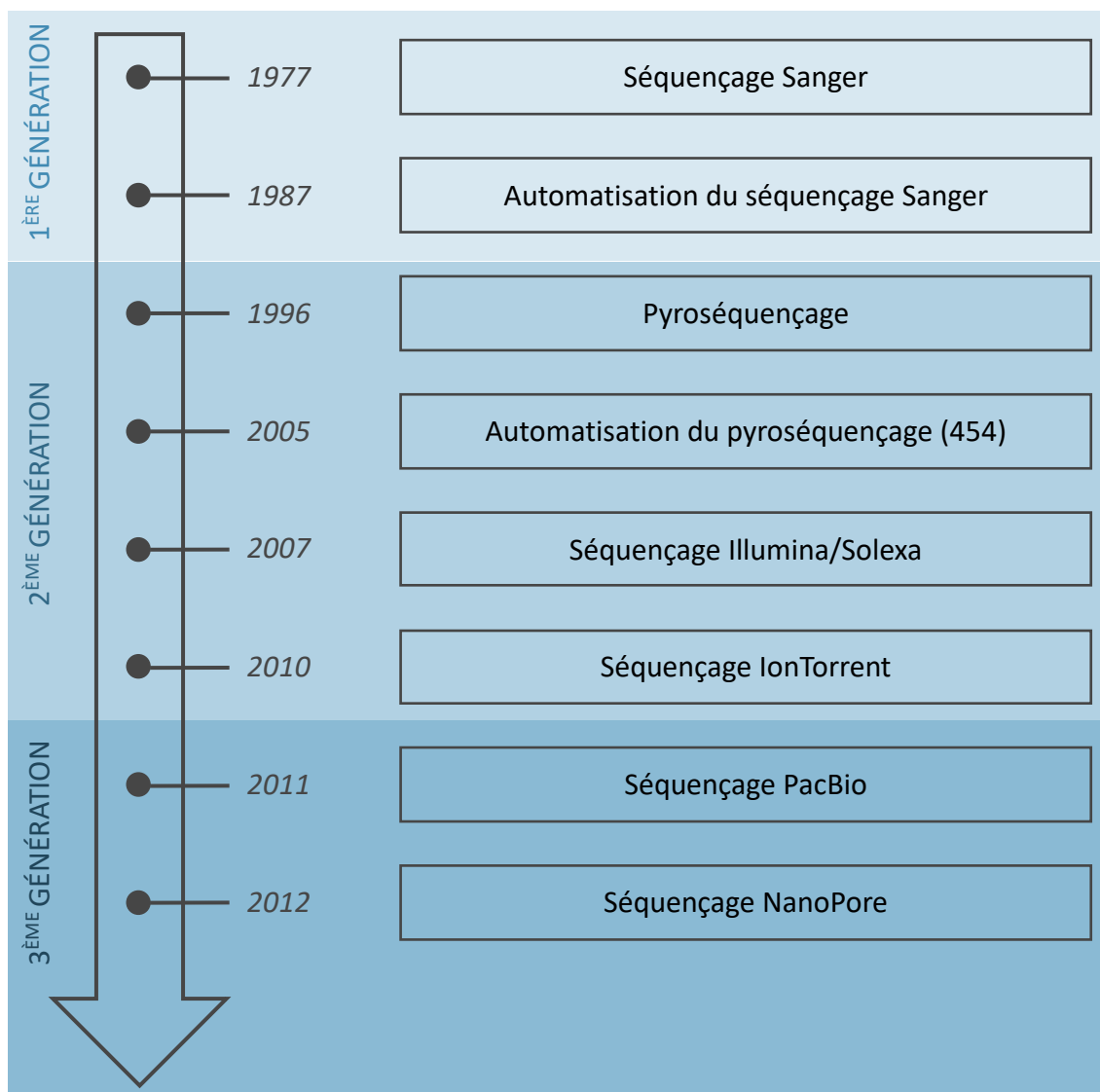


FIGURE 42 – Historique du séquençage.

TABLEAU 9 – Comparaison des technologies de séquençage de 2^{ème} génération.

Les technologies Roche-454 et IonTorrent sont détaillées en annexe.

	Longueur des séquences (pb)	Nombre maximum de séquences / séquençage	Nombre maximum d'échantillons / séquençage	Temps
Roche-454	700 à 800	1M	384	24h
IonTorrent	200 à 400	400 000 à 5,5M	96	2 à 7h
Illumina MiSeq	250 à 600 (2 x 250 ou 2 x 300)	25M	384	4 à 55h
Illumina HiSeq	50 à 500 (2 x 50 à 2 x 250)	3.10 ⁹	384	29h à 11j

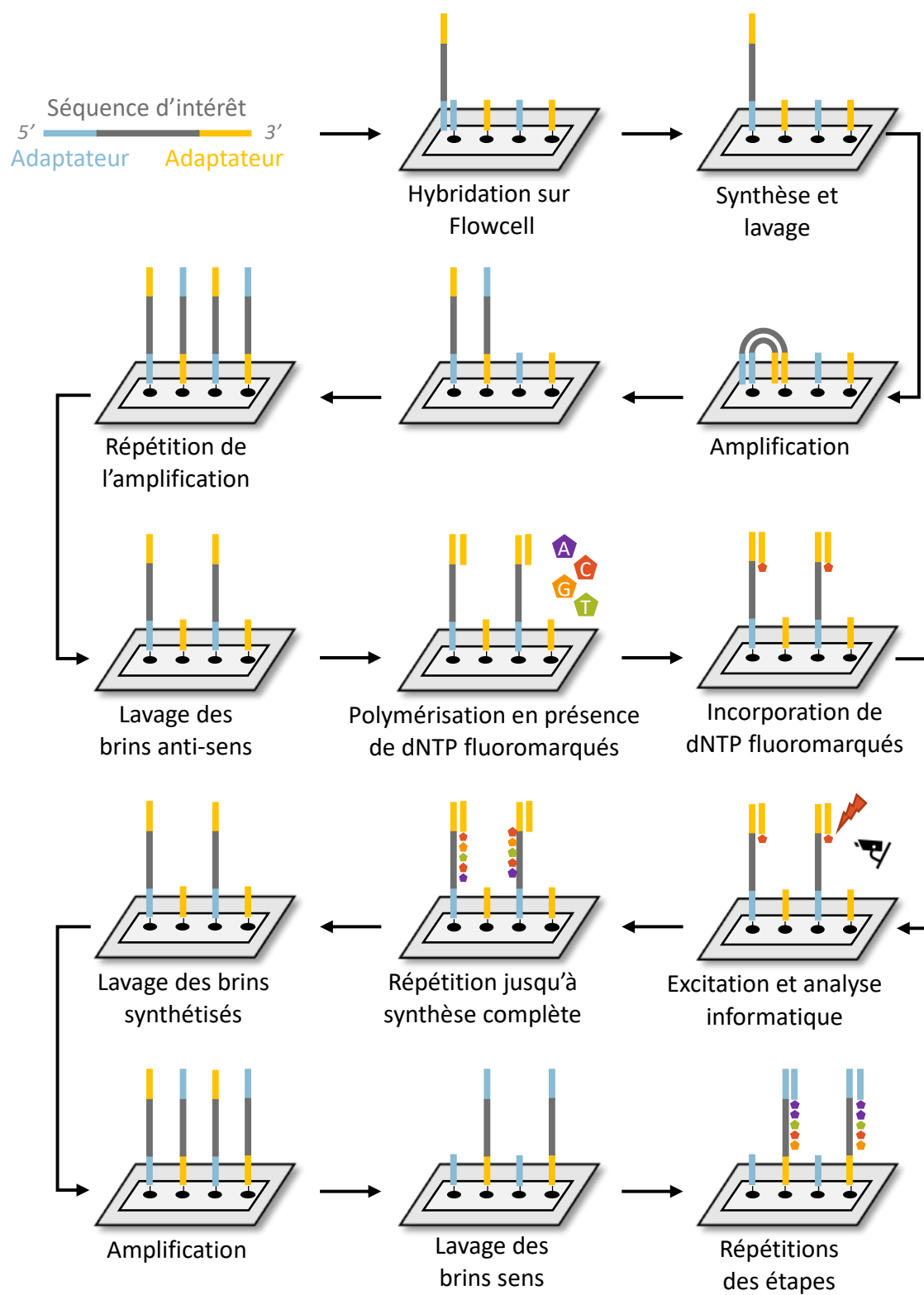


FIGURE 43 – Séquençage Illumina.

III.2.3- Le métabarcoding

Le développement du séquençage haut débit a permis l'essor des méthodes « omics » mentionnées en introduction (chapitre I, partie I.3.1.a). La capacité des technologies de 2^{ème} génération à séquencer simultanément différentes séquences d'intérêt a particulièrement contribué au développement du métabarcoding qui a été utilisé au cours de cette thèse. Le métabarcoding est un descendant direct du barcoding qui consiste en l'identification taxonomique d'un organisme à partir d'une séquence d'ADN hautement conservée et séquencée. Dans le cas du métabarcoding, l'identification se fait à l'échelle d'une communauté entière et nécessite de choisir un gène marqueur à amplifier et séquencer. Ce dernier consiste en une séquence d'ADN suffisamment variable pour distinguer taxonomiquement les organismes entre eux mais aussi suffisamment ubiquitaire et conservée pour permettre son amplification fiable et universelle. Idéalement, cette séquence doit également ne pas subir de transferts horizontaux et être présente en simple copie dans le génome des organismes. Dans le cas d'études de populations procaryotiques, comme celle réalisée au cours de cette thèse, le gène codant pour la petite sous-unité du ribosome, l'ARNr 16S, est massivement utilisé. Ce gène, d'une longueur totale d'environ 1500 pb, possède 9 régions variables et 10 régions conservées d'une longueur variant de 30 à plus de 100 pb. Les régions conservées permettent la mise au point de couples d'amorces universels de référence et encadrent les régions variables qui sont ainsi amplifiées pour permettre de distinguer les procaryotes entre eux (Fig. 44). Le gène codant pour l'ARNr 16S est également ubiquitaire et peu soumis aux transferts horizontaux. Son principal inconvénient est qu'il est présent en multi copies (1 à 15 copies) dans le génome et ne permet donc qu'une estimation approximative de l'abondance relative des communautés présentes au sein des échantillons (Kembel et al. 2012). Dans le cadre de cette de thèse, la région hypervariable V4 du gène codant pour l'ARNr 16S a été amplifiée et séquencée pour l'ensemble des échantillons considérés en utilisant le couple d'amorces 515F/806R (Caporaso et al. 2011) (Fig. 44).

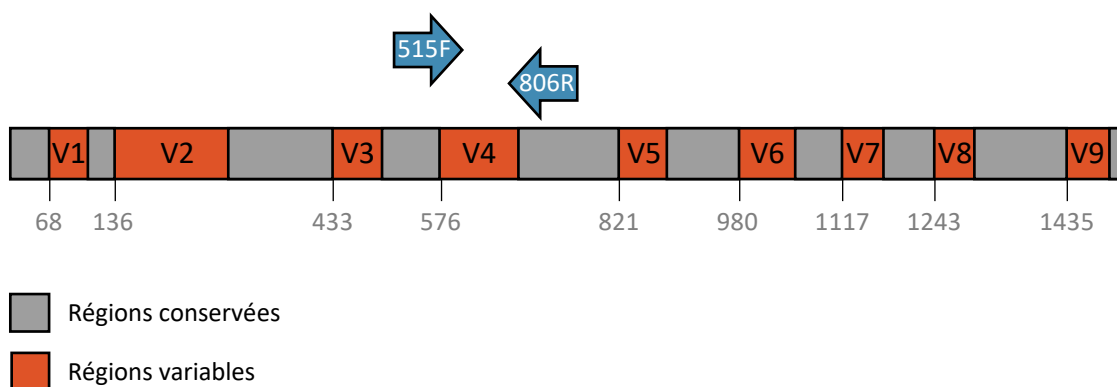


FIGURE 44 – Structure du gène codant pour l'ARNr 16S.

III.3- Différentes stratégies d'analyses des résultats de séquençage

Une fois le séquençage réalisé, toutes les séquences détectées, aussi appelées reads, sont stockées dans des fichiers au format FASTQ selon des normes établies (Fig. 45). Il existe différentes méthodes d'analyse des données ainsi obtenues. L'enjeu de ces méthodes est de réussir à extraire, à partir des fichiers FASTQ, une table de comptage regroupant l'ensemble des échantillons et l'ensemble des séquences taxonomiquement affiliées. Dans cette partie, nous aborderons 2 stratégies distinctes : FROGS et DADA2 (Callahan et al. 2016; Escudie et al. 2018).

```
@D00420:214:HTWLWBCX2:2:1101:1203:2114 1:N:0:GTTTAG
GGACTACGGGGTATCTAATCCTCTTCGATC...
+
FCDEDDBCAFFAECBCDGGGAF.A@FDCBA...
@D00420:214:HTWLWBCX2:2:1101:1143:2155 1:N:0:GTTTAG
GGACTACGGGGTATCTAATCCTCTTCGATC...
+
FBCEDFBCAFAEACBFCDGEGAF@.AFDCBA...
```

D00420	Séquenceur
214	Identité du run
HTWLWBCX2:2:1101:1203:2114	Identification de la Flow Cell et positionnement sur la Flow Cell
1	Read 1 (« forward », brin sens) ou 2 (« reverse », brin anti-sens)
N	Y si read ne passe pas filtre sinon N
0	0 pour HiSeq
GTTTAG	Index
GGACTACG	Amorce
GGGGTATCTAATCC...	Séquence
FCDEDDBCAFFAE...	Score qualité

FIGURE 45 – Exemple d'un fichier FASTQ contenant deux séquences.

Chaque séquence est identifiée par un symbole « @ ». La première ligne permet d'identifier la machine de séquençage. Elle est suivie de la séquence nucléotidique puis des scores qualités associés à chaque base (séparés par un symbole « + »). Chaque échantillon est associé à un barcode (index), qui est un fragment de 8 nucléotides commun à toutes les séquences d'un même échantillon.

III.3.1- La méthode FROGS : Find Rapidly OTUs using Galaxy Solution

FROGS est un pipeline écrit sous python 2.7 et implanté dans la plateforme internet Galaxy, qui propose des workflows reproductibles pour l'analyse intensive de données (Escudie et al. 2018). FROGS permet, à l'aide de treize outils, et sans connaissance du langage informatique, le traitement de données de séquençage issues de Roche-454 (pyroséquençage) et Illumina. Ce workflow est capable de traiter des séquences de différents types (pairees ou non, démultiplexées ou non, avec ou sans amorces) *via* une succession de six étapes décrites ci-dessous : démultiplexage, pré-traitement, clustering, suppression des chimères, filtres et assignation taxonomique (Fig. 46).

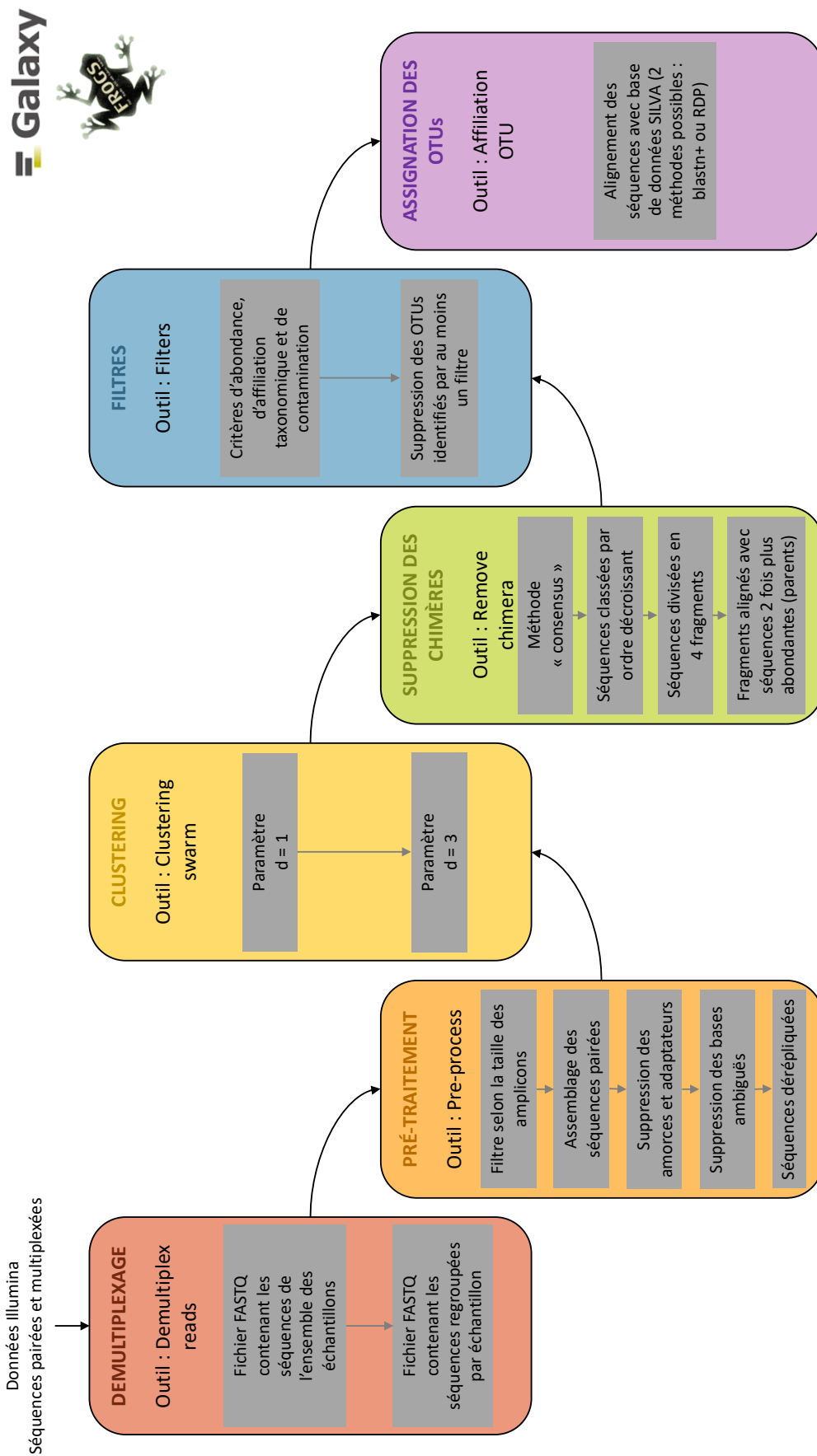


FIGURE 46 – Schéma du workflow FROGS implanté dans la plateforme GALAXY (Escudié et al. 2018).

III.3.1.a- Démultiplexage

Par définition, le démultiplexage est une opération consistant à séparer des signaux distincts, préalablement combinés, et à les répartir sur les voies auxquelles ils sont destinés. Dans le cas de données de séquençage, les signaux correspondent aux séquences et les voies de destination peuvent être considérées comme les échantillons. L'étape de démultiplexage permet ainsi d'obtenir plusieurs fichiers FASTQ contenant chacun l'ensemble des séquences d'un seul et unique échantillon (Péricard, 2017). L'outil « Demultiplex reads » proposé par FROGS est un algorithme qui compare les barcodes (index) entre un fichier de référence (au format tabular) et les séquences d'intérêt contenus dans un fichier FASTQ. Lorsqu'une correspondance est trouvée, le programme attribue la séquence à l'échantillon correspondant. Il est possible de personnaliser cette étape en précisant le nombre maximum de nucléotides différents attendus entre les barcodes associés à la séquence et à la référence. La position où se trouve le barcode (« forward » ou sens, « reverse » ou anti-sens, ou les 2) peut également être précisée.

III.3.1.b- Pré-traitement

Une fois les séquences démultiplexées, FROGS propose une étape de pré-traitement destinée à filtrer et nettoyer les séquences grâce à l'outil « Pre-process reads ». Dans un premier temps, les séquences pairées sont assemblées (« merge paired-ends ») en utilisant la méthode implémentée dans le logiciel FLASH (Fast Length Adjustment of SHort reads) (Magoc & Salzberg 2011). Cette approche permet de trouver l'alignement optimal entre des séquences pairées et de les assembler en considérant tous les alignements stricts possibles. Pour chaque chevauchement, un ratio est calculé entre le nombre de nucléotides différents au sein de l'alignement et la longueur de ce dernier. L'alignement présentant le plus petit ratio est considéré comme optimal. L'outil « Pre-process » permet ensuite de retirer les amorces présentes sur la séquence et de supprimer les séquences ne contenant pas ces amorces *via* la méthode dérivée du programme en lignes de commande Cutadapt (Martin, 2011). Cet outil, essentiellement utilisé sur des séquences courtes (<100 paires de bases), aligne les séquences avec un fichier de référence contenant l'ensemble des adaptateurs. Deux algorithmes sont possibles selon la position de l'adaptateur. Dans les deux cas, l'alignement le plus long est considéré comme optimal. Comme pour l'outil FLASH, un taux d'erreur est calculé en fonction du nombre de nucléotides différents et de la longueur de l'alignement. Si le taux d'erreur est inférieur à un taux fixé au préalable, l'adaptateur est tronqué. Les données sont ensuite nettoyées en utilisant des critères de taille établis par l'expérimentateur et dépendants du couple d'amorces choisi pour le séquençage. Ces critères concernent les tailles maximales et minimales des amplicons. Les séquences présentant des ambiguïtés sont retirées au cours de cette étape. Enfin, au cours du pré-traitement, les séquences sont dé-répliquées. Cette étape consiste à associer les séquences identiques entre elles à 100% (Péricard, 2017).

III.3.1.c- Clustering

Une fois les séquences nettoyées et dé-répliquées, elles sont regroupées en clusters appelés OTUs (Operational Taxonomic Units ou Unités Taxonomique Opérationnelle). Un OTU est composé de séquences identiques entre elles à un certain seuil, souvent 97%. Cette notion sera approfondie dans la partie suivante du manuscrit (III.3.3). L'étape de regroupement dans FROGS, réalisée grâce à l'outil « Clustering swarm », est basée sur une méthode en deux phases appelée Swarm (Mahé et al. 2014). Une première phase de croissance consiste à

placer l'amplicon le plus abondant comme point de départ d'un OTU vide. Un seuil de regroupement des séquences (paramètre d) égal à 1 est alors fixé. Ce seuil signifie que le nombre de différences entre les séquences regroupées est inférieur ou égal à 1. Selon ce paramètre, un alignement optimal est recherché entre l'amplicon central et l'ensemble des séquences restantes. Quand un alignement est trouvé, la séquence est sortie du pool et mise dans l'OTU. Cette étape est répétée jusqu'à ce que l'ensemble des séquences soit assigné à un OTU que l'on appelle à ce stade un pré-cluster. Une fois ces pré-clusters formés, la méthode est répétée en prenant un paramètre d égal à 3 afin d'obtenir les OTUs finaux.

III.3.1.d- Suppression des chimères

Une chimère est un artefact de PCR qui survient lorsque l'amplification n'aboutit pas. L'oligonucléotide formé peut alors être utilisé en tant qu'amorce d'une autre région de l'ADN aboutissant à l'amplification de brins d'ADNs chimériques (Fig. 47). FROGS détecte ces chimères grâce à l'outil « Remove Chimeras » basé sur l'algorithme UCHIME (Edgar et al. 2011) implémenté dans VSEARCH (Rognes et al. 2016). Les chimères sont identifiées selon une méthode dite « consensus », c'est-à-dire qu'elles sont recherchées dans chaque échantillon séparément puis éliminées si elles sont trouvées dans l'ensemble du jeu de données. L'identification des chimères se base sur une méthode *de novo*. Les séquences sont classées par ordre décroissant d'abondance. Chaque séquence est divisée en quatre fragments. Ces fragments sont ensuite alignés avec de potentielles séquences parentes selon un alignement global aussi appelé méthode de Needleman-Wunsch (Needleman & Wunsch 1970). Les séquences parentes sont considérées comme les amplicons deux fois plus abondants que la séquence d'intérêt (Fig. 48).

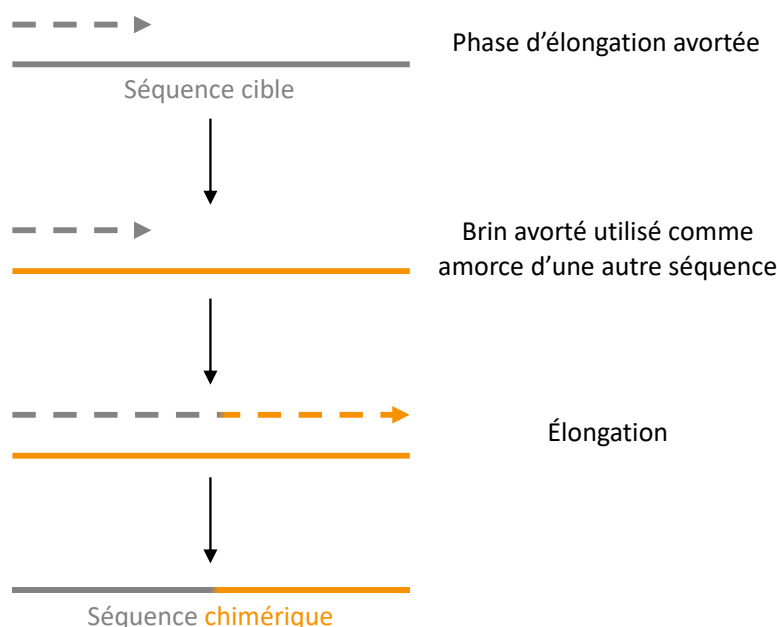


FIGURE 47 – Formation d'une séquence chimérique au cours du processus PCR.

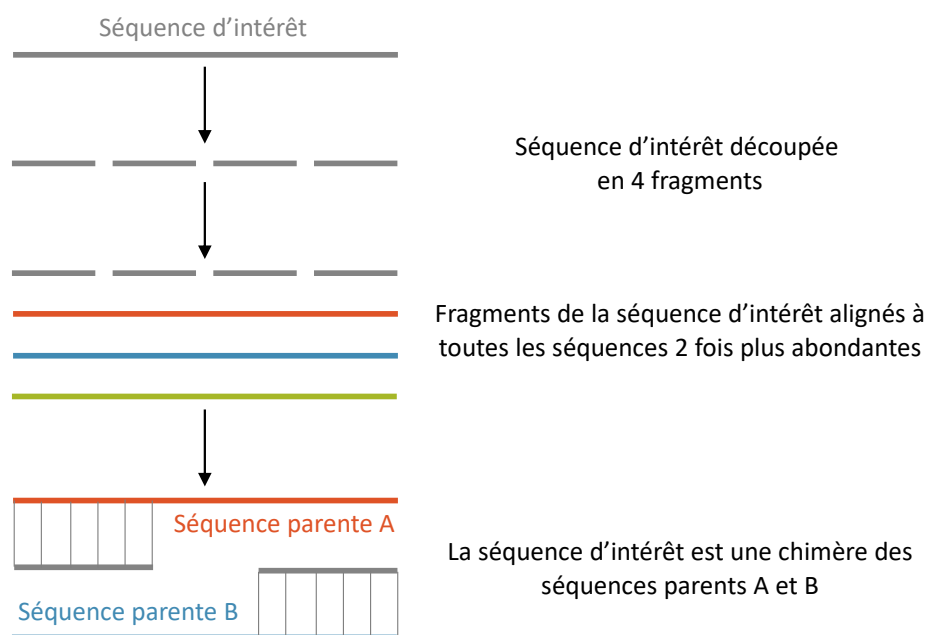


FIGURE 48 – Processus d'identification des chimères

III.3.1.e- Filtres

Les OTUs formés précédemment et débarrassés des séquences chimériques sont ensuite filtrés selon des critères d'abondance et d'affiliation taxonomique. Dans le cas de l'utilisation du contrôle PhiX Illumina, l'élimination de séquences considérées comme contaminantes est également possible. Tous les filtres sont personnalisables par l'utilisateur et appliqués séparément. Les OTUs identifiés par au moins un filtre sont éliminés. Cette étape est réalisée grâce à l'outil « Filters ».

III.3.1.f- Assignation taxonomique

Une fois les OTUs filtrés et nettoyés, une assignation taxonomique est réalisée avec l'outil « OTU Affiliation » en alignant les séquences obtenues avec une base de données de référence. Pour les études de communautés procaryotiques, les bases de données SILVA sont utilisées (Quast et al. 2013; Glöckner et al. 2017). Deux méthodes peuvent être utilisées : blastn+ (Camacho et al. 2009) ou RDP (Recombination Detection Program) (Martin & Rybicki 2000).

III.3.2- La méthode DADA2 : Divide Amplicon Denoise Algorithm

DADA2 est un package R open-source (également disponible sous QIIME2) destiné à traiter et corriger les données de séquençage Illumina (Callahan et al. 2016). Contrairement à la méthode FROGS, DADA2 accepte uniquement des séquences débarrassées de tout adaptateur (amorce) ou barcode (index) et démultiplexées, avec les fichiers « forward » (sens) et « reverse » (anti-sens) dans le même ordre. L'utilisation de DADA2 nécessite donc une étape préalable de démultiplexage qui n'est pas implémentée dans le package. Pour cette thèse, les fichiers FASTQ traités n'avaient pas été démultiplexés et l'outil FastqSplitter proposé par le prestataire de séquençage MrDNA a donc été utilisé

(<https://www.mrdnalab.com/mrdnafreesoftware/fastq-splitter.html>). À la suite de cette étape, chaque échantillon est associé à 2 fichiers FASTQ, l'un contenant les séquences « forward » et l'autre les séquences « reverse » (aussi nommées R1 et R2). Le package DADA2 propose une succession de lignes de commandes qui ont été réalisées au cours de cette thèse avec le logiciel RStudio (RStudio Team, 2020) selon les étapes successives suivantes: identification, filtres, estimation du taux d'erreur, dé-réplication, construction des ASVs, assemblage, suppression des chimères et assignation taxonomique (Fig. 49) (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>).

III.3.2.a- Identification des séquences

La première étape de ce pipeline consiste à identifier les fichiers FASTQ, mentionnés précédemment, à l'aide des fonctions « list.files » et « basename ». Pour cela, les fichiers contenant les séquences démultiplexées doivent être regroupés dans un dossier. Le chemin d'accès à ce dossier est précisé dans R afin de trier les fichiers « forward » et « reverse » et d'extraire les noms de chaque échantillon.

III.3.2.b- Filtres

Après une étape de contrôle de la qualité des séquences (fonction « PlotQuality »), la fonction « filterAndTrim » permet de tronquer les séquences à une longueur définie dépendante du couple d'amorces choisi, de retirer les séquences plus courtes que cette longueur et de retirer les séquences selon un score qualité minimum et un nombre d'erreurs attendues. Seules les séquences « forward » et « reverse » qui remplissent les conditions des filtres sont conservées.

III.3.2.c- Taux d'erreur

Grâce à la fonction « learnErrors », l'algorithme entraîne un modèle d'erreur paramétrique à partir de l'ensemble des données filtrées dans le but d'identifier les erreurs liées aux étapes de PCR et de séquençage. Ce modèle quantifie un taux $\lambda_{i,j}$ pour lequel une séquence i est considérée comme une erreur d'une séquence j , en calculant la probabilité de substitutions des nucléotides au sein des séquences en fonction de leur composition et de leur score qualité. L'hypothèse nulle selon laquelle l'abondance de la séquence i est trop importante pour être expliquée par des erreurs expérimentales est ensuite testée. Des p -values basées sur les abondances sont ainsi calculées puis corrigées selon la méthode de Bonferroni (Bland & Altman 1995).

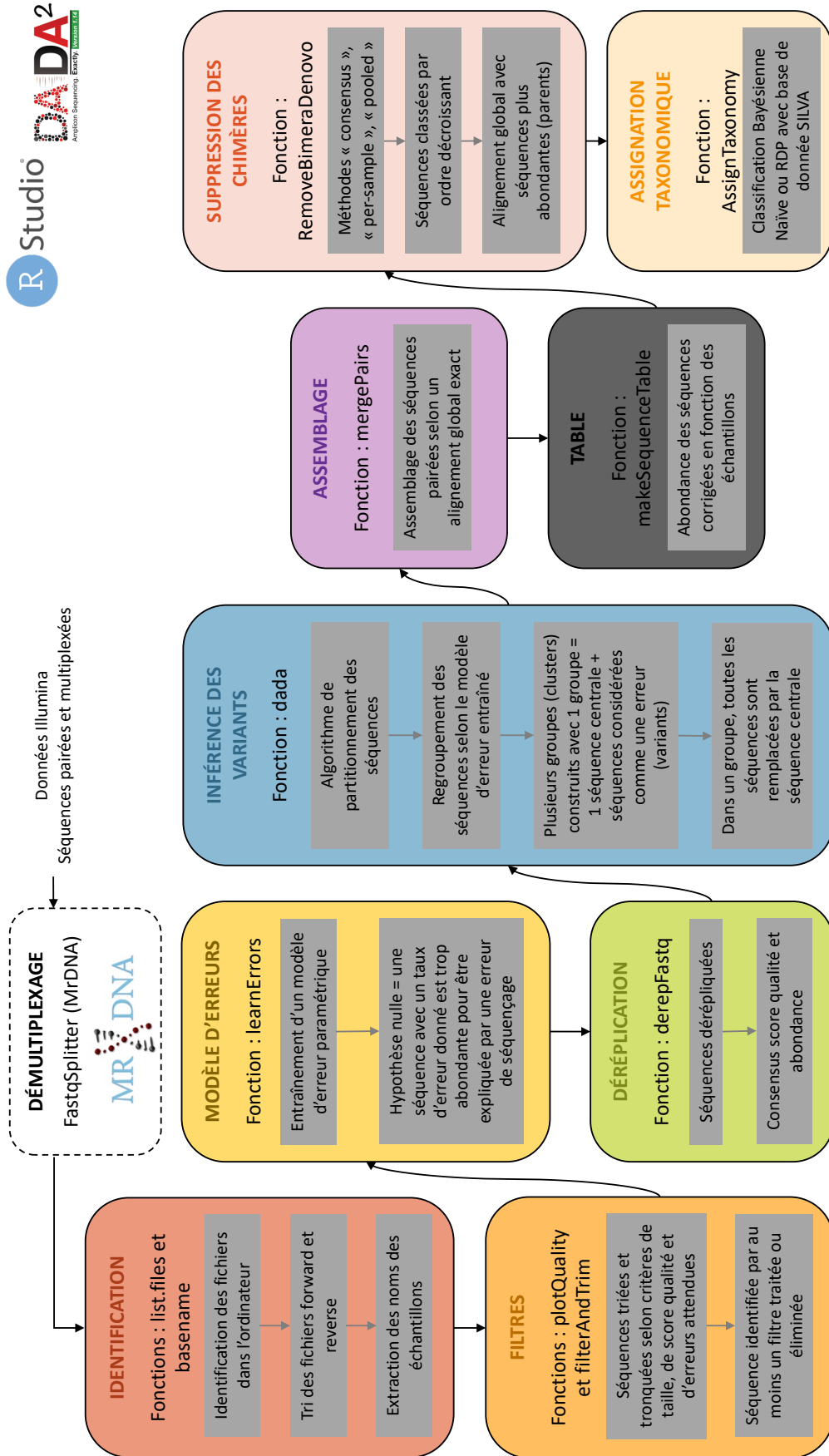


FIGURE 49 – Schéma du pipeline DADA2 implémenté dans le package DADA2 sous R (Callahan et al. 2016).

III.3.2.d- Dé-réplication

La fonction « derepFastq » proposée dans le package DADA2 permet de dé-répliquer les séquences. Le résultat de cette étape est une liste de séquences uniques associées à leurs abondances respectives.

III.3.2.e- Construction des ASVs

La fonction « dada » implémente un algorithme de partitionnement des séquences qui commence par placer toutes les séquences dé-répliquées dans une partition aussi appelée cluster. La séquence la plus abondante est considérée comme la séquence centrale de cette partition. Toutes les autres séquences sont ensuite comparées à cette séquence centrale selon le modèle d'erreur présenté précédemment. En utilisant un processus itératif, l'algorithme vise à créer des clusters (aussi appelés groupes ou partitions) de séquences de telle sorte que toutes les séquences d'une même partition soient considérées comme des erreurs de la séquence centrale. Lorsque les clusters sont construits, toutes les séquences d'un cluster sont remplacées par la séquence centrale de ce dernier. Les partitions ainsi formées sont nommées ASVs pour Amplicon Sequence Variants (variants de séquence d'amplicon). Cette notion sera abordée dans la suite de ce chapitre.

III.3.2.f- Assemblage

Une fois les erreurs de séquençage éliminées, les séquences pairées présentant un alignement strict sont assemblées selon la méthode globale de Needleman-Wunsch ([Needleman & Wunsch 1970](#)). L'alignement est testé pour toutes les séquences « forward » et « reverse ». Si l'alignement n'est pas strict il est rejeté. Le chevauchement minimal est déterminé par la longueur de l'amorce « reverse » moins un nucléotide. Par exemple, pour une amorce de 20 nucléotides le chevauchement minimal sera de 19 paires de bases. La fonction « makeSequenceTable » permet d'établir une table d'ASVs contenant l'ensemble des séquences identifiées et leurs abondances par échantillon. Cette table est ensuite utilisée pour l'identification de chimères.

III.3.2.g- Suppression des chimères

Les chimères sont retirées avec la fonction « RemoveBimeraDenovo ». Plusieurs méthodes sont proposées dans ce pipeline : « consensus », « per-sample » et « pooled ». La méthode « consensus » a déjà été présentée dans l'étape de suppression des chimères du workflow FROGS. L'approche « per-sample » identifie les chimères de chaque échantillon et les supprime obligatoirement sans comparaison avec le reste du jeu de données. Inversement, la méthode « pooled » regroupe l'ensemble des séquences de tous les échantillons et supprime les chimères trouvées au sein de ce pool de séquences. Dans tous les cas, les chimères sont identifiées selon une approche *de novo*. Les séquences sont classées selon leur abondance par ordre décroissant. Elles sont ensuite alignées selon un alignement global aux séquences les plus abondantes pour chercher de potentiels parents. Seules les séquences présentant un alignement strict sont supprimées.

III.3.2.h- Assignation taxonomique

Grâce à l'implémentation de la méthode de classification naïve bayésienne ([Wang et al. 2007](#)), la fonction « assignTaxonomy » considère l'ensemble des séquences à identifier ainsi qu'un ensemble de séquences de référence avec une taxonomie connue (ici une base de données SILVA).

III.3.3- Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) et Variants de Séquence d'Amplicon (ASV)

III.3.3.a- Différences entre un OTU et un ASV

Une Unité Taxonomique Opérationnelle, ou OTU, est un regroupement de séquences identiques entre elles jusqu'à un certain seuil. Deux méthodes de construction sont possibles : à partir d'une banque de données déjà connues (« closed-reference ») ou à partir du jeu de données étudié (*de novo*). Dans le premier cas, une base de données de séquences connues est nécessaire. Les séquences du jeu de données d'intérêt sont alignées à cette base de référence en respectant un seuil d'identité préalablement fixé. Dans le cas d'une méthode *de novo*, seules les séquences des données d'intérêt sont utilisées et regroupées entre elles selon un pourcentage d'identité défini. Classiquement, en taxonomie des procaryotes, le seuil admis est de 97%. Dans cette situation, si nous considérons des séquences de 100 nucléotides regroupées au sein d'un même OTU alors les séquences les plus éloignées au sein du cluster peuvent différer de 3 nucléotides. Pour des séquences plus longues, comme celles considérées au cours de cette thèse (300pb), le nombre de nucléotides différents augmente. Dans le cas du pipeline FROGS, les seuils d'identité sont plus stricts que ceux généralement admis. En effet, des sous-clusters sont d'abord formés en prenant un seuil de différence égal à 1 puis des clusters de ces sous-groupes sont construits avec un seuil de 3. Malgré ces contraintes, les OTUs formés par FROGS ne sont pas composés de séquences identiques à 100%. Il serait d'ailleurs aberrant de construire de tels OTUs puisque regrouper des séquences identiques à 100% implique l'absence d'erreurs de séquençage (Callahan et al. 2017). Ce problème d'erreur de séquençage est corrigé par le pipeline DADA2 qui permet ainsi la construction d'ASVs ; regroupements de séquences identiques à 100% après modélisation des erreurs de séquençage. Plus précisément, un ASV consiste en un regroupement de variants d'amplicon considérés comme des erreurs d'une séquence centrale.

III.3.3.b- Comment choisir ?

Plusieurs études sont disponibles pour comparer les méthodes de construction des ASVs et des OTUs et apportent des conclusions similaires. En 2017, Allali et al. (2017) ont analysé les jeux de séquences obtenus *via* 3 méthodes différentes : DADA2 (qui forme des ASVs), QIIME (qui forme des OTUs *de novo*) et UPARSE (qui forme des OTUs « closed-reference »). Leurs résultats d'analyses par les 3 méthodes conduisent à des conclusions biologiques similaires. En effet, ils concluent qu'aucune méthode universelle unique ne peut être utilisée et conseillent plutôt de choisir une méthode adaptée aux données d'intérêt (Allali et al. 2017). L'année suivante, une nouvelle étude comparative apporte des conclusions similaires (Glassman & Martiny 2018). Les méthodes ASV et OTU testées mènent à des compositions microbiennes similaires au niveau du genre et les conclusions biologiques ne diffèrent pas. À nouveau le choix d'une méthode d'analyse adaptée aux données d'intérêt s'impose comme étant plus judicieux. De manière générale, d'un point de vue biologique, aucune méthode n'apparaît comme obsolète mais l'approche OTU est généralement employée pour évaluer la diversité globale d'une communauté alors que l'approche ASV est conseillée dans le cas d'une compréhension plus précise d'un écotype. Plus récemment, Porter et Hajibabaei (2020) apportent la même conclusion mais conseillent tout de même l'utilisation des ASVs pour des raisons de reproductibilité, de comparaisons inter-études et de résolution au niveau nucléotidique. Des arguments similaires ont été avancés par d'autres auteurs pour promouvoir l'utilisation d'une méthode ASV, comme leur spécificité et leur

sensibilité (Callahan et al. 2017; Prodan et al. 2020). En effet, les modèles d'erreur implantés dans les méthodes ASVs permettent de différencier des séquences différentes d'un nucléotide et augmentent donc la sensibilité et la spécificité de ces méthodes. Ces modèles limitent également la formation de « fausses » séquences, contrairement aux méthodes OTU (Prodan et al. 2020), et permettent ainsi de faciliter l'assignation taxonomique. Les OTUs formés *de novo* par la méthode FROGS, dépendent du jeu de données dans lequel ils sont identifiés et de leur abondance relative à l'intérieur de ce dernier. En conséquence, ces OTUs sont considérés comme étant non reproductibles et ne peuvent pas être utilisés pour des comparaisons inter-études. En revanche, les ASVs sont construits sur la base d'un modèle d'erreur et corrigés, ils reflètent donc une réalité biologique et sont reproductibles. Les ASVs issus d'analyses différentes peuvent donc être regroupés dans une même table afin d'effectuer des méta-analyses (Callahan et al. 2017). Les OTUs formés à partir d'une base de référence peuvent également être utilisés dans des méta-analyses car ils existent en dehors du jeu de données d'intérêt, mais l'utilisation de telles bases de données limite la diversité d'une communauté d'intérêt. En effet, cette méthode est dépendante de l'information disponible à un instant t dans une base de données et est donc limitée pour des environnements moins étudiés. Pour résumer, malgré des conclusions biologiques proches entre ASV et OTU, le choix d'utiliser des ASVs permet d'obtenir des jeux de données plus précis, reproductibles, exhaustifs et utilisables en méta-analyses. Dans le cadre de ce projet de thèse, ce dernier critère a été le plus important pour motiver le choix d'une méthode ASV. En effet, l'un des axes d'étude de cette thèse était de regrouper l'ensemble des données issues d'expérimentations de différentes écloséries et réalisées entre 2018 et 2020 pour pouvoir effectuer une méta-analyse. Or la méthode FROGS et l'utilisation d'OTUs formés *de novo* ne permettait pas de telles analyses. La méthode DADA2 a donc été choisie pour analyser l'ensemble des données de séquençage considérées au cours de cette thèse.

III.4- Normalisation

Le traitement des données de séquençage permet l'obtention d'une table de comptage, quelle que soit la méthode d'analyse choisie. Cette table comprend les ASVs (ou les OTUs) en lignes et les échantillons en colonnes. Chaque ASV ou OTU représente une séquence nucléotidique assignée à une taxonomie allant du règne à l'espèce (Tab. 10). Avant de pouvoir analyser cette table, une dernière étape de normalisation est nécessaire. Dans cette partie, nous aborderons les explications relatives à l'importance de la normalisation, aux différentes méthodes disponibles ainsi que les méthodes choisies dans le cadre de cette thèse.

TABLEAU 10 – Exemple d'une table d'ASVs.

	Séquence	Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Éch_1	Éch_2	Éch_3
ASV1	CGGAATTA...	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas	NA	1151	917	541
ASV2	CGGAATC...	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	Phaeodactylibacter	NA	50	162	271
ASV4	CGCATT...	Bacteria	Bdellovibrionata	Bdellovibrionia	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	OM27	NA	11	18f	0

III.4.1- Pourquoi normaliser ?

En observant une table d'ASVs non normalisée, deux problèmes majeurs se posent. Dans un premier temps, le nombre total de séquences d'un échantillon à l'autre varie grandement. Ce nombre total de séquences au sein d'un échantillon est aussi appelé une librairie (Tab. 11). Au sein d'une table d'ASVs, il existe autant de librairies qu'il existe d'échantillons. Des librairies de tailles différentes peuvent être causées par des biais expérimentaux tels que des variations induites par l'échantillonnage ou des profondeurs de séquençage différentes (Weiss et al. 2017). La profondeur de séquençage reflète le nombre total de séquences détectées, plus la profondeur est grande plus le nombre de séquences mises en évidence augmente. La taille des librairies ne reflète donc pas forcément une réalité biologique et peut fausser les analyses et les conclusions tirées à partir d'une table d'ASVs. On parle alors d'hétéroscédasticité (variances différentes) qui signifie que l'incertitude associée à chaque valeur dans la table est liée au nombre total d'observations et non à la réalité biologique des échantillons. Dans un second temps, outre des librairies de tailles différentes, des profondeurs de séquençage différentes peuvent entraîner un grand nombre de zéro au sein des tables d'ASVs. En effet, une table regroupe l'ensemble des ASVs mis en évidence dans l'ensemble des échantillons. Dans cette situation, un ASV très abondant au sein d'un échantillon peut être absent ou très faiblement présent dans un autre. Les ASVs très rares ou absents ne seront ainsi détectés qu'en augmentant le nombre de séquences mises en évidence. On parle alors de surdispersion. Cela signifie que la variabilité des données est plus importante que la variabilité attendue selon un modèle statistique donné. Le rôle de la normalisation est de minimiser les biais expérimentaux pour mettre en évidence la réalité biologique d'un jeu de données. En d'autres termes, la normalisation est le processus de transformation des données permettant de comparer statistiquement différents échantillons (Weiss et al. 2017). Dans le cadre de cette thèse, les données étudiées ont été obtenues au cours de différents séquençages, effectués entre 2018 et 2021, réalisés par le même prestataire (MrDNA, USA) *via* la même machine mais avec des profondeurs de séquençage différentes. Il était donc indispensable de trouver une méthode de normalisation adaptée pour pouvoir comparer l'ensemble des échantillons récoltés. Malheureusement, il n'existe pas de méthode consensus établie et le choix doit être fait selon les besoins de l'expérimentateur et les données mises à disposition (Evans et al. 2018). Les méthodes existantes les plus utilisées ainsi que celles testées et choisies dans le cadre de cette thèse sont présentées ci-dessous.

TABLEAU 11 – Illustration de trois librairies au sein d'une table d'ASVs.

	Éch_1	Éch_2	Éch_3
ASV1	a	d	g
ASV2	b	e	h
ASV3	c	f	i
Librairies	a + b + c	d + e + f	g + h + i

III.4.2- Principales méthodes de normalisation

III.4.2.a- La raréfaction

La méthode de raréfaction, implémentée dans le package phyloseq disponible dans RStudio (McMurdie & Holmes 2013), est une normalisation couramment utilisée actuellement. Cette méthode se découpe en 2 étapes. La première consiste à sélectionner une taille de librairies minimale. Afin de limiter les biais liés à la subjectivité de l'expérimentateur, elle correspond souvent à la plus petite librairie du jeu de données. Ensuite, la deuxième étape est un sous-échantillonnage aléatoire de la table permettant une suppression aléatoire de certaines séquences au sein des échantillons pour arriver à des tailles de librairies égales. Ce tirage aléatoire entraîne la perte de certains ASVs rares au sein du jeu de données (Fig. 50).



FIGURE 50 – Normalisation par la méthode de raréfaction.

III.4.2.b- Méthodes basées sur les proportions

Il existe une variété de méthodes de normalisation dites « simples » telles que le comptage total (« Total Sum Scaling » ou TSS), le quartile supérieur (« Upper Quartile » ou UQ), la médiane (« Median » ou Med) ou le « Count Per Million » (CPM). Ces méthodes sont basées sur les proportions c'est-à-dire que chaque comptage pour chaque échantillon est divisé par la taille de la librairie correspondante. Les ratios obtenus sont ensuite multipliés par une valeur définie (100, 1 000 000, etc.) dans le cas du TSS et du CPM, ou par la médiane ou le quartile supérieur de l'ensemble des séquences dans le cas des méthodes UQ et Med (Dillies et al. 2013) (Fig. 51).

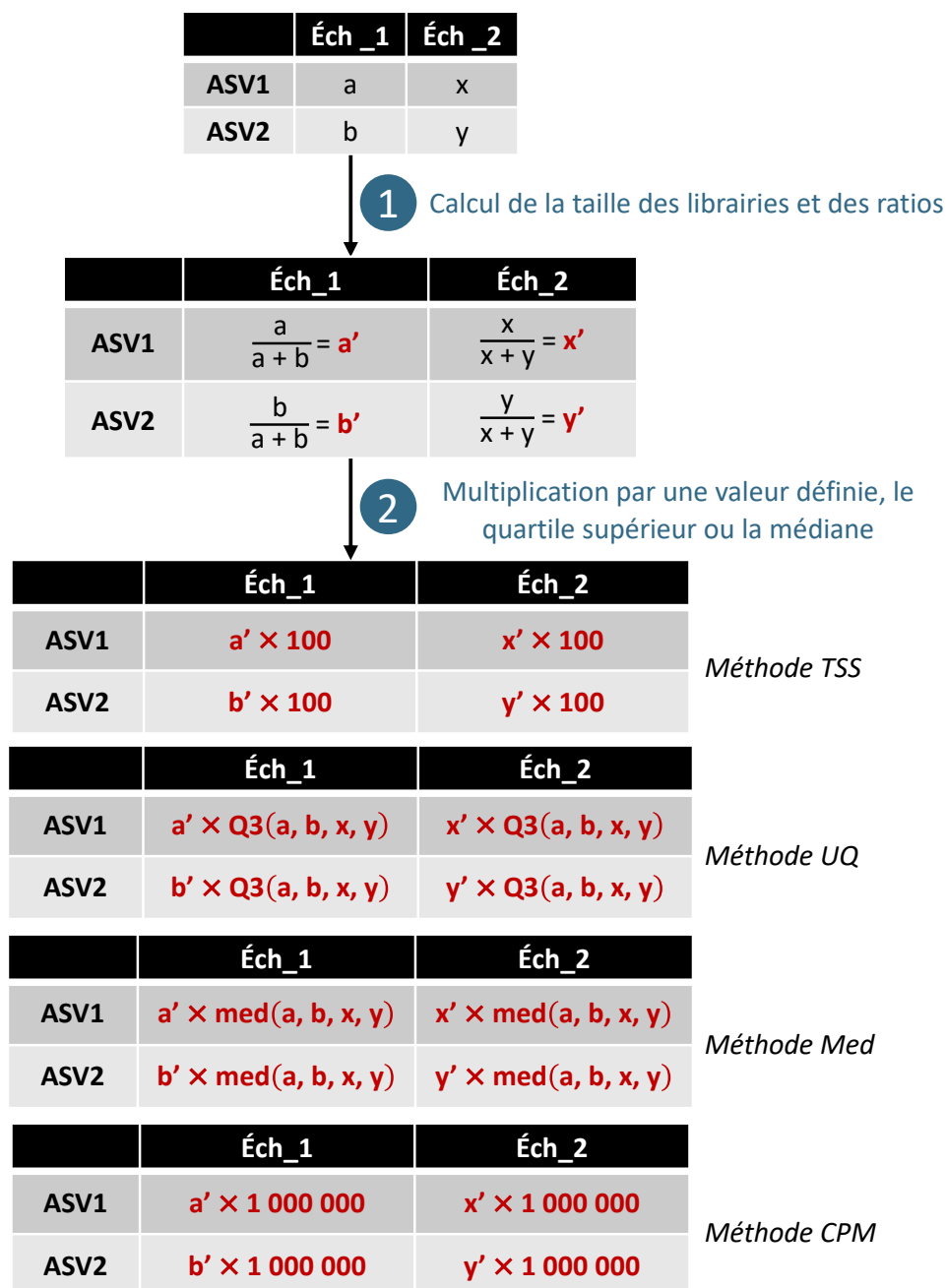


FIGURE 51 – Exemples de méthodes de normalisation basées sur les proportions. Les méthodes TSS (Total Sum Scaling), UQ (UpperQuartile), Med (Médiane) et CPM (Count Per Million) sont montrées.

III.4.2.c- Méthodes plus complexes

Il existe des méthodes de normalisation plus complexes : DESeq2 (Differential Expression Analysis for Sequence count data), edgeR et CSS (Cumulative Sum Scaling). Chacune de ces méthodes existe sous forme de packages disponibles dans le logiciel Rstudio.

La méthode DESeq2 (Love et al. 2014) commence par créer un pseudo-échantillon de référence regroupant la moyenne géométrique de chaque ASV. Chaque comptage est ensuite divisé par cette moyenne géométrique. La médiane des ratios ainsi calculés est estimée pour chaque échantillon. Chacune des médianes obtenues correspond à un facteur échantillon-spécifique qui est utilisé pour normaliser les comptages initiaux (Fig. 52).

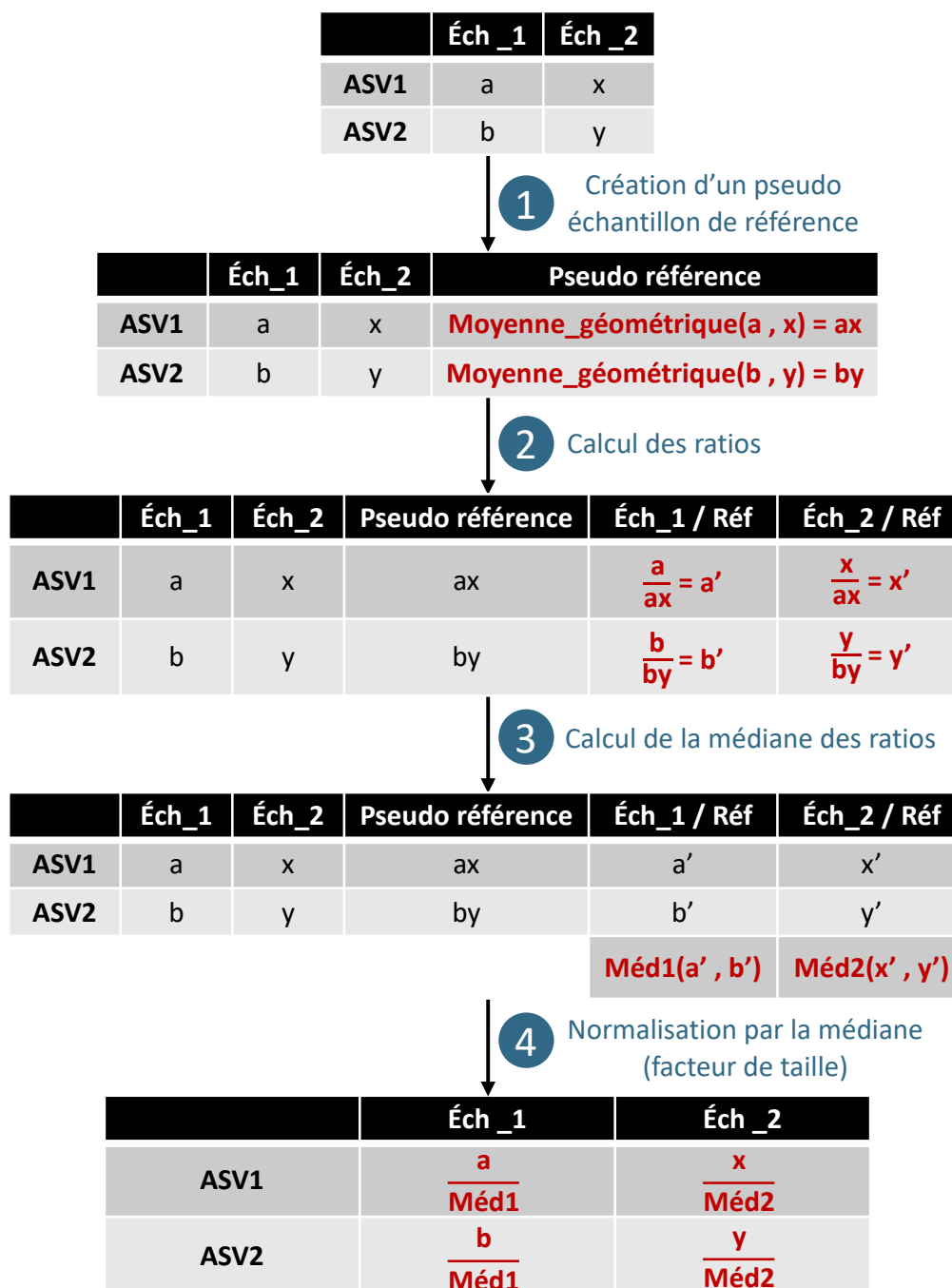


FIGURE 52 – Normalisation par la méthode DESeq2 (Differential Expression Analysis for Sequence count data).

La méthode edgeR (Robinson et al. 2009) nécessite également un échantillon de référence mais, contrairement à la méthode DESeq2, ce dernier est choisi au sein du jeu de données. Pour cela, l'algorithme calcule le ratio de chaque comptage par rapport à la taille des librairies. Ensuite, pour chaque échantillon, le quartile supérieur est calculé et la moyenne des quartiles est estimée. L'échantillon présentant le quartile supérieur le plus proche de la moyenne calculée est considéré comme étant l'échantillon de référence. Une fois cet échantillon déterminé, edgeR crée 2 tables distinctes et calcule le logarithme des ratios ainsi que la moyenne des logarithmes de l'échantillon par rapport à la référence. Les ASVs présents dans les 2 tables (> 0) sont conservés et le facteur de normalisation de l'échantillon considéré est alors calculé. Ce facteur correspond à la moyenne pondérée des logarithmes des ratios entre la référence et l'échantillon d'intérêt. Une fois le facteur obtenu, les comptages initiaux sont normalisés (Fig. 53).

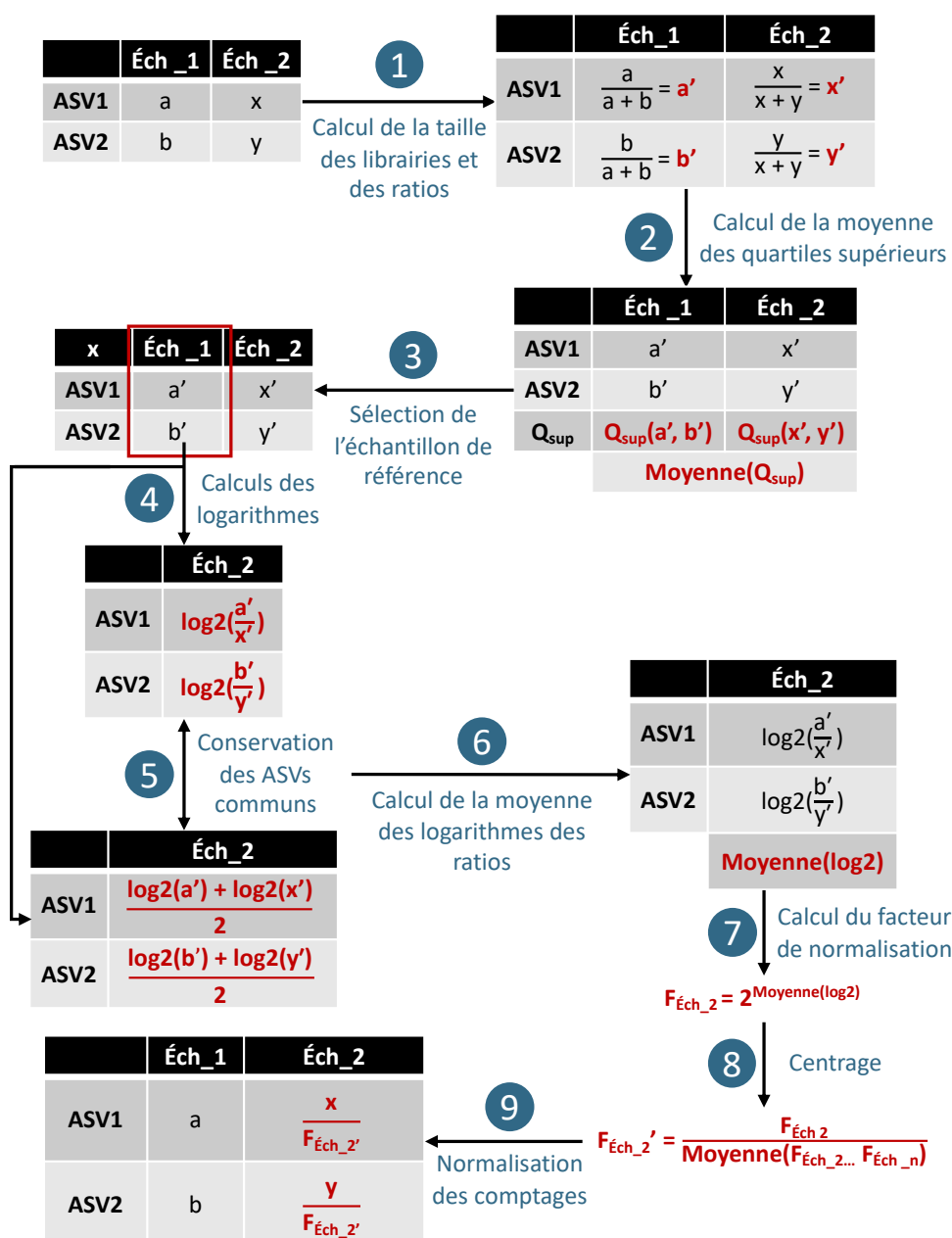


FIGURE 53 – Normalisation par la méthode edgeR.

La méthode CSS (Cumulative Sum Scaling) implémentée dans le package R metagenomeSeq (Paulson et al. 2013) vise à diviser les comptages par la somme des comptages contenus dans un quantile spécifiquement défini pour chaque échantillon. Ce quantile est déterminé en se basant sur une loi binomiale donnée-dépendante qui identifie les ASVs dominants dans chaque échantillon. Plus spécifiquement le quantile est choisi de telle sorte que la distribution des comptages au sein de l'échantillon soit significativement différente d'une distribution de référence préalablement définie par un modèle mathématique. Une fois le quantile déterminé, les comptages normalisés sont obtenus selon la relation suivante :

$$c_{i,j} \text{ normalisé} = \frac{c_{i,j}}{s_j^l} \times N$$

avec : $c_{i,j}$ la somme des comptages de l'ASV i dans l'échantillon j , s_j^l la somme des comptages de l'échantillon j jusqu'au $l^{\text{ème}}$ quantile (q^l) déterminé et N la constante de normalisation déterminée par l'algorithme et commune à l'ensemble des comptages de la table.

Une transformation logarithmique est finalement appliquée aux comptages normalisés obtenus (Fig. 54).

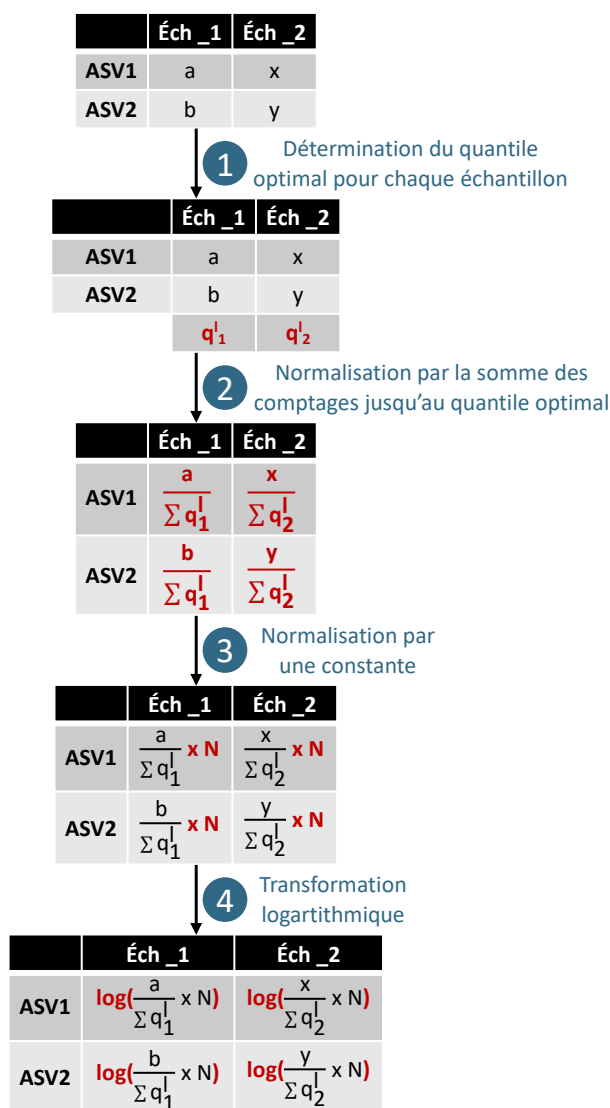


FIGURE 54 – Normalisation par la méthode CSS (Cumulative Sum Scaling).

III.4.3- Quelle normalisation choisir ?

Comme pour le choix entre OTU et ASV, il n'existe pas de méthode de normalisation qui fasse consensus, le choix doit être fait selon le type de données puisque chaque méthode possède des avantages, des inconvénients et des limites qu'il est important de connaître. La raréfaction est devenue relativement courante pour normaliser les données de métabarcoding. Pourtant, en raison de la perte aléatoire d'ASVs rares, cette méthode est déconseillée par certains auteurs et notamment par le créateur du package phyloseq qui propose cette fonction (McMurdie & Holmes 2013; 2014). Même si le sous-échantillonnage aléatoire peut être rendu reproductible par l'utilisation d'une « graine » (ou seed en anglais, nombre utilisé pour l'initialisation d'un générateur de nombres pseudo-aléatoires), McMurdie & Holmes (2014) ont conclu que la perte d'information liée à la perte d'ASVs pouvait influencer la qualité des analyses de clustering (ordonnancement des échantillons) et de différentiel d'abondances réalisées en aval. Cette méthode ne peut être utilisée que dans le cas de tailles de bibliothèques homogènes, ce qui n'était pas le cas des jeux de données considérés au cours de ce projet. C'est également pour cette raison que la méthode CSS ne pouvait pas être utilisée car cette dernière est déconseillée lorsqu'il existe une trop grande différence entre les tailles de bibliothèques. La méthode edgeR a également été écartée à cause de la sélection d'un échantillon de référence au sein du jeu de données. En effet, cette étape n'aurait pas eu de sens biologique au regard des jeux de données considérés et des questions scientifiques posées au début de ce manuscrit. De plus, en raison d'un nombre important de 0 au sein des tables de comptage considérées, la méthode edgeR aurait supprimé de nombreux ASVs lors des calculs logarithmiques effectués, pouvant ainsi affecter le calcul des facteurs de normalisation et la normalisation en aval (Weiss et al. 2017). En conséquence, les méthodes basées sur les proportions ainsi que la méthode DESeq2 ont été considérées au cours de cette thèse. Cependant l'inconvénient principal de la méthode DESeq2 est qu'elle génère des valeurs négatives. Bien que ces valeurs puissent être artificiellement remontées (ajout de la valeur négative la plus basse à toutes les valeurs de la table), ce procédé peut impacter les analyses de distances réalisées en aval, et notamment les distances non euclidiennes utilisées au cours des analyses d'écologie microbienne (comme Bray-Curtis par exemple) (Weiss et al. 2017). Les méthodes basées sur les proportions possèdent également leurs limites puisque, contrairement à DESeq2, elles ne parviennent pas à corriger la surdispersion des données et peuvent ainsi entraîner la mise en évidence de faux positifs au moment des analyses de différentiels d'abondance. En considérant l'ensemble des critères énoncés ci-dessus, la méthode CPM, une méthode de normalisation basée sur les proportions et très similaire à la méthode TSS, a été choisie pour analyser les données obtenues au cours du projet de thèse. Pour cela, la fonction « normalize » du package phyloseq a été utilisée en sélectionnant la méthode « CPM ». Cependant, pour la méta-analyse, les différences de tailles de bibliothèques trop importantes nous ont menés à utiliser la méthode DESeq2. Les résultats sont présentés dans le chapitre VII (partie VII.1).

CHAPITRE IV

Des transmissions horizontales et
verticales modulent le microbiote actif
des œufs et des nauplii de *Penaeus
stylirostris*

IV- Chapitre IV – Des transmissions horizontales et verticales modulent le microbiote actif des œufs et des nauplii de *Penaeus stylirostris*

IV.1- Étude A – Premières preuves de transmission horizontale

IV.1.1- Introduction

Tous les organismes vivants, dont les animaux d'intérêt aquacole, établissent des relations symbiotiques avec diverses communautés microbiennes impliquées dans de nombreux processus physiologiques essentiels (chap. I, partie I.3). Plusieurs études suggèrent d'ailleurs qu'un déséquilibre de ce microbiote pourrait être corrélé à une dégradation de l'état de santé de l'hôte (chap. I, partie I.3). Dans ce contexte et dans le cadre de mortalités larvaires massives constatées dans les écloséries de Nouvelle-Calédonie, des hypothèses quant à une variation des microorganismes procaryotiques associés aux larves et / ou à leur environnement ont été émises pour expliquer les problèmes rencontrés (chap. I, partie I.1.2.c). Afin de mieux comprendre cet écosystème microbien au sein des élevages, le premier objectif de cette thèse a été de caractériser les procaryotes présents au moment de la mise en place du microbiote larvaire et de déterminer les facteurs susceptibles de les influencer. Pour cela, des échantillons d'œufs et de larves au stade nauplius (premier stade larvaire) ainsi que des échantillons d'eau de réserves primaire (eau provenant du lagon) et secondaire (Fig. 32, chap. II, partie II.1.1.a) ont été prélevés à la Station Aquacole de Saint Vincent (SASV) au cours de 3 campagnes d'échantillonnage distinctes : M1 (septembre 2018, saison fraîche), M3 (novembre 2018, saison intermédiaire) et M4 (février 2019, saison chaude) (Fig. 31, chap. II, partie II.1). Dans un premier temps, la qualité des échantillons d'eau récoltés a été évaluée par analyse de la matière organique dissoute colorée (CDOM). Deux paramètres ont été considérés : le coefficient d'absorbance à 325nm ($a_{\lambda 325}$), qui est un indicateur de la concentration en CDOM, et le ratio des pentes spectrales (SR) qui est un indicateur du poids moléculaire de la matière organique dissoute (chap. II, partie II.4.2). Dans un second temps, les ADNc obtenus par rétrotranscription des ARNs extraits à partir de l'ensemble des échantillons ont été séquencés au cours de 2 séquençages Illumina HiSeq (2 x 150pb) distincts (chap. II, partie II.5.1). L'ensemble des échantillons de la M1 et de la M3 ont été séquencés en février 2019 avec une profondeur de séquençage de 20K alors que les échantillons de la M4 ont été séquencés en novembre 2019 avec une profondeur de séquençage de 50K (chap. III, partie III.4.1). Les échantillons d'œufs et de nauplii de la M3 ont également été reséquencés en novembre 2019. Ces différences de séquençage ont mené aux questionnements exposés dans le chapitre III (parties III.3.3.b, III.4.1 et III.4.3). Les données issues de l'ensemble des séquençages ont été analysées avec le package DADA2 (Callahan et al. 2016) (chap. III, partie III.3.2), afin d'obtenir une table d'ASVs (chap. II, partie II.5.2). Après normalisation par méthode CPM (chap. III, partie III.4.2.b), une classification ascendante hiérarchique basée sur une matrice de distance de Bray-Curtis a été construite en utilisant la méthode de Ward. Des comparaisons par diagrammes de Venn ont également été effectuées afin de mettre en évidence les microorganismes communs ou spécifiques à chaque type d'échantillon analysé (détaillé dans le chap. II, partie II.5.3).

IV.1.2- Article 1 – Potential lineage transmission within the active microbiota of the eggs and the nauplii of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: possible influence of the rearing water and more



Potential lineage transmission within the active microbiota of the eggs and the nauplii of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: possible influence of the rearing water and more

Caroline Giraud^{1,2}, Nolwenn Callac¹, Maxime Beauvais^{1,3}, Jean-René Mailliez¹, Dominique Ansquer¹, Nazha Selmaoui-Folcher², Dominique Pham¹, Nelly Wabete¹ and Viviane Boulo^{1,4}

¹ Ifremer, IRD, Université de la Nouvelle-Calédonie, Université de La Réunion, CNRS, UMR 9220 ENTROPIE, Noumea, New Caledonia

² University of New Caledonia, Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA), Noumea, New Caledonia

³ Sorbonne Université, UMR 7261, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, CNRS, Banyuls-sur-Mer, France

⁴ IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan via Domitia, Montpellier, France

ABSTRACT

Background. Microbial communities associated with animals are known to be key elements in the development of their hosts. In marine environments, these communities are largely under the influence of the surrounding water. In aquaculture, understanding the interactions existing between the microbiotas of farmed species and their rearing environment could help establish precise bacterial management.

Method. In light of these facts, we studied the active microbial communities associated with the eggs and the nauplii of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) and their rearing water. All samples were collected in September 2018, November 2018 and February 2019. After RNA extractions, two distinct Illumina HiSeq sequencings were performed. Due to different sequencing depths and in order to compare samples, data were normalized using the Count Per Million method.

Results. We found a core microbiota made of taxa related to *Aestuariatibacter*, *Alteromonas*, *Vibrio*, *SAR11*, *HIMB11*, *AEGEAN 169 marine group* and *Candidatus Endobugula* associated with all the samples indicating that these bacterial communities could be transferred from the water to the animals. We also highlighted specific bacterial taxa in the eggs and the nauplii affiliated to *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Labrenzia*, *Rothia*, *Thalassolituus*, *Marinobacter*, *Aureispira*, *Oleiphilus*, *Profundimonas* and *Marinobacterium* genera suggesting a possible prokaryotic vertical transmission from the breeders to their offspring. This study is the first to focus on the active microbiota associated with early developmental stages of a farmed shrimp species and could serve as a basis to comprehend the microbial interactions involved throughout the whole rearing process.

Subjects Aquaculture, Fisheries and Fish Science, Marine Biology, Microbiology, Molecular Biology, Zoology

Keywords Active microbiota, Lineage transmission, Eggs, Nauplii, Shrimps, Rearing water

Submitted 23 July 2021
Accepted 12 September 2021
Published 15 November 2021

Corresponding authors
Caroline Giraud, cgiraud@ifremer.fr
Nolwenn Callac, ncallac@ifremer.fr

Academic editor
Konstantinos Kormas

Additional Information and
Declarations can be found on
page 17

DOI 10.7717/peerj.12241

© Copyright
2021 Giraud et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

How to cite this article Giraud C, Callac N, Beauvais M, Mailliez J-R, Ansquer D, Selmaoui-Folcher N, Pham D, Wabete N, Boulo V. 2021. Potential lineage transmission within the active microbiota of the eggs and the nauplii of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: possible influence of the rearing water and more. *PeerJ* 9:e12241 <http://doi.org/10.7717/peerj.12241>

INTRODUCTION

It is widely recognized that microorganisms, and more particularly prokaryotes, colonize all types of habitats (Whitman, Coleman & Wiebe, 1998; Mora et al., 2011) and are involved in crucial reactions in various biogeochemical cycles (Falkowski, Fenchel & Delong, 2008). Microorganisms have also been extensively studied for their implication in the human microbiota (Huttenhower et al., 2012) and thus for their involvement in health, development and behavior (Cho & Blaser, 2012; Moloney et al., 2014). Marine animals also host essential microbial communities associated with their skin (ex. mammals, fishes) or their exoskeleton (crustaceans) as well as their digestive and respiratory systems (Apprill, 2017). These communities are largely influenced by the marine environment which is colonized by all types of microorganisms (Sehna et al., 2021). More and more studies suggest that comprehending the interactions existing among marine animals, their microbiota and their aquatic environment could help understand the response of these animals to climate change and pollution and could also help improve management of farmed species (Egan & Gardiner, 2016; Sehna et al., 2021).

In New Caledonia, the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) is a valuable farmed species and represents an economical challenge for the territory (Beliaeff et al., 2009). Indeed, since 1970, the sector has become the island's leading food-processing exporter (Rural Agency of New Caledonia) with a semi-intensive annual production of 1,500 tons. Unfortunately, the production has been declining due to seasonal vibriosis touching adult individuals (Goarant et al., 1999; Goarant et al., 2006) and to larval mortalities that have not yet been explained. Knowing that natural seawater is used during the rearing process and that the New Caledonian lagoon has been more and more exposed to anthropic pressures over the years, hypothesis have been made regarding the water quality in order to explain these early mortalities. Thus, understanding the interactions that exist between the microbial communities associated with the rearing water and the different larval stages of *L. stylirostris* could help lead to precise bacterial management during shrimp farming.

As a first step in understanding the microbiota of *L. stylirostris*, we studied the active microbial communities associated with the eggs, the first larval stages (nauplii) and the rearing water. Samples were collected at three different times in September 2018 (cool season), November 2018 (transitional season) and February 2019 (warm season). Bacterial lineages affiliated to *Aestuariibacter*, *Alteromonas*, *Vibrio*, SAR11, HIMB11, AEGEAN 169 marine group and *Candidatus Endobugula* were found in all the samples but in different proportions suggesting that some bacterial communities in the rearing environment could potentially colonize the eggs and the nauplii. We also found specific taxa related to *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Labrenzia*, *Rothia*, *Thalassolituus*, *Marinobacter*, *Aureispira*, *Oleiphilus*, *Profundimonas* and *Marinobacterium* genera in the eggs and the nauplii that were not found in the water samples and could have been vertically transmitted from the breeders.

MATERIALS & METHODS

Study design and sample collection

Eggs and nauplii of *L. stylirostris* were supplied by the experimental shrimp hatchery located at the Saint Vincent Bay (Ifremer, Boulouparis, New Caledonia) in September 2018 (M1), November 2018 (M3) and February 2019 (M4). For all experiments, breeders were reared in maturation tanks according to the method described in [Pham et al. \(2012\)](#). Tanks in the maturation and in the hatchery were filled with natural seawater from the Saint Vincent Bay. Natural seawater was pumped through a 1 cm pore size strainer in a primary reservoir (ResI), was then filtered on a 10 μm pore size filter and stored in a secondary reservoir (ResII). In the secondary reservoir, seawater was circulated for 3 days, through a loop composed of 1 and 5 μm pore size filters and a skimmer. Seawater was briefly passed through a UV chamber before filling the hatchery tanks. In each tank, 5 g m^{-3} of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were finally added ([Fig. S1](#)). Seawater from the primary reservoir was sampled 5 days before artificial inseminations. Seawater from the secondary reservoir was sampled after filtration and skimmer treatments, on the day the eggs were collected. For each experiment, 1L of seawater from the primary and the secondary reservoirs were collected and were filtered on a 0.2 μm pore size filter (S-PAK membrane filter, Millipore). Filters were kept for RNA extractions and were stored at -80°C ; filtrates were used, within the 2 h of sampling, to analyse the Colored Dissolved Organic Matter (CDOM) as described in [Helms et al. \(2009\)](#) and [Sadeghi-Nassaj et al. \(2018\)](#).

After artificial insemination and spawning, around a hundred eggs were collected in a 2ml sterile microtube using sterilized pliers. The following day, before transfer into rearing tanks for larval rearing, around a hundred nauplii were sampled in the same way as the eggs using sterilized pliers. All egg and nauplius samples were stored at -80°C until further RNA extractions. For the M4 experiment, eggs and nauplii were sampled in replicates (M4_Egg1, M4_Egg2, M4_Nii1, M4_Nii2) whereas unique egg and nauplius samples were collected during the M1 and the M3 experiments.

RNA extractions and sequencing

Due to different sample types, RNA extractions were performed using the RNeasy PowerWater kit (Qiagen) for the filters, and using the RNeasy minikit (Qiagen) for the eggs and the nauplii. Total RNAs were reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) by adding 200 ng of RNAs to a reaction mix (buffer 5X, dNTP 10 mM, random hexamers 50 μM , reverse transcriptase M-MLV (PROMEGA) 200 $\text{u } \mu\text{L}^{-1}$, RNase/DNase free water). Reverse-transcription was performed in a thermocycler (VerityTM, Applied Biosystems) during 10 min at 25°C , 2 h at 42°C and 5 min at 85°C .

All cDNAs were sent to MrDNA (Shallowater, TX, United States) in order to amplify and sequence the V4 region of the 16S rRNA gene using the 515F/806R primers ([Caporaso et al., 2011](#)). A HiSeq Illumina sequencing was conducted using a 2×300 pb paired-end run.

Due to different sampling times, two distinct sequencings were performed. All samples from the M1 and the M3 (M3a, first sequencing) experiments were sequenced in February

2019 with an average sequencing depth of 20k raw reads per samples. All samples from the M4 experiment as well as the egg and the nauplius samples from the M3 experiment (M3b, second sequencing) were sequenced in November 2019 with an average sequencing depth of 50k raw reads per sample.

Microbiota analysis

Raw sequences were demultiplexed using the MrDNA tool fastqSplitter (<https://www.mrdnalab.com/mrdnafreesoftware/fastq-splitter.html>). Demultiplexed sequences were treated using the DADA2 (Callahan et al., 2016) package available in the RStudio software (RStudio Team, 2020). Briefly, sequences were filtered using a maximum expected error of 2. Filtered sequences were used to estimate error rates and dereplication. Dereplicated samples and error rates were implemented in the DADA2 error model in order to correct sequencing errors and construct Amplicon Sequence Variants (ASVs) as described in Callahan et al. (2016) and Callahan et al. (2016). Paired-end reads were merged and chimeras were removed using the consensus method. Taxonomy was finally assigned using the Silva 138 database (Quast et al., 2013).

Data were normalized with the Counts Per Million (CPM) method using the cpm function available in the edgeR package under RStudio (Robinson, McCarthy & Smyth, 2009). All libraries were normalized to 1,000,000 reads prior to microbiota analysis. A dendrogram based on a Bray-Curtis dissimilarity matrix and Ward method was obtained using the vegan, ggplot2, dplyr and dendextend packages in RStudio (Galili, 2015; Oksanen et al., 2020; Wickham, 2016; Wickham et al., 2021). Histogram tables were obtained using the dplyr package in RStudio (Wickham et al., 2021). Venn diagrams were made using the open-source component for web environment jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) (Bardou et al., 2014).

All the 16S rRNA data are available in the NCBI SRA repository (Submission ID SUB9828953, BioProject ID PRJNA736535).

RESULTS

CDOM (Colored Dissolved Organic Matter) measurements

Two parameters were analyzed during CDOM measurements of the water samples: the absorption coefficient at 325nm ($a_{\lambda 325}$) and the ratio of the spectral slopes (SR) ($((a_{\lambda 275-295})/(a_{\lambda 350-400}))$) which are respectively used as a proxy for CDOM concentration and as an indicator of the molecular weight of Dissolved Organic Matter (DOM) (Sadeghi-Nassaj et al., 2018). The $a_{\lambda 325}$ values of all the reservoir samples ranged from 0.8 to 1.1 m^{-1} . For all experiments, the SR values varied from 5.98 to 7.67 in the primary reservoirs (ResI) and from 4.79 to 8.12 in the secondary reservoirs (ResII). For the M1 experiment, the SR value was higher in the ResI sample (7.06) than in the ResII sample (4.79). For the M3 and the M4 experiments, trends were inverted (Table 1) as SR values respectively equaled 7.67 and 5.98 in the primary reservoirs; and 8.12 and 6.27 in the secondary reservoirs.

Microbial diversity

A total of 2,987,759 sequences were obtained from the Illumina sequencings of all samples (M1, M3a, M3b and M4). Sequences were clustered into 4,950 distinct ASVs.

Table 1 CDOM concentrations and slope ratios in the reservoirs. Values of CDOM concentration ($a_{\lambda 325}$) and slope ratios (SR) from 275 to 295 nm and from 350 to 400 nm of the primary and the secondary reservoir (ResI and ResII) samples of the M1, M3 and M4 experiments.

		ResI	ResII
M1	$a_{\lambda 325}$ (m^{-1})	0.99	1.01
	SR	7.06	4.79
M3	$a_{\lambda 325}$ (m^{-1})	0.83	0.82
	SR	7.67	8.12
M4	$a_{\lambda 325}$ (m^{-1})	1.06	0.98
	SR	5.98	6.27

The smallest and largest libraries were respectively composed of 15,399 and 554,056 reads and corresponded to the M3a_Egg and M3b_Nii samples. All libraries were normalized to 1,000,000 reads using the CPM method.

Hierarchical clustering based on Bray–Curtis similarity separated the samples into 2 distinct groups (Fig. 1A). The cluster 1 gathered all the water samples while the cluster 2 contained all the egg and the nauplius samples. All the water samples from the primary reservoirs clustered together with the ResII sample from the M1 experiment. The water samples from the other secondary reservoirs (M3a and M4) clustered separately. Eggs and nauplii sampled during the M3 experiment and sequenced twice formed a unique subgroup while the egg and the nauplius samples from the M1 and M4 experiments clustered together.

For all samples, 11 dominant classes were highlighted (Fig. 1B). Gammaproteobacteria (45% of the total ASV relative abundance) and Alphaproteobacteria (19%) were the most abundant classes followed by Bacteroidia (10%) and Verrucomicrobiae (5%). Acidimicrobiia, Planctomycetes and Cyanobacteriia each represented 3% of the ASVs table. Water samples from all the primary reservoirs showed consistent total bacterial compositions with five predominant classes: Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Acidimicrobiia, Cyanobacteriia and Bacteroidia. The bacterial diversity of the M1_ResII sample was very similar to the one of the primary reservoirs. The other water samples from the secondary reservoirs also contained Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria but Planctomycetes dominated the M3_ResII sample while the M4_ResII sample was mainly composed of Verrucomicrobiae. Global bacterial communities associated with the egg and the nauplius samples majorly displayed Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria and Bacteroidia (over 70% of the total ASV relative abundance). Eggs were also composed of Fusobacteriia, especially for the M1 experiment, while nauplii were partly composed of Desulfuromonadia.

Specific and shared ASVs among samples

In order to highlight specific and shared ASVs among all samples, we constructed several Venn diagrams. First, four distinct Venn diagrams were built to find common ASVs among all experiments for each sample type (Fig. S2). A total of 330 ASVs were shared among all the primary reservoir samples (Fig. S2A). All the secondary reservoir samples owned 215 ASVs (Fig. S2B) whereas the egg (Fig. S2C) and the nauplius (Fig. S2D) samples respectively

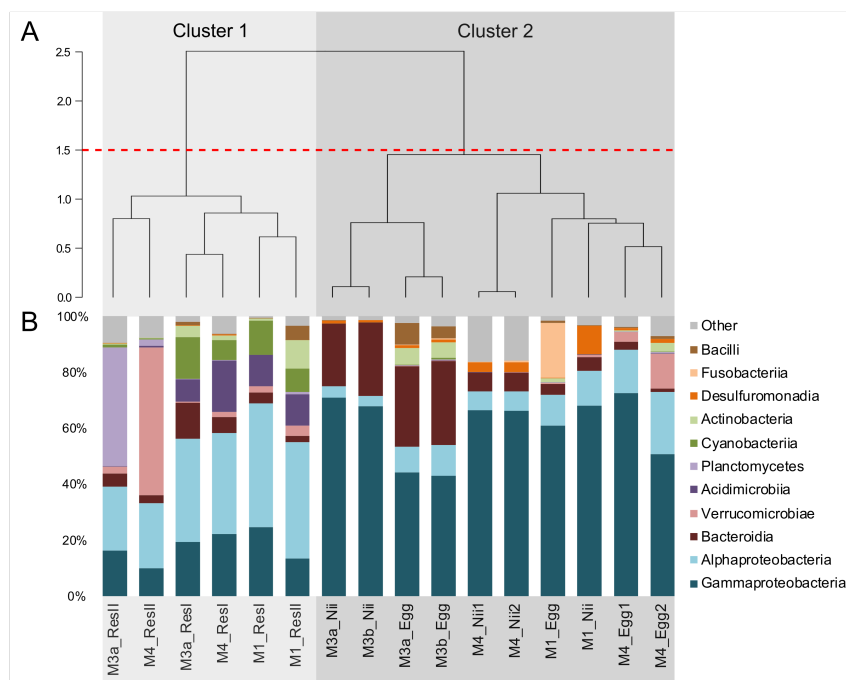


Figure 1 Bacterial compositions and clustering of all samples. (A) Hierarchical clustering based on Bray-Curtis dissimilarity. In order to define clusters, a 1.5 threshold was set (represented by the red dotted line). All the water samples are clustered in Cluster 1, in light grey. All the egg and the nauplius (nii) samples are clustered in Cluster 2, in dark grey. (B) Bacterial compositions of the primary reservoir (ResI), the secondary reservoir (ResII), the egg and the nauplius (nii) samples. The highlighted bacterial classes have a total relative abundance higher than 1%.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.12241/fig-1

shared 270 and 259 ASVs. We used these four ASV lists to build a final Venn diagram allowing us to highlight 623 distinct ASVs; specific and common among the compartments (Fig. 2). A total of 257 ASVs were uniquely found in the water samples (Fig. 2A). The primary and the secondary reservoirs respectively showed 145 and 33 specific ASVs while they shared 79 ASVs. All the considered samples shared 62 ASVs (Fig. 2B). In the same way as the water samples, 233 ASVs were only found in the egg and the nauplius samples (Fig. 2C); 88 ASVs were specific to the egg samples while 80 ASVs were uniquely highlighted in the nauplius samples. The eggs and the nauplii shared 65 ASVs that were not identified in the water samples.

Specific and shared bacterial communities among samples

Based on the Venn diagram (Fig. 2), we analyzed the relative abundance of each subset of ASVs selected above by constructing 100% stacked histograms. The water samples showed specific ASVs (Fig. 3A). The microbiota specifically associated with the primary reservoirs showed 4 dominant groups which accounted for 30% of the total relative abundance

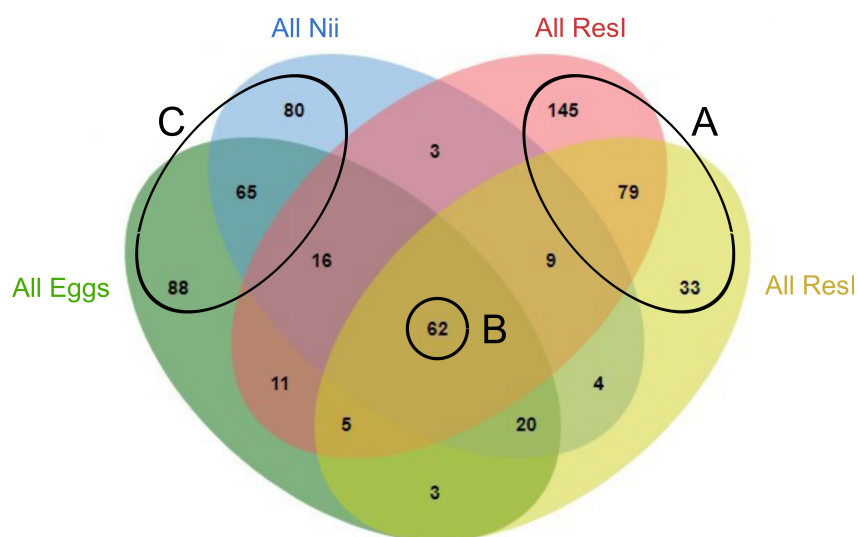


Figure 2 Venn diagram of shared ASVs among experiments and sample types. The green ellipse represents the ASVs common to all the egg samples. The blue ellipse represents the ASVs common to all the nauplius (nii) samples. The red ellipse represents the ASVs common to all the primary reservoir (ResI) samples. The yellow ellipse represents the ASVs common to all the secondary reservoir (ResII) samples. Numbers noted in the overlapping areas correspond to shared ASVs among compartments. Numbers noted outside of the overlapping areas correspond to specific ASVs. (A) Specific and shared ASVs among the water samples. (B) Shared core microbiota among all sample types. (C) Specific and shared ASVs among the egg and the nauplius samples.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.12241/fig-2

(Fig. 3B): *OM60 Clade*, *Sva0996 marine group*, *MB11c04 marine group* and *NS5 marine group*. One ASV was not affiliated to the genus level (*Nitrincolaceae*) and represented 20% of the total relative abundance. *Candidatus Actinomarina*, *Synechococcus* and *SAR116 Clade* were shared between the primary and secondary reservoirs and accounted for 49% of the total relative abundance (Fig. 3C). The secondary reservoir samples highlighted a very specific and highly represented ASV affiliated to *Pedosphaeraceae* family which accounted for 80% of the total abundance (Fig. 3D).

A total of 62 ASVs were shared among all the samples (Fig. 4A). In this microbiota, 15 genera and 4 ASVs which were not affiliated to the genus level were highlighted. Even though all these bacterial lineages were found in all samples, their total relative abundance varied. Indeed, the ResI samples were dominated (60% of the total relative abundance) by *SAR11 Clade Ia*, *HIMB11* and by an ASV affiliated to the *AEGEAN 169 marine group* (Fig. 4B). The secondary reservoirs showed higher abundances for 3 ASVs which were affiliated to *Candidatus Endobugula*, *Gimesiaceae* and *NRL2* (Fig. 4C). In both egg (Fig. 4D) and nauplius (Fig. 4E) samples, *Aestauriibacter*, *Alteromonas* and *Vibrio* genera represented over 50% of the total relative abundance.

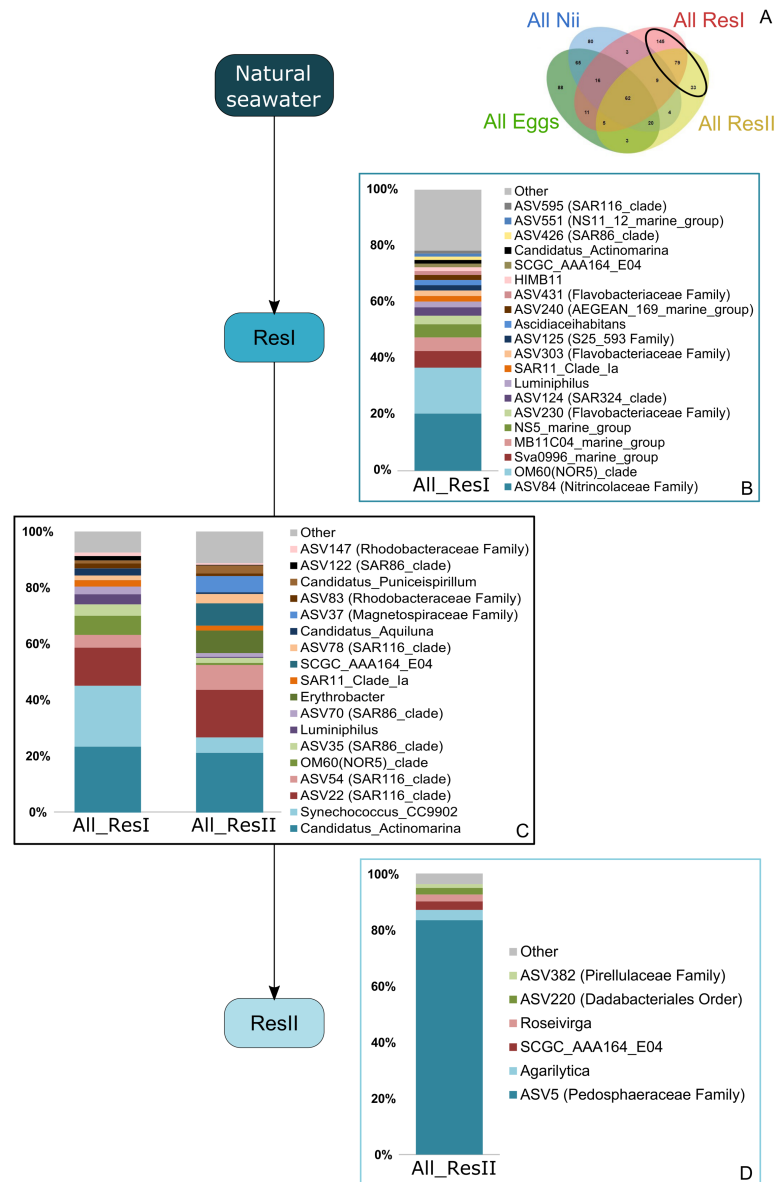
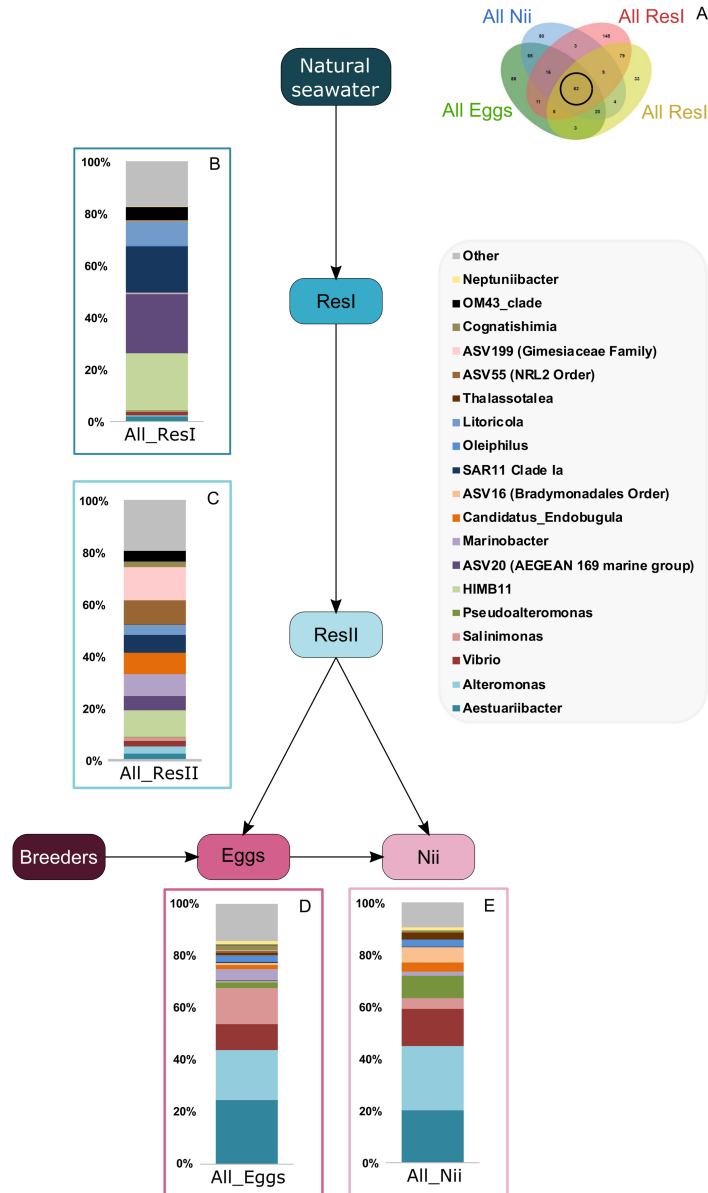


Figure 3 Bacterial communities associated with the primary and the secondary reservoirs. Top bacterial lineages (up to genus when possible) with a relative abundance higher than 1% and specifically found in (A) the primary and the secondary reservoir water samples (ResI and ResII). Histograms were built using the abundance of the selected subset of ASVs. Top bacterial lineages (B) uniquely found in the primary reservoir (ResI) samples (148 ASVs, in red in the Venn diagram), (C) shared between all the water samples (79 ASVs, in the intersection of the red and yellow ellipses) and (D) uniquely found in the secondary reservoir (ResII) samples (33 ASVs, in yellow in the Venn diagram). The arrows represent the potential ASV transmission among compartments.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.12241/fig-3



Full-size [DOI: 10.7717/peerj.12241/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.12241/fig-4)

Bacterial compositions of communities specifically associated with the egg and the nauplius samples were evaluated alongside with transmitted ASVs between the two sample types (Fig. 5A). In the egg samples, 21 bacterial lineages accounted for more than 80% of the total relative abundance (Fig. 5B). *Pseudomonas* and *Corynebacterium* each had a relative abundance of 18%. *Acinetobacter* represented 8% of the total relative abundance while *Labrenzia* and *Rothia* each accounted for 6%. These five genera alone represented more than 55% of the total relative abundance among the bacterial communities specifically associated with the egg samples. Some ASVs seemed transmitted from the eggs to the nauplii (Fig. 5C). Among those ASVs, 21 bacterial lineages were highlighted and accounted for 90% of the total relative abundance. The most abundant genera were *Thalassolituus* (20%), *Vibrio* (18%), *Marinobacter* (5%), *Aureispira* (5%) and *Oleiphilus* (4%). One ASV accounted for 5% of the total relative abundance but could not be affiliated to the genus level (*MBAE14* Order). Specific ASVs were also found in all the nauplius samples; 17 bacterial lineages were highlighted and represented 85% of the total relative abundance (Fig. 5D). *Profundimonas* and *Marinobacterium* respectively represented 15% and 8% of the total relative abundance. Two ASVs accounted for 28% of the abundance and were affiliated to SGC AAA286 E23 and Bacteroidia (unknown order).

DISCUSSION

Dealing with sequencing depths

Due to different sampling times and sequencing runs, the choice of bioinformatic techniques for data analysis was very important. Thus, we considered and compared several methods to cluster sequences and to normalize the considered dataset. During the last decade, two ways have been used to cluster sequencing reads: the Operational Taxonomic Units (OTUs) or the ASVs. OTUs cluster sequences which are identical up to a fixed similarity threshold (usually 97%) while ASVs regroup identical sequences after a sequencing error correction step (Callahan et al., 2016). Comparing the 2 methods, it appears that biological conclusions are very similar (Allali et al., 2017; Glassman & Martiny, 2018). However, ASVs are advised for improved reproducibility, comparison across studies, meta-analysis and nucleotide-level resolution (Callahan, McMurdie & Holmes, 2017; Porter & Hajibabaei, 2020). As the samples considered in our study had been collected during 3 different experiments and were sequenced separately, we chose to analyze sequencing data using the ASV method implemented in the DADA2 package under RStudio (Callahan et al., 2016) in order to enable comparison among samples. After sequencing data analysis, library sizes among samples varied from 15399 to 554056 reads because of different sequencing depths. As a consequence, hierarchical clustering based on Bray-Curtis dissimilarity of non-normalized data showed a clear sequencing depth effect as samples sequenced together gathered together (Fig. S3). In order to compare samples, data needed to be normalized. The rarefaction method has been extensively used to normalize metabarcoding data but it leads to non-reproducible tables and randomly suppresses OTUs or ASVs (McMurdie & Holmes, 2014). The edgeR and DESeq methods have been advised but involve the use of logarithms and do not handle well null values

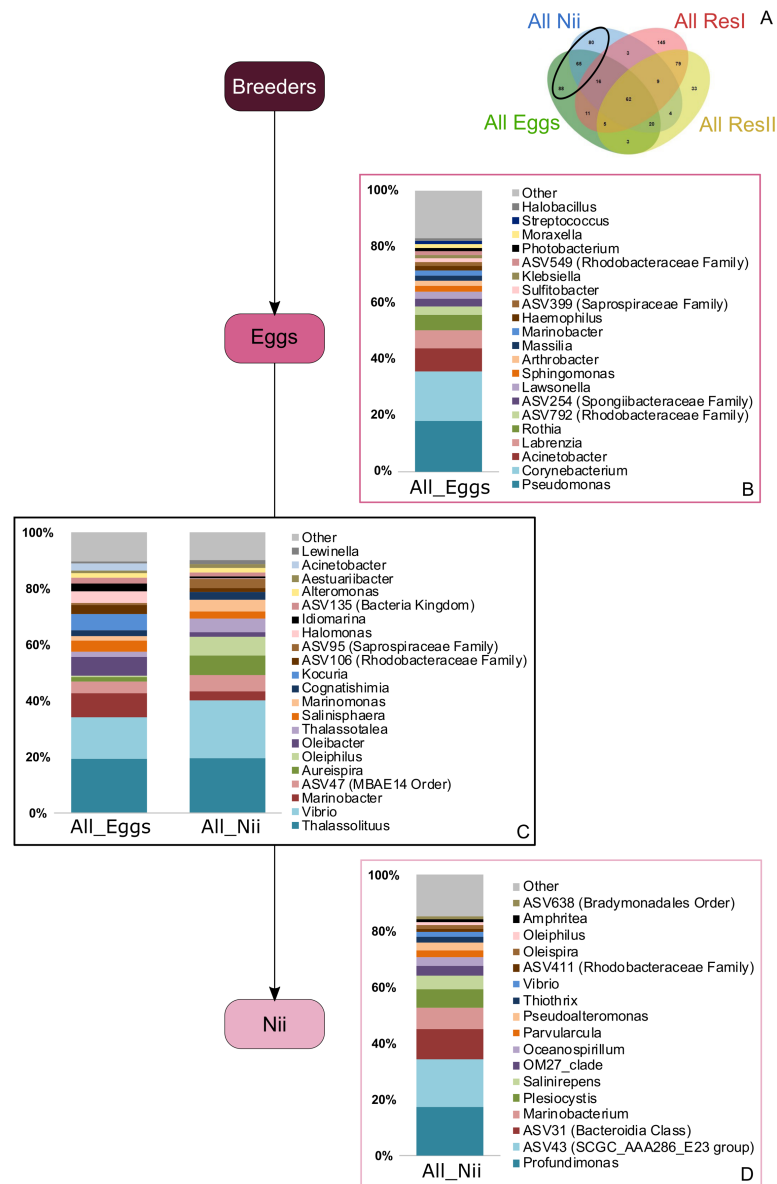


Figure 5 Bacterial communities associated with the eggs and the nauplii. Top bacterial lineages (up to genus when possible) with a relative abundance higher than 1% and specifically found in (A) the egg and the nauplius (nii). Histograms were built using the abundance of the selected subset of ASVs. Top bacterial lineages (B) uniquely found in the egg samples (88 ASVs, in green in the Venn diagram), (C) shared between all the egg and the nauplius (nii) samples (65 ASVs, in the intersection of the green and blue ellipses) and (D) uniquely found in the nauplius (nii) samples (88 ASVs, in blue in the Venn diagram). The arrows represent the potential ASV transmission among compartments.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.12241/fig-5](https://doi.org/10.7717/peerj.12241/fig-5)

(Weiss et al., 2017) which were quite abundant in our dataset. A recent study showed that simpler methods lead to satisfying normalizations (Bushel et al., 2020). Thus, we chose the Count Per Million (CPM) method which enabled hierarchical clustering of the samples according to their bacterial compositions rather than their sequencing runs.

Chemico-physical and microbial quality of the water samples

CDOM concentrations were constant throughout all the water samples. However, SR values decreased from the primary to the secondary reservoirs during the M1 experiment and opposite tendencies were observed during the M3 and M4 experiments (Table 1). Shifts in SR can be correlated to molecular weight and composition modifications of the dissolved organic matter (Helms et al., 2009) suggesting that such changes occurred in the reservoirs and were of different natures during the M1 experiment compared to the M3 and M4 experiments. Overall, all the water samples showed a large abundance of Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria (Fig. 1B) which are respectively dominant classes in pelagic and benthic marine environments (Zinger et al., 2011). The primary reservoirs and the M1_ResII sample were also majorly composed of Acidimicrobiia, Cyanobacteriia and Bacteroidia, 3 classes previously identified in pelagic environments and marine ecosystems (Giovannoni & Stingl, 2005; Zinger et al., 2011). The M3 and M4 secondary reservoirs respectively displayed important abundances of Planctomycetes and Verrucomicrobiae which have been found in soil, freshwater (Australian dam, Hungarian pond) and seawater (the Californian Current) (Fuerst, 1995; Freitas et al., 2012). CDOM measurements and bacterial compositions in water are known to be correlated factors (Judd, Crump & Kling, 2006). A change in the CDOM measurements can result in a change of the microbiota and *vice versa*. Thus, it is quite difficult to distinguish the cause and the consequence. However, both these factors can also be influenced by seasonal variations (Osterholz et al., 2018). As our samplings occurred between September 2018 and February 2019, seasonal variations could explain the differences observed in our samples in terms of SR tendencies and differential bacterial communities. However, as the primary reservoirs were quite similar and were a closer reflection of the natural conditions, the differences observed in the secondary reservoirs may also be explained by other factors. As we performed RNA extractions, we studied active prokaryotic communities (Blazewicz et al., 2013). We can thus hypothesize that differences in bacterial compositions, and therefore in CDOM profiles, may be due to different active microorganisms throughout the water treatments.

Specific bacterial communities associated with the primary reservoir samples were dominated by 4 marine groups (*OM60 Clade*, *Sva0996*, *MB11c04* and *NS5*) (Fig. 3B). They have been identified as crucial communities in the marine environment and have been found in various ecosystems ranging from marine sediments and surface seawaters to polar and coastal marine ecosystems (Suzuki et al., 2001; Cho et al., 2007; Gómez-Pereira et al., 2010; Orsi et al., 2016). Specific ASVs were common to the primary and the secondary reservoirs (Fig. 3C) and were dominated by members of *Candidatus Actinomarina*, *Synechococcus* and *SAR116*. These bacterial groups are ubiquitous in marine ecosystems and are known as or linked to primary producers (Britschgi & Giovannoni, 1991;

Partensky & Vaultot, 1999; Ghai et al., 2013). This could suggest that these communities are present in the Saint Vincent Bay and persist throughout the reservoirs. However, specific ASVs associated with the secondary reservoirs ([Fig. 3D](#)) were largely dominated by an ASV affiliated to the *Pedospaeraceae* family (Verrucomicrobiae class) suggesting that the water treatments between the primary and secondary reservoirs could select some bacterial communities. This has already been noticed by *Vadstein et al.* who showed that UV treatment of rearing water induced selection of fast-growing and opportunistic bacteria (*Vadstein et al., 2018*). The water samples considered in this study were collected before addition of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in the hatching tanks. To our knowledge, there is very few information about the effect of this metal chelator on active microbial communities in water. Thus, further investigations will be necessary to evaluate the role of EDTA on the microbiotas associated with the rearing water and the animals in shrimp hatcheries.

Putative factors influencing the microbial communities associated with the eggs and the nauplii of *L. stylirostris*

In the egg and the nauplius samples, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria and Bacteroidia dominated ([Fig. 1B](#)). These classes have been identified in larvae of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at early developmental stage (*Pangastuti et al., 2009; Zheng et al., 2017*) but also in the intestines of adult black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) (*Rungrassamee et al., 2013*). Eggs showed members of the Fusobacteriia class which have also been identified in adult shrimps (*Rungrassamee et al., 2016; Zeng et al., 2017*) indicating a possible preservation of bacterial communities throughout the whole lifecycle of shrimps. Overall, all the considered samples displayed similar bacterial compositions suggesting that the microbiotas of the eggs and the nauplii could also be influenced by their rearing environments ([Fig. 1B](#)). A total of 62 ASVs were shared among all compartments ([Fig. 2B](#)) and were considered to be the core microbiota of all our samples (*Shade & Handelsman, 2012*). *Aesuariibacter*, *Alteromonas* and *Vibrio*, which are ubiquitous genera in marine (*Chan et al., 1978; Yi, Bae & Chun, 2004; Farmer et al., 2015*), were present in all the samples but dominated the eggs and the nauplii ([Figs. 4D and 4E](#)). Bacteria affiliated to *Alteromonas* and *Vibrio* produce extracellular hydrolases involved in the biodegradation of various organic carbon sources (*Chan et al., 1978; Farmer et al., 2015*). *Vibrios* are also known to express genes involved in the metabolic degradation of chitin (*Hunt et al., 2008*), an important component of the exoskeleton of the nauplii. As mouth opening occurs after the nauplius stage in *Litopenaeus* shrimps (*Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b*), the vitellus is the only nutrient and energy resource until the zoea stage (*Harrison, 1997*). Thus, these bacterial communities may be less represented in water and could find favorable organic carbon sources and growth conditions on the external layer of the eggs and the exoskeleton of the nauplii (*Hansen & Olafsen, 1999*). Indeed, the microorganisms that were more represented in the water samples were completely different and belonged to very common marine groups (HIMB11, SAR11, AEGEAN) (*Morris et al., 2002; Durham et al., 2014; Cram et al., 2015*). As it has been shown for other animal species (brown trout, coho salmon), the total

microbiota of the eggs and the nauplii may embrace the epibiota at the surface but also the endobiota (Nyholm, 2020).

Bacterial communities specifically associated with the egg samples (Fig. 5B) were dominated by *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Labrenzia*, 3 genera found in marine environments (Fournier & Richet, 2006; Palleroni, 2015; Raj Sharma et al., 2019) and which had already been studied during the development of *L. vannamei* and *P. monodon* (Rungrassamee et al., 2013; Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b). The egg samples were also composed of *Corynebacterium*, a genera isolated from coral mucus (Ben-Dov et al., 2009). The eggs finally displayed large abundances of *Rothia*, usually found in human mouth cavities (Tsuzukibashi et al., 2017) and considered as sample contaminants in vent shrimps (Methou et al., 2019). Like *Alteromonas* and *Vibrios*, *Pseudomonas* and *Corynebacterium* are able to degrade different organic carbon sources using extracellular enzymes and could thus find optimal growth conditions with shrimp eggs and the nauplii explaining why they were so abundant among these samples (Palleroni, 2015; Tsuzukibashi et al., 2017). Concerning *Labrenzia*, they are known to produce labrenzbactin, a catecholate-containing siderophore which demonstrates an antimicrobial activity against *Micrococcus luteus* (Raj Sharma et al., 2019). Interestingly, *M. luteus* and *Rothia* are both affiliated to the *Micrococcaceae* family and have been respectively identified in the hepatopancreas of healthy adult shrimps (*L. vannamei*) and in the eggs of vent shrimps (Durán-Avelar et al., 2018; Methou et al., 2019). This suggests that *Rothia*, may not be a sample contaminant as previously stated by Methou et al. (2019). Further investigations will be necessary in order to determine if this genus is part of the core microbiota of the eggs of *L. stylirostris* or not. Either way, all the ASVs that were not identified in the water environment could have been potentially vertically transmitted from the breeders. Vertical transmission has also been suggested in hydrothermal shrimps where the eggs were associated with specific bacterial communities that were not found in the environment (Methou et al., 2019). Intraovum vertical transmission has already been highlighted in farmed fish eggs, accounting for 20% of the total bacterial relative abundance in eggs (Hansen & Olafsen, 1999). Furthermore, a vertical transmission of 2 virus types has been proved using molecular techniques in the redclaw crayfish cultured in Australia (Jaroenram et al., 2021). Thus, supporting our hypothesis of a potential vertical transmission in the Pacific blue shrimp.

Just as the eggs, the nauplii also displayed specific bacterial communities that were not found in the other samples (Fig. 5D). The most abundant genera were *Profundimonas* and *Marinobacterium* which are both aerobic Gammaproteobacteria isolated from seawater samples (González et al., 1997; Cao et al., 2014). *Marinobacterium* have also been highlighted in pipefish as a potential beneficial bacterium to larvae (Beemelmanns et al., 2019) and some strains are also known to hydrolyse chitine suggesting that they could play an important role in growth at nauplius stage. These ASVs were specifically identified in the nauplius samples and could have been vertically transmitted as well as for the eggs. Once again, as we studied active microbial communities, we can hypothesize that some bacterial communities are acquired from breeders and are activated at different developmental stages.

The nauplius samples could also be under the influence of bacterial communities associated with the eggs as specific ASVs seemed to be transmitted between the 2 sample types (Fig. 5C). These communities were mainly composed of *Vibrio* and *Oleiphilus* which have been identified in several marine environments and animals (Golyskin et al., 2002; Farmer et al., 2015). *Aureispira* bacteria were also abundant. They have been isolated from marine sponges and algae and are thus frequently found in marine organisms (Hosoya et al., 2006). *Marinobacter* and *Thalassolituus* have been isolated in farmed shrimp experiments (Dineshkumar et al., 2014). *Thalassolituus* has also been identified at the nauplius stage of *L. vannamei* and has been suggested as a beneficial bacterium for larval development (Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b). *Vibrio* and *Thalassolituus* have also been identified in healthy adult shrimps (Rungrassamee et al., 2016; Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b) supporting our previous theory that some bacterial communities may be acquired from the breeders and kept throughout the whole lifecycle. Even though *Vibrio* sp. can be associated with diseases, they have been identified in adults and nauplii of *L. vannamei* shrimps regardless of their health status (Vandenberghé et al., 1999; Cornejo-Granados et al., 2017). Some species are even known to be selected in the environment by their host as symbionts (Nyholm & McFall-Ngai, 2004).

Possible dynamic interactions among compartments

Interestingly, five genera (*Vibrio*, *Marinobacter*, *Thalassotalea*, *Alteromonas* and *Aestuariibacter*) were found in the ASVs shared between the eggs and the nauplii (Fig. 5C) but also in the ASVs shared between the water reservoirs and the animals (Fig. 4). *Marinobacter* and *Aestuariibacter* have been identified in the rearing environment of adult *L. vannamei* and brackishwater shrimps (Chen et al., 2019; Dineshkumar et al., 2014). *Vibrio*, *Alteromonas* and *Thalassotalea* have all been spotted in *L. vannamei* at different developmental stages as well as in the surrounding water (Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b; Zhang et al., 2014; Zheng et al., 2017). In our study, these genera were highlighted from different ASVs in different compartments, suggesting that some taxa may be acquired from the aquatic environment by the eggs and the nauplii but also by the breeders which then potentially transmit them to their offspring, supporting the hypothesis of a possible vertical transmission of bacterial communities in *L. stylirostris* shrimp larvae (Fig. 6). This also shows that the microbiota associated to aquatic organisms and to their eggs are shaped by complex interactions between environmental and transmitted microorganisms (Sylvain & Derome, 2017).

CONCLUSIONS

To our knowledge, this study is the first to focus on the active microbiota of the eggs and the nauplii of a farmed shrimp species while considering the impact of the rearing water. Taken together, our results provide evidence of a core microbiota (*Aestuariibacter*, *Alteromonas*, *Vibrio*, SAR11, HIMB11, AEGEAN 169 marine group, *Candidatus Endobugula*) among all samples suggesting a microbial transmission from the surrounding environment to the animals. As several ASVs were co-owned between the eggs and the nauplii, we also highlight a possible vertical transmission between the two compartments and potentially from the

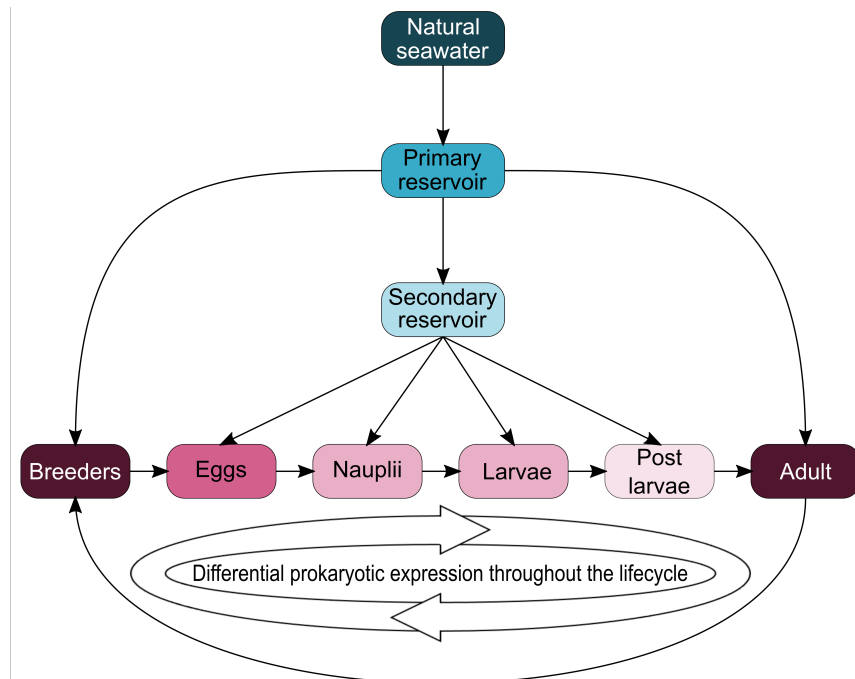


Figure 6 Schematic representation of potential microbial transmission and expression throughout the lifecycle of *Litopenaeus stylirostris*. The arrows represent potential lineage transmissions.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.12241/fig-6](https://doi.org/10.7717/peerj.12241/fig-6)

breeders as specific ASVs were not found in the rearing water (affiliated to *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Labrenzia*, *Rothia*, *Thalassolituus*, *Marinobacter*, *Aureispira*, *Oleiphilus*, *Profundimonas*, *Marinobacterium*) (Fig. 6). This last point has not yet been confirmed as several male breeders are used to inseminate several females which produce eggs that are pooled before larval rearing, thus making it quite difficult to determine the genealogy of the shrimps and their offspring.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the SASV teams for their help throughout all the experiments: zootechny and laboratory support. We especially thank Jean-Sébastien Lam and Julien Le Rohellec for their precious help in the hatchery; Florence Antypas and Etienne Lopez for their contribution; as well as Valentine Ballan and Gwenola Plougoulen for their valuable biomolecular work.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This work was supported by the RESSAC project (LEAD-NC, Ifremer New-Caledonia) within the framework agreement with the New Caledonian Provinces and Government and by the Pacific Doctoral School. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:
The RESSAC project (LEAD-NC, Ifremer New-Caledonia) within the framework agreement with the New Caledonian Provinces and Government and by the Pacific Doctoral School.

Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

Author Contributions

- Carolane Giraud analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Nolwenn Callac conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Maxime Beauvais performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Jean-René Mailliez, Dominique Ansquer and Dominique Pham performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Nazha Selmaoui-Folcher conceived and designed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Nelly Wabete and Viviane Boulo conceived and designed the experiments, performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

Data is available at NCBI SRA repository under the submission ID SUB9823633 and BioProject ID [PRJNA736535](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA736535).

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.12241#supplemental-information>.

REFERENCES

Allali I, Arnold JW, Roach J, Cadenas MB, Butz N, Hassan HM, Koci M, Ballou A, Mendoza M, Ali R, Azcarate-Peril MA. 2017. A comparison of sequencing platforms

- and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiology* **17**(1):1–16 DOI [10.1186/s12866-017-1101-8](https://doi.org/10.1186/s12866-017-1101-8).
- Apprill A.** 2017. Marine animal microbiomes: toward understanding host-microbiome interactions in a changing ocean. *Frontiers in Marine Science* **4**(JUL):1–9 DOI [10.3389/fmars.2017.00222](https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00222).
- Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C, Klopp C.** 2014. SOFTWARE Open Access jvrenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* **15**(293):1–7.
- Beemelmans A, Poirier M, Bayer T, Kuenzel S, Roth O.** 2019. Microbial embryonal colonization during pipefish male pregnancy. *Scientific Reports* **9**(1):1–14 DOI [10.1038/s41598-018-37026-3](https://doi.org/10.1038/s41598-018-37026-3).
- Beliaeff B, Chim L, Della Patrona L, Goyard E, Herlin J, Labreache Y, Walling E, Ansquer D, Brun P, Castex M, Coatanea D, Courties C, De Lorgeril J, Dufour R, Frappier J, Goarant C, Huber M, Lemaire P, Lemonnier H, Le Roux F, Loubersac L, Lucas R, Patrois J, Peignon J-M, Pham D, Ramage Y, Soulard B, Vic M, Vourey E, Wabete N.** 2009. DEDUCTION: a research project for shrimp farming sustainability in New Caledonia. In: *The 11th Pacific Science Inter-Congress : Pacific Countries and their Ocean : Facing Local and Global Changes*. Tahiti, French Polynesia.
- Ben-Dov E, Yosef DZB, Pavlov V, Kushamro A.** 2009. *Corynebacterium maris* sp. nov., a marine bacterium isolated from the mucus of the coral *Fungia granulosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(10):2458–2463 DOI [10.1099/ijs.0.007468-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.007468-0).
- Blazewicz SJ, Barnard RL, Daly RA, Firestone MK.** 2013. Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *ISME Journal* **7**(11):2061–2068 DOI [10.1038/ismej.2013.102](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.102).
- Britschgi TB, Giovannoni SJ.** 1991. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **57**(6):1707–1713 DOI [10.1128/aem.57.6.1707-1713.1991](https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1707-1713.1991).
- Bushel PR, Ferguson SS, Ramaiahgari SC, Paules RS, Auerbach SS.** 2020. Comparison of normalization methods for analysis of TempO-Seq Targeted RNA sequencing data. *Frontiers in Genetics* **11**(June):1–11 DOI [10.3389/fgene.2020.00594](https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00594).
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP.** 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* **11**(12):2639–2643 DOI [10.1038/ismej.2017.119](https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119).
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP.** 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**(7):581–583 DOI [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869).
- Cao Y, Chastain RA, Eloe EA, Nogi Y, Kato C, Bartletta DH.** 2014. Novel psychropiezophilic oceanospirillales species *profundimonas piezophila* gen. nov., sp. nov. isolated from the deep-sea environment of the puerto rico trench. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(1):54–60 DOI [10.1128/AEM.02288-13](https://doi.org/10.1128/AEM.02288-13).

- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(SUPPL. 1):4516–4522 DOI 10.1073/pnas.1000080107.
- Chan KY, Baumann L, Garza MM, Baumann P. 1978. *Alteromonas*: *alteromonas espejiana*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28(2):217–222.
- Chen Z, Chang Z, Zhang L, Jiang Y, Ge H, Song X, Chen S, Zhao F, Li J. 2019. Effects of water recirculation rate on the microbial community and water quality in relation to the growth and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *BMC Microbiology* 19(1):1–15 DOI 10.1186/s12866-019-1564-x.
- Cho I, Blaser MJ. 2012. APPLICATIONS OF NEXT-GENERATION SEQUENCING The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* 13(4):260–270 DOI 10.1038/nrg3182.The.
- Cho JC, Stapels MD, Morris RM, Vergin KL, Schwalbach MS, Givan SA, Barofsky DF, Giovannoni SJ. 2007. Polyphyletic photosynthetic reaction centre genes in oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Environmental Microbiology* 9(6):1456–1463 DOI 10.1111/j.1462-2920.2007.01264.x.
- Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Gallardo-Becerra L, Mendoza-Vargas A, Sánchez F, Vichido R, Brieba LG, Viana MT, Sotelo-Mundo RR, Ochoa-Leyva A. 2017. Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports* 7(1):11783 DOI 10.1038/s41598-017-11805-w.
- Cram JA, Xia LC, Needham DM, Sachdeva R, Sun F, Fuhrman JA. 2015. Cross-depth analysis of marine bacterial networks suggests downward propagation of temporal changes. *ISME Journal* 9(12):2573–2586 DOI 10.1038/ismej.2015.76.
- Dineshkumar N, Saravanakumar C, Vasanth M, Muralidhar M, Alavandi SV. 2014. Genetic and physiological characterization of denitrifying bacteria from brackishwater shrimp culture ponds of India. *International Biodeterioration and Biodegradation* 92:49–56 DOI 10.1016/j.ibiod.2014.04.017.
- Durán-Avelar M de J, Vázquez-Reyes A, González-Mercado AL, Zambrano-Zaragoza JF, Ayón-Pérez MF, Agraz-Cibrián JM, Gutiérrez-Franco J, Vibanco-Pérez N. 2018. *pirA*- and *pirB*-like gene identification in *Micrococcus luteus* strains in Mexico. *Journal of Fish Diseases* 41(11):1667–1673 DOI 10.1111/jfd.12874.
- Durham BP, Grote J, Whittaker KA, Bender SJ, Luo H, Grim SL, Brown JM, Casey JR, Dron A, Florez-Leiva L, Krupke A, Luria CM, Mine AH, Nigro OD, Pather S, Talarmin A, Wear EK, Weber TS, Wilson JM, Rappé MS. 2014. Draft genome sequence of marine alphaproteobacterial strain HIMB11, the first cultivated representative of a unique lineage within the Roseobacter clade possessing an unusually small genome. *StandArds in Genomic Sciences* 9(3):632–645 DOI 10.4056/sigs.4998989.
- Egan S, Gardiner M. 2016. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 7(JUN):1–8 DOI 10.3389/fmicb.2016.00991.
- Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. 2008. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* 320(5879):1034–1039 DOI 10.1126/science.1153213.

- Farmer JJ, Janda JMichael, Brenner FW, Cameron DN, Birkhead KM. 2015.** *Vibrio*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. in association with Bergey's Manual Trust, 1–79 DOI [10.1002/9781118960608.gbm01078](https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01078).
- Fournier PE, Richet H. 2006.** The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases* **42**(5):692–699 DOI [10.1086/500202](https://doi.org/10.1086/500202).
- Freitas S, Hatosy S, Fuhrman JA, Huse SM, Mark Welch DB, Sogin ML, Martiny AC. 2012.** Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *ISME Journal* **6**(8):1499–1505 DOI [10.1038/ismej.2012.3](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.3).
- Fuerst JA. 1995.** The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology* **141**(7):1493–1506 DOI [10.1099/13500872-141-7-1493](https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1493).
- Galili T. 2015.** dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics* **31**(22):3718–3720 DOI [10.1093/BIOINFORMATICS/BTV428](https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV428).
- Ghai R, Mizuno CM, Picazo A, Camacho A, Rodriguez-Valera F. 2013.** Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Scientific Reports* **3**:2471 DOI [10.1038/srep02471](https://doi.org/10.1038/srep02471).
- Giovannoni SJ, Stingl U. 2005.** Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* **437**(7057):343–348 DOI [10.1038/nature04158](https://doi.org/10.1038/nature04158).
- Glassman SI, Martiny JBH. 2018.** Broad-scale ecological patterns are robust to use of exact. *MSphere* **3**(4):e00148–18.
- Goarant C, Ansquer D, Herlin J, Domalain D, Imbert F, De Decker S. 2006.** Summer Syndrome in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* **253**(1–4):105–113 DOI [10.1016/j.aquaculture.2005.07.031](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.031).
- Goarant C, Merien F, Berthe F, Mermoud I, Perolat P. 1999.** Arbitrarily primed PCR to type *vibrio* spp. pathogenic for shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(3):1145–1151 DOI [10.1128/AEM.65.3.1145-1151.1999](https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1145-1151.1999).
- Golyshin PN, N Chernikova Ta., Abraham WR, Lünsdorf H, Timmis KN, Yaki-mov MM. 2002.** Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov. sp. nov. a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(3):901–911 DOI [10.1099/ijs.0.01890-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.01890-0).
- Gómez-Pereira PR, Fuchs BM, Alonso C, Oliver MJ, Van Beusekom JE, Amann R. 2010.** Distinct flavobacterial communities in contrasting water masses of the North Atlantic Ocean. *ISME Journal* **4**(4):472–487 DOI [10.1038/ismej.2009.142](https://doi.org/10.1038/ismej.2009.142).
- González JM, Mayer F, Moran MA, Hodson RE, Whitman WB. 1997.** *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov. and *Marinobacterium georgiense* gen. nov. sp. nov. two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(2):369–376 DOI [10.1099/00207713-47-2-369](https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-369).

- Hansen GH, Olafsen JA. 1999.** Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* **38**(1):1–26 DOI [10.1007/s002489900158](https://doi.org/10.1007/s002489900158).
- Harrison KE. 1997.** Broodstock nutrition and maturation diets. In: D'Abramo LR, Conklin DE, Akiyama DM, eds. *Advances in world aquaculture (volume 6), crustacean nutrition*. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 390–408.
- Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K. 2009.** Erratum: absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* **54**(3):1023–1023 DOI [10.4319/lo.2009.54.3.1023](https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.3.1023).
- Hosoya S, Arunpairojana V, Suwannachart C, Kanjana-Opas A, Yokota A. 2006.** *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov. a gliding, arachidonic acid-containing bacterium isolated from the southern coastline of Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(12):2931–2935 DOI [10.1099/ijs.0.64504-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.64504-0).
- Hunt DE, Gevers D, Vahora NM, Polz MF. 2008.** Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(1):44–51 DOI [10.1128/AEM.01412-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01412-07).
- Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, Creasy HH, Earl AM, Fitzgerald MG, Fulton RS, Giglio MG, Hallsworth-Pepin K, Lobos EA, Madupu R, Magrini V, Martin JC, Mitreva M, Muzny DM, Sodergren EJ, White O. 2012.** Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**(7402):207–214 DOI [10.1038/nature11234](https://doi.org/10.1038/nature11234).
- Jaroenram W, Owens L, Hayakijkosol O, Elliman J. 2021.** Natural, in ovo, vertical transmission of the RNA viruses, Chequa iflavivirus and Athtab bunyavirus, but not Cherax reovirus in redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* **534**(2020):736285 DOI [10.1016/j.aquaculture.2020.736285](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736285).
- Judd KE, Crump BC, Kling GW. 2006.** Variation in dissolved organic matter controls bacterial production and community composition. *Ecology* **87**(8):2068–2079 DOI [10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2068:VIDOMC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2068:VIDOMC]2.0.CO;2).
- McMurdie PJ, Holmes S. 2014.** Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLOS Computational Biology* **10**(4):e1003531 DOI [10.1371/journal.pcbi.1003531](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531).
- Methou P, Hernández-Ávila I, Aube J, Cueff-Gauchard V, Gayet N, Amand L, Shillito B, Pradillon F, 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**(MAR):1–19 DOI [10.3389/fmicb.2019.00808](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00808).
- Moloney RD, Desbonnet L, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. 2014.** The microbiome: stress, health and disease. *Mammalian Genome* **25**(1–2):49–74 DOI [10.1007/s00335-013-9488-5](https://doi.org/10.1007/s00335-013-9488-5).
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. 2011.** How many species are there on earth and in the ocean? *PLOS Biology* **9**(8):1–8 DOI [10.1371/journal.pbio.1001127](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127).

- Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, Giovannoni SJ. 2002.** SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420(6917)**:806–810 DOI [10.1038/nature01240](https://doi.org/10.1038/nature01240).
- Nyholm SV. 2020.** In the beginning: egg-microbe interactions and consequences for animal hosts: egg microbiomes in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **375(1808)**:20190593 DOI [10.1098/rstb.2019.0593rstb20190593](https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0593rstb20190593).
- Nyholm SV, McFall-Ngai MJ. 2004.** The winnowing: establishing the squid - Vibrios symbiosis. *Nature Reviews Microbiology* **2(8)**:632–642 DOI [10.1038/nrmicro957](https://doi.org/10.1038/nrmicro957).
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2020.** CRAN - Package vegan. Available at <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>.
- Orsi WD, Smith JM, Liu S, Liu Z, Sakamoto CM, Wilken S, Poirier C, Richards TA, Keeling PJ, Worden AZ, Santoro AE. 2016.** Diverse, uncultivated bacteria and archaea underlying the cycling of dissolved protein in the ocean. *ISME Journal* **10(9)**:2158–2173 DOI [10.1038/ismej.2016.20](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.20).
- Osterholz H, Kirchman DL, Niggemann J, Dittmar T. 2018.** Diversity of bacterial communities and dissolved organic matter in a temperate estuary. *FEMS Microbiology Ecology* **94(8)**:1–11 DOI [10.1093/femsec/fiy119](https://doi.org/10.1093/femsec/fiy119).
- Palleroni NJ. 2015.** Pseudomonas. In: *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Hoboken: John Wiley & Sons Inc. in association with Bergey's Manual Trust DOI [10.1002/9781118960608.gbm01210](https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210).
- Pangastuti A, Suwanto A, Lestari Y, Tennawijaya Suhartono M. 2009.** Bacterial communities associated with white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at early developmental stages. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* **11(2)**:65–68 DOI [10.13057/biodiv/d110203](https://doi.org/10.13057/biodiv/d110203).
- Partensky F, Vaulot D. 1999.** Cyanobacterial photosynthetic apparatus: an overview. *Marine Cyanobacteria* **19(19)**:457–475.
- Pham D, Charmantier G, Wabete N, Boulo V, Broutoi F, Mailliez J-R, Peignon J-M, Charmantier-Daures M. 2012.** Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris* Decapoda, Penaeidae. *Aquaculture* **362–363**:10–17 DOI [10.1016/j.aquaculture.2012.07.026](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.026).
- Porter TM, Hajibabaei M. 2020.** Putting COI metabarcoding in context : the utility of exact sequence variants (esvs) in biodiversity analysis. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**:248 DOI [10.3389/fevo.2020.00248](https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00248).
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Doi Glöckner FO. 2013.** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41(D1)**:590–596 DOI [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219).
- Raj Sharma A, Zhou T, Harunari E, Oku N, Trianto A, Doi Igarashi Y. 2019.** Labrenzbactin from a coral-associated bacterium *Labrenzia* sp. *Journal of Antibiotics* **72(8)**:634–639 DOI [10.1038/s41429-019-0192-x](https://doi.org/10.1038/s41429-019-0192-x).

- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2009.** edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1):139–140 DOI 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Rungrassamee W, Klanchui A, Chaiyapechara S, Maibunkaew S, Tangphatsornruang S, Jiravanichpaisal P, Doi Karoonuthaisiri N. 2013.** Bacterial population in intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. *PLOS ONE* 8(4):e60802 DOI 10.1371/journal.pone.0060802.
- Rungrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, Doi Karoonuthaisiri N. 2016.** Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *Journal of Invertebrate Pathology* 133:12–19 DOI 10.1016/j.jip.2015.11.004.
- Sadeghi-Nassaj SM, Catalá TS, Álvarez PA, Doi Reche I. 2018.** Sea cucumbers reduce chromophoric dissolved organic matter in aquaculture tanks. *PeerJ* 2018(2):1–20 DOI 10.7717/peerj.4344.
- Sehnal L, Brammer-Robbins E, Wormington AM, Blaha L, Bisesi J, Larkin I, Martyniuk CJ, Simonin M, Doi Adamovsky O. 2021.** Microbiome composition and function in aquatic vertebrates: small organisms making big impacts on aquatic animal health. *Frontiers in Microbiology* 12:5674408 DOI 10.3389/fmicb.2021.567408.
- Shade A, Handelsman J. 2012.** Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology* 14(1):4–12 DOI 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x.
- Suzuki MT, Béjà O, Taylor LT, Doi De Long EF. 2001.** Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. *Environmental Microbiology* 3(5):323–331 DOI 10.1046/j.1462-2920.2001.00198.x.
- Sylvain FÉ, Derome N. 2017.** Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Scientific Reports* 7(1):1–14 DOI 10.1038/s41598-017-05662-w.
- R Studio Team. 2020.** RStudio: integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA: Available at <http://www.rstudio.com/>.
- Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Doi Ochiai T. 2017.** Isolation and identification methods of *Rothia* species in oral cavities. *Journal of Microbiological Methods* 134:21–26 DOI 10.1016/j.mimet.2017.01.005.
- Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Doi Olsen Y. 2018.** K-selection as microbial community management strategy: a method for improved viability of larvae in aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 9(NOV):1–17 DOI 10.3389/fmicb.2018.02730.
- Vandenberghe J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Baladares M, Gomez-Gil B, Calderon J, Sorgeloos P, Doi Swings J. 1999.** Vibrios associated with *litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2592–2597 DOI 10.1128/AEM.65.6.2592-2597.1999.
- Wang H, Huang J, Wang P, Li TDoi. 2020a.** Insights into the microbiota of larval and postlarval Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) along early developmental

- stages: a case in pond level. *Molecular Genetics and Genomics* **295**(6):1517–1528 DOI [10.1007/s00438-020-01717-2](https://doi.org/10.1007/s00438-020-01717-2).
- Wang Y, Wang K, Huang L, Dong P, Wang S, Chen H, Lu Z, Hou D, Doi Zhang D. 2020b.** Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome* **8**(1):106 DOI [10.1186/s40168-020-00879-w](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00879-w).
- Weiss S, Xu ZZ, Peddada S, Amir A, Bittinger K, Gonzalez A, Lozupone C, Zaneveld JR, Vázquez-Baeza Y, Birmingham A, Hyde ER, Doi Knight R. 2017.** Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* **5**(1):27 DOI [10.1186/s40168-017-0237-y](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y).
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998.** Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(12):6578–6583 DOI [10.1073/pnas.95.12.6578](https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578).
- Wickham H. 2016.** *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wickham H, François R, Henry L, Müller KDoi. 2021.** CRAN - Package dplyr. Available at <https://cran.r-project.org/web/packages/dplyr/index.html>.
- Yi H, Bae KS, Chun J. 2004.** *Aestuariibacter salexigens* gen. nov., sp. nov. and *Aestuariibacter halophilus* sp. nov. isolated from tidal flat sediment, and emended description of *Alteromonas macleodii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(2):571–576 DOI [10.1099/ijs.0.02798-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.02798-0).
- Zeng S, Huang Z, Hou D, Liu J, Weng S, Doi He J. 2017.** Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ* **5**(11):e3986 DOI [10.7717/peerj.3986](https://doi.org/10.7717/peerj.3986).
- Zhang M, Sun Y, Chen K, Yu N, Zhou Z, Chen L, Du Z, Doi Li E. 2014.** Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture* **434**:449–455 DOI [10.1016/j.aquaculture.2014.09.008](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.008).
- Zheng Y, Yu M, Liu J, Qiao Y, Wang L, Li Z, Zhang X-H, Doi Yu M. 2017.** Bacterial community associated with healthy and diseased pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Frontiers in Microbiology* **8**(JUL):1–11 DOI [10.3389/fmicb.2017.01362](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01362).
- Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DBM, Martiny JBH, Sogin M, Boetius A, Doi Ramette A. 2011.** Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLOS ONE* **6**(9):1–11 DOI [10.1371/journal.pone.0024570](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024570).

IV.1.3- Synthèse des résultats et perspectives

Les premiers résultats de cette étude concernent la qualité des eaux de réserve primaire (eau de remplissage provenant du lagon) et secondaire (eau traitée stockée) récoltées au cours des 3 campagnes d'échantillonnage considérées (M1, M3, M4). Alors qu'une concentration constante en matière organique dissoute (CDOM, $a_{\lambda 325}$) a été observée dans l'ensemble des échantillons analysés, les SR ont montré des profils de variations différents d'une réserve à l'autre et d'une campagne à l'autre. En effet, au cours des campagnes M3 et M4, les valeurs de SR ont diminué entre les réserves primaire et secondaire alors qu'une tendance inverse a été constatée pour la campagne M1. Le SR étant un reflet de l'évolution du poids moléculaire de la matière organique dissoute, les variations observées témoignent de compositions physico-chimiques potentiellement différentes entre les réserves (Helms et al. 2009). En parallèle, des profils de diversité bactérienne distincts ont également été mis en évidence. Malgré des proportions relatives d'*Alphaproteobacteria* et de *Gammaproteobacteria* similaires dans l'ensemble des échantillons, des abondances relatives plus importantes de *Cyanobacteria*, d'*Acidimicrobia* et de *Bacteroidia* ont été observées dans toutes les réserves primaires ainsi que la réserve secondaire de la M1, alors que les réserves secondaires de la M3 et de la M4 étaient respectivement plus riches en *Planctomycetes* et *Verrucomicrobiaea*. Dans l'eau de mer, la matière organique dissoute et la diversité microbienne sont des paramètres corrélés et sont susceptibles d'être influencés par des facteurs naturels comme les saisons (Osterholz et al. 2018). Les échantillonnages de notre étude ayant été réalisés à des périodes différentes entre 2018 et 2019, les fluctuations observées en termes de SR et de compositions procaryotiques pourraient ainsi être expliquées par les variations saisonnières. Cependant, malgré des environnements d'élevage larvaire changeants, un core microbien de 62 ASVs a été mis en évidence. Bien que ces ASVs aient été présents dans l'ensemble des échantillons considérés, nous avons constaté des variations de leurs abondances relatives. En effet, des proportions plus importantes des genres *Aestuariibacter*, *Alteromonas* et *Vibrio* ont été observées dans les œufs et les larves au stade nauplius alors que les réserves montraient des abondances relatives plus importantes de bactéries affiliées aux groupes marins HIMB11, AEGEAN 169 et SAR11. Au cours de cette étude, les prélèvements d'eau ont été effectués en amont des prélèvements d'œufs et de larves nauplii. La persistance de certaines bactéries, provenant de l'environnement d'élevage, au moment de la mise en place du microbiote larvaire suggère ainsi un potentiel impact du microbiote de l'eau d'élevage. Certains taxa bactériens pourraient être horizontalement transmis de l'environnement d'élevage vers la surface des œufs et des larves au stade nauplius et ainsi former l'épibiote de ces derniers. Cependant, une internalisation de certains microorganismes pourrait également être possible. Au-delà du core microbien mis en évidence, plusieurs ASVs spécifiquement associés aux œufs et aux nauplii ont également été observés. Les œufs présentaient des ASVs spécifiques, affiliés aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Labrenzia*, *Corynebacterium* et *Rothia* alors que les larves au stade nauplius étaient distinctement associées à des *Profundimonas* et des *Marinobacterium*. Les ASVs partagés par les œufs et les larves au stade nauplius étaient affiliés aux genres *Vibrio*, *Oleiphilus*, *Aureispira*, *Marinobacter* et *Thalassolituus*. Certains de ces taxa bactériens (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Labrenzia*, *Corynebacterium*, *Marinobacter* et *Thalassolituus*) ont été mis en évidence, dans la littérature, chez d'autres espèces de crevettes à différents stades de développement suggérant une conservation de ces communautés microbiennes tout au long du cycle de vie des animaux. Ces microorganismes

Chapitre IV – Des transmissions horizontales et verticales modulent le microbiote actif des œufs et des nauplii de *Penaeus stylirostris*

n'ayant pas été observés dans les eaux de réserve au cours de l'analyse, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une potentielle transmission microbienne verticale des géniteurs vers les larves. Cependant, l'absence de données concernant les microorganismes associés aux géniteurs limitaient nos interprétations. De plus, les échantillonnages d'eau de réserve ayant été réalisés en amont du remplissage des bacs d'élevage et donc en amont du traitement aux ultra-violets et de l'ajout d'EDTA (chap. II, partie II.1.1.a), il est possible que les échantillons considérés ne soient pas un reflet exact de l'environnement d'élevage des œufs et des larves au stade nauplius. Une étude complémentaire a donc été conduite afin d'évaluer plus précisément les facteurs influençant la mise en place du microbiote des œufs et des larves nauplii de la crevette bleue du Pacifique.

IV.2- Étude B – Contributions des géniteurs et de l'eau d'élevage au cours de la mise en place du microbiote larvaire

IV.2.1- Introduction

La découverte de communautés procaryotiques spécifiquement associées aux œufs et aux larves nauplii de *P. stylirostris* au cours de l'étude A (article 1, partie IV.1.2) suggérait l'influence d'une potentielle transmission verticale de certains procaryotes des géniteurs vers les larves. Ce processus a déjà été décrit chez l'humain où l'acquisition du microbiote intestinal, initié dès la naissance des nouveaux nés, est dépendante de certaines communautés microbiennes provenant de la mère. En effet, il a été montré que des nourrissons nés par voie basse présentaient des bactéries intestinales proches de celles du vagin alors que ceux nés par césarienne possédaient des communautés similaires à celles de la peau. Il a également été prouvé que les bactéries productrices d'acide lactique (*Lactobacilli*) provenant du lait maternel prédominaient les premiers microorganismes du tube digestif (Cho & Blaser 2012). Chez les organismes marins, et plus particulièrement chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, une transmission verticale de la bactérie pathogène *Piscirickettsia salmonis* a été mise en évidence. Des fécondations *in vitro* réalisées à partir de gamètes provenant de géniteurs infectés ont montré que la présence d'un seul gamète infecté suffisait à assurer une transmission bactérienne aux larves (même si les larves obtenues ne présentaient aucun signe de maladie). Par une approche de microscopie électronique à balayage, les auteurs ont également montré que les bactéries étaient capables d'adhérer à la surface de l'ovule puis d'être complètement internalisées 5 minutes après la première exposition bactérienne (Larenas et al. 2003). De manière générale, plusieurs mécanismes de transmission verticale de symbiotes ont été mis en évidence chez les poissons. Les microorganismes peuvent ainsi être directement transmis à l'intérieur ou à la surface de l'œuf mais peuvent aussi être présents dans l'environnement des œufs ou des larves (Nyholm, 2020). Par exemple, chez le *Discus Symphysodon aequifasciatus*, les larves se nourrissent du mucus de leurs parents au cours des 3 premières semaines post-éclosion et acquièrent ainsi certaines des communautés microbiennes épibiotiques de leurs géniteurs (Sylvain & Derome 2017). En 2019, une étude comparative des pléopodes et des œufs de crevettes hydrothermales *Rimicaris exoculata* a mis en évidence un ordre bactérien (*Entomoplasmatales*) exclusivement présent à la surface des œufs. Les auteurs ont suggéré qu'il pourrait provenir du microbiote intestinal maternel et être émis au moment de la ponte (Methou et al. 2019). Ces différentes études laissent à penser que les géniteurs pourraient jouer un rôle important dans la mise en place des communautés microbiennes de leurs

Chapitre IV – Des transmissions horizontales et verticales modulent le microbiote actif des œufs et des nauplii de *Penaeus stylirostris*

progénitures. Afin d'évaluer la possibilité d'un tel processus de transmission verticale bactérienne chez *P. stylirostris*, des inséminations artificielles ont été réalisées pour produire 3 familles biparentales. Pour chaque famille, des échantillons d'organes reproducteurs femelles et mâles ainsi que d'œufs et de larves au stade nauplius ont été prélevés (chap. II, partie II.2.2). L'eau contenue dans chaque pondoir a également été échantillonnée après traitement et ajout d'EDTA (chap. II, partie II.1.1.a). Après des extractions d'ARNs et des rétrotranscriptions en ADNc réalisées à partir de l'ensemble des échantillons considérés, un séquençage Illumina HiSeq (2 x 150pb) a été effectué. Les données de séquençage ont été traitées avec le package DADA2 (Callahan et al. 2016) (chap. III, partie III.3.2) sous RStudio (chap. II, partie II.5.2). Une classification ascendante hiérarchique basée sur une matrice de distance de Bray-Curtis et sur la méthode de Ward, ainsi que des histogrammes et des diagrammes de Venn ont été construits (détaillé dans le chap. II, partie II.5.3).



The Active Microbiota of the Eggs and the Nauplii of the Pacific Blue Shrimp *Litopenaeus stylirostris* Partially Shaped by a Potential Vertical Transmission

OPEN ACCESS

Edited by:

Seyed Hossein Hoseinifar,
Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources, Iran

Reviewed by:

Zhijian Huang,
Sun Yat-sen University, China
Tomoo Sawabe,
Hokkaido University, Japan

*Correspondence:

Caroline Giraud
cgiraud@ifremer.fr
Nolwenn Callac
ncallac@ifremer.fr

¹Present address:

Viviane Boulo,
IHPE, Université de Montpellier,
CNRS, Ifremer, Université de
Perpignan Via Domitia, Montpellier,
France

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Symbioses,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 28 February 2022

Accepted: 22 April 2022

Published: 12 May 2022

Citation:

Giraud C, Callac N, Boulo V,
Lam J-S, Pham D,
Selmaoui-Folcher N and
Wabete N (2022) The Active
Microbiota of the Eggs and the
Nauplii of the Pacific Blue Shrimp
Litopenaeus stylirostris Partially
Shaped by a Potential Vertical
Transmission.
Front. Microbiol. 13:886752.
doi: 10.3389/fmicb.2022.886752

Caroline Giraud^{1,2*}, Nolwenn Callac^{1*}, Viviane Boulo^{1†}, Jean-Sébastien Lam¹,
Dominique Pham¹, Nazha Selmaoui-Folcher² and Nelly Wabete¹

¹UMR 9220 ENTROPIE, Ifremer (LEAD-NC), Noumea, New Caledonia, ²Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA),
University of New Caledonia, Noumea, New Caledonia

The many ecological niches present in an organism harbor distinct microorganisms called microbiota. Different factors can influence the establishment of these commensal microbial communities. In a previous article, we have concluded that some bacterial lineages associated with the early larval stages of the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* could be acquired from the breeders via a potential vertical transmission. The present study was conducted in order to investigate this hypothesis. Using HiSeq sequencing of the V4 region of 16S rRNA gene, we analyzed the active microbiota associated with the eggs and the nauplii of *L. stylirostris* as well as with the reproductive organs of their breeders. Microbial communities associated with the rearing water were also considered to discriminate environmental microbial lineages. Using these analyses, we highlight a set of core bacterial families present in all samples and composed of members of Colwelliaceae, Alteromonadaceae, Pseudoalteromonadaceae, Saccharospirillaceae, Oceanospirillaceae, Vibrionaceae, Burkholderiaceae, Rhodobacteraceae, Flavobacteraceae, and Corynebacteriaceae; showing the importance of the environment in the establishment of the larval microbiota. We also present specific bacteria affiliated to the Arcobacteraceae, Rhodobacteraceae, Comamonadaceae, and Colwelliaceae families, which were only found in the breeders and their offspring strengthening the hypothesis of a potential vertical transmission shaping the active microbiota of the eggs and the nauplii of *L. stylirostris*.

Keywords: active microbiota, shrimps, eggs, nauplii, vertical transmission, microbial colonization, core microbiota

INTRODUCTION

In animals and plants, temperature, pH, and oxygen levels as well as nutrient accessibility vary throughout the organism resulting in many different available ecological niches (Ikeda-Ohtsubo et al., 2018). These contrasting environments can be colonized by various and distinct microorganisms. Microorganisms associated with organs covered by epithelial cells and in

contact with the external environment of the host (gut, skin, oral cavity, urogenital, and respiratory tracts) are referred to as commensal microorganisms (Tlaskalová-Hogenová et al., 2004; Aas et al., 2005; Whiteside et al., 2015; Ikeda-Ohtsubo et al., 2018). All the microbial taxa inhabiting a given environment in a host form a microbiota (Ursell et al., 2012). In all organisms, the microbiota is known to have great importance in the health status of the host as it plays a key role in digestion, immunity, nutrient intake, development, and behavior (Cho and Blaser, 2012). In addition, studies have reported that microbiota dysbiosis is often linked to disease outbreak (Egan and Gardiner, 2016). Even though evidence is mounting on the essential role of the microbiota, very little is known about the establishment of these commensal microbial communities in a given tissue. Some studies suggest that environmental factors shape the microbiota. For example, studies have shown that diet influences the microorganisms associated with the gut of humans, fish, shrimps, and crabs (Nayak, 2010; Ursell et al., 2012; Sun and Xu, 2021). However, other factors can also be involved in the modulation of the microbiota such as host selection pressure and genetic background (Li et al., 2012; Sun and Xu, 2021). Interestingly, commensal microorganisms can also be transmitted from one generation to another *via* a vertical transmission. In humans, studies have shown that the microbiota of infants was similar to the vaginal microbiota of their mother after natural birth but mimicked the skin microbiota when caesarean section was performed (Cho and Blaser, 2012; Ursell et al., 2012). Vertical transmission of bacteria has also been suggested in marine organisms such as fish and sponges and has been experimentally proved in salmon (Larenas et al., 2003; Lee et al., 2009; Ikeda-Ohtsubo et al., 2018; Nyholm, 2020). Furthermore, mother to offspring bacterial transmission has been strongly hypothesized to modulate the microbiota of the eggs of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* (Guri et al., 2012; Methou et al., 2019).

In a previous study that we conducted, we have also suggested that some bacterial strains could be vertically transmitted in the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Giraud et al., 2021). Indeed, studying the active microbiota associated with the early larval stages (eggs and nauplii) of *L. stylirostris* as well as with their rearing environment, several bacterial families were specifically associated with the eggs and the nauplii and were not found in the environment leading us to hypothesize that they had been acquired from the breeders. In order to determine if microbial vertical transmission is indeed involved in the establishment of commensal microbial communities in *L. stylirostris*, we present a new study focusing on the active microbiota of the eggs and the nauplii of *L. stylirostris*. We also investigate the microbial communities associated with their rearing environment as well as with the female and male reproductive organs of their breeders. We highlight a core microbiota associated with all the samples showing the importance of environmental factors in the establishment of commensal microorganisms in the animals. We also identify several bacterial families specific to the breeders and their offspring strengthening our hypothesis of a vertical transmission in *L. stylirostris*. Some specific bacterial lineages associated

with the eggs and the nauplii also suggest the influence of other underestimated factors. Nevertheless, this study brings insight on the establishment of the active microbiota associated with the first larval stages of a farmed shrimp species.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Sample Collection

Eggs and nauplii of *L. stylirostris* were supplied by the experimental shrimp hatchery located at the Saint Vincent Bay (Ifremer, Boulouparis, New Caledonia) in May 2021. Breeders were reared in earthen ponds before transfer to maturation tanks according to the method described in Pham et al. (2012). Tanks in the maturation and in the hatchery were filled with treated natural seawater from the Saint Vincent Bay as described in Giraud et al. (2021). Water from three different hatchery tanks was sampled after addition of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; **Figure 1**). For each tank, 1L of seawater was filtered on a 0.2µm pore size filter (S-PAK membrane filter, Millipore) and filters were stored at -80°C until further RNA extractions.

In order to study two-parent families, artificial inseminations were conducted using one male to inseminate one female on the day the hatchery tanks were filled and sampled. After artificial inseminations, females were transferred into the hatchery tanks at a rate of 1 individual per tank and left to spawn (**Figure 1**). Males were dissected using sterilized tweezers and scissors to sample their reproductive organs (testicular diverticula). After spawning, females were retrieved and dissected in the same way as the males in order to collect their ovarian tissues. All the collected reproductive organs were rinsed with sterilized seawater and stored in 2 ml sterile microtubes. After spawning, around a hundred eggs from each tank were collected in a 2 ml sterile microtube using sterilized pliers. The following day, before transfer into rearing tanks for larval rearing, nauplii were separated from non-hatched eggs and abundantly rinsed. Around a hundred nauplii were sampled from each tank in the same way as the eggs. All the collected samples were stored at -80°C until further RNA extractions.

A total of three two-parent families were considered for this study. For each family unique samples of male and female reproductive organs, eggs, and nauplii were collected (**Figure 1**). All water samples collected from the hatchery tanks as well as male and female reproductive organs are respectively called “Tank,” “Male,” and “Female” in the rest of the article. Egg and nauplius (nii) samples are referred to as such in the text. All sample names are followed by a number ranging from 1 to 3. Samples with the same number belong to the same two-parent family.

RNA Extractions and Sequencing

In order to study the active microbial communities (Yates et al., 2021) associated with all the considered samples, RNA extractions were performed using the RNeasy PowerWater kit (Qiagen) for the filters, the eggs and the nauplii; and using the RNeasy minikit (Qiagen) for the male and the female reproductive organs. All the extracted RNAs were reverse-transcribed into complementary

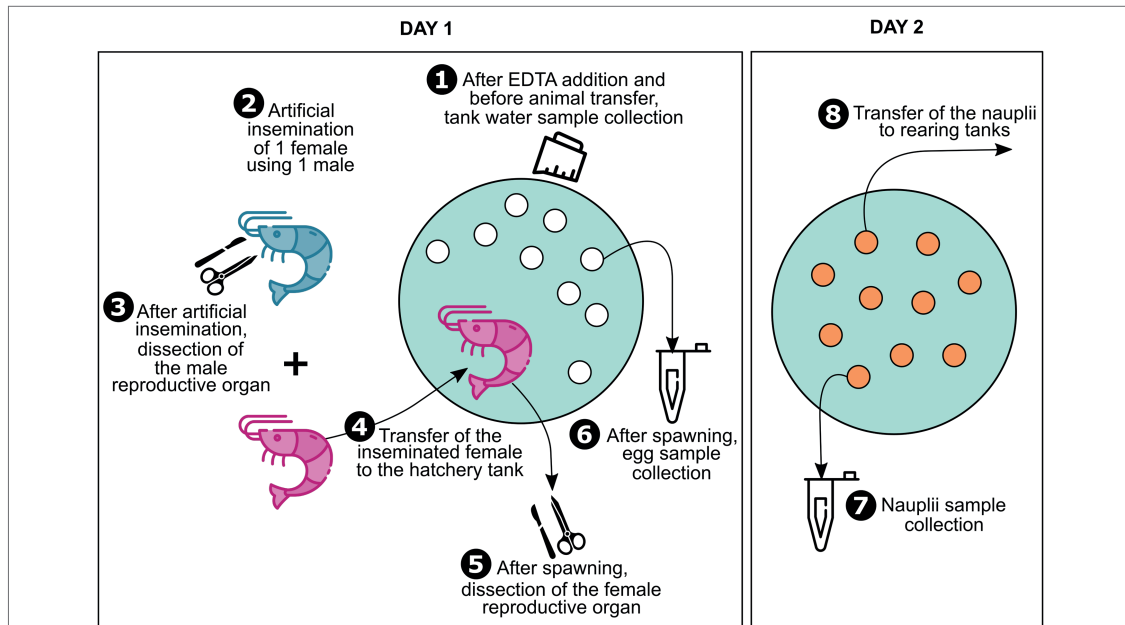


FIGURE 1 | Sample collection. Sample collection was performed using an eight-steps technique. First, water was sampled from the hatchery tanks after ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) addition. Then, on the day the tanks were filled and sampled, artificial inseminations were performed. In order to consider two-parent families only, one male was used to inseminate one female for all the artificial inseminations. After artificial inseminations, males were dissected in order to sample their reproductive organ and females were transferred into the hatchery tanks at a rate of 1 individual per tank and were left to spawn. After spawning, females were retrieved to dissect their ovarian tissue, and eggs were sampled from all the hatchery tanks. To allow larval hatching, eggs were left until the next day in the hatchery tanks. Before transfer into rearing tanks, the nauplii were sampled from each tank. A total of three two-parent families were considered for this study.

DNAs (cDNAs) using a two-step technique. The first step consisted in adding 200 ng of RNAs to a reaction mix [buffer 5X, dNTP 10 mM, random hexamers 50 μ M, reverse transcriptase M-MLV (PROMEGA) 200 μ U \cdot l $^{-1}$, RNase/DNase free water] and performing reverse transcription in a thermocycler during 10 min at 25°C, 2 h at 42°C, and 5 min at 85°C. The second step was performed using the Second Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFisher).

All the double-stranded cDNAs obtained were sent to MrDNA (Shallowater, TX, United States) in order to amplify and sequence the V4 region of the 16S rRNA gene using the 515F/806R primers (Caporaso et al., 2011). An HiSeq Illumina sequencing was conducted using a 2 \times 300 pb paired end run and an average sequencing depth of 50K raw reads per sample.

Microbiota Analysis

Raw sequences were treated using the DADA2 package under RStudio (Callahan et al., 2016; RStudio Team, 2020) as described in Giraud et al. (2021). After the obtention of the ASV table, sequences affiliated to eukaryotes, chloroplasts, and mitochondrias were removed before further analysis.

A dendrogram based on a Bray–Curtis dissimilarity matrix and Ward method was constructed using the vegan package in RStudio (Oksanen et al., 2020). Histogram tables and diversity

indexes were obtained using the phyloseq package in Rstudio (McMurdie and Holmes, 2013). Significant differences among diversity indexes were evaluated performing a Kruskal–Wallis test and a Dunn post-test. Venn diagrams were made using the open-source component for web environment jvrenn (Bardou et al., 2014).¹ Core microbiotas were determined using the constructed Venn diagrams based on shared membership of ASVs (Shade and Handelsman, 2012).

All the 16S rRNA data are available in the NCBI SRA repository under the BioProject PRJNA736535 (SRA accession numbers from SRR17301487 to SRR17301501).

RESULTS

Total Microbial Diversity of all the Samples

A total of 5,409,237 reads were obtained from the HiSeq Illumina sequencing of all samples. Sequences were clustered into 2,344 ASVs. The smallest and largest libraries were respectively composed of 109,259 and 955,820 reads and respectively corresponded to the Egg_3 and Nii_1 (nauplii) samples.

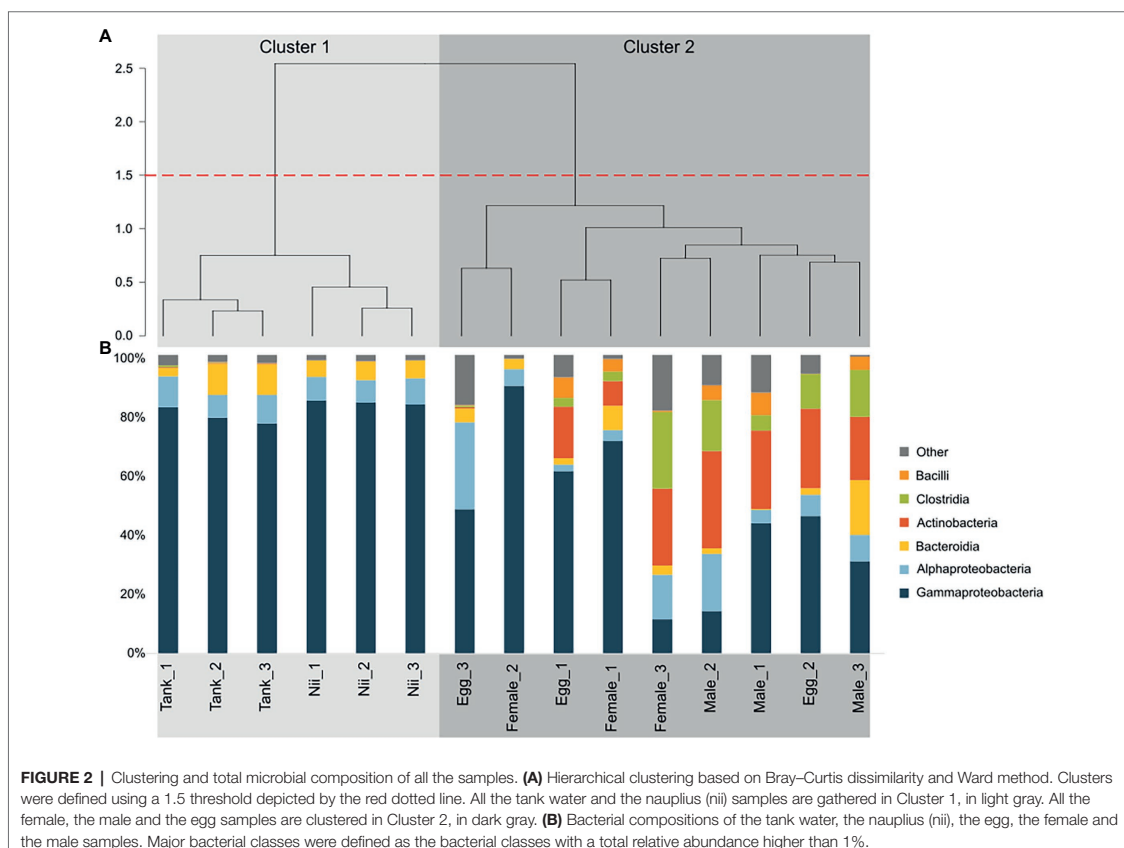
¹<http://jvrenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>

Hierarchical clustering based on Bray–Curtis dissimilarity separated the samples into two distinct groups (Figure 2A). The first cluster (Cluster 1) gathered all the tank water and the nauplius samples, while the second cluster (Cluster 2) grouped all the breeder and the egg samples. For all samples, six dominant bacterial classes with a total relative abundance higher than 1% were highlighted (Figure 2B). *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria*, respectively, accounted for 72 and 8% of the total relative abundance. *Bacteroidia* and *Actinobacteria* each represented 6% of the ASV table. Finally, *Clostridia* and *Bacilli*, respectively had a total relative abundance of 3 and 1%. The tank waters and the nauplii showed consistent total microbial compositions with high proportions of *Gammaproteobacteria* as well as *Alphaproteobacteria* and *Bacteroidia*. All the male samples also had homogeneous microbial communities but with larger proportions of *Actinobacteria* and *Clostridia* compared to the water and nauplii. Unlike the other samples (water, nauplii, and males), the females and the eggs displayed important inter-individual variabilities. Indeed, the Egg_2 and the Female_3 samples had similar compositions to the male samples with a microbial diversity mainly composed by *Clostridia*,

Actinobacteria, and *Proteobacteria*; whereas the other female and egg samples showed higher abundances of *Proteobacteria*.

Shared ASVs Among Sample Types

Several Venn diagrams were constructed in order to highlight shared ASVs among the five considered sample types: eggs, nauplii, tank waters, female ovarian tissue, and male reproductive organs (Supplementary Figure S1). All the tanks shared 546 ASVs which represented 96% of the total relative abundance of all the water samples (Supplementary Figure S1A). The female reproductive organs displayed a core microbiota composed of 269 ASVs (86%; Supplementary Figure S1B). A total of 271 ASVs (83%) were shared among the male reproductive organs (Supplementary Figure S1C). Finally, the egg (Supplementary Figure S1D) and the nauplius (Supplementary Figure S1E) samples respectively shared 338 (85%) and 1,025 ASVs (99.5%). These five ASV lists were used to build two global Venn diagrams (Figure 3). The first global Venn diagram showed the specific and shared ASVs among the tank water, the egg and the nauplius samples (Figure 3A), whereas the second Venn diagram focused on the breeders and their offspring (Figure 3B).



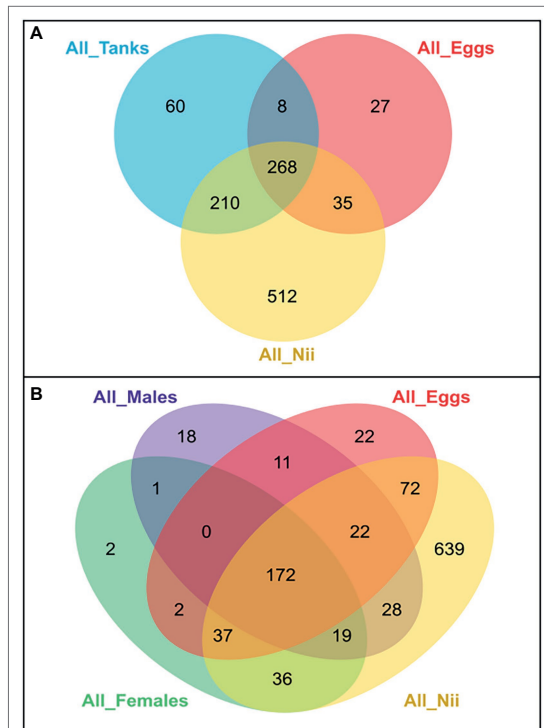


FIGURE 3 | Global Venn diagrams of shared and specific ASVs among sample types. **(A)** Venn diagram of specific and shared ASVs among the tank water, the egg and the nauplius (nii) samples. The blue ellipse represents the ASVs shared by all the hatchery tank water samples. The red ellipse represents the ASVs shared by all the egg samples. The yellow ellipse represents the ASVs shared by all the nauplius (nii) samples. **(B)** Venn diagram of specific and shared ASVs among the breeders (female and male), the egg and the nauplius (nii) samples. The green ellipse represents the ASVs shared by all the female reproductive organ samples. The purple ellipse represents the ASVs shared by all the male reproductive organ samples. The red ellipse represents the ASVs shared by all the egg samples. The yellow ellipse represents the ASVs shared by all the nauplius (nii) samples. In both Venn diagrams, numbers noted in the overlapping areas correspond to the number of shared ASVs among sample types, while numbers noted outside of the overlapping areas correspond to the numbers of specific ASVs associated with each sample type.

Shared Bacterial Lineages Among all the Samples

The tank water, the egg and the nauplius samples shared 268 ASVs among which 11 dominant bacterial families with a total relative abundance higher than 1% were highlighted (Figure 4A). Comparing the microbial compositions of these samples, *Burkholderiaceae* seemed to be more abundant as the larvae grew, while the proportions of *Colwelliaceae* and *Alteromonadaceae* decreased. Furthermore, the abundance of *Vibrionaceae* was constant in the tank waters, the eggs, and the nauplii (Figure 4A). The eggs and the nauplii also shared 172 ASVs with the male and the female reproductive organs.

When considering this subset of ASVs, 15 dominant bacterial families were highlighted (Figure 4B). The distribution profiles of these families varied between sample types. Indeed, the female and the male reproductive organs as well as the eggs showed higher abundances of *Burkholderiaceae*, *Corynebacteriaceae*, and *Micrococacceae* compared to the nauplii. On the contrary, abundances of *Colwelliaceae*, *Alteromonadaceae*, and *Pseudoalteromonadaceae* increased in the nauplius samples (Figure 4B). Comparing the two histograms, 10 families were shared between the two sets of core microorganisms: *Colwelliaceae*, *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Saccharospirillaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Flavobacteriaceae*, and *Corynebacteriaceae*. These bacterial lineages respectively represented 97 and 86% of the total relative abundance of the ASVs shared among the tank waters, the eggs and the nauplii (Figure 4A) and among the breeders and their offspring (Figure 4B).

Shared Bacterial Lineages Among the Eggs, the Nauplii, and the Breeders

The eggs and the nauplii also shared specific ASVs with the female and the male samples taken separately. Indeed, the male, the egg, and the nauplius samples shared 22 ASVs, whereas 37 ASVs were uniquely found in the female reproductive organs, the eggs, and the nauplii. When considering the ASVs common to the males and their offspring, 14 dominant families were observed when analyzing the ASVs shared by the females, the eggs, and the nauplii (Figure 5B). Even though different ASVs were involved in each group, four common families were found in the two constructed histograms: *Arcobacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Comamonadaceae*, and *Colwelliaceae*. In both cases, the abundance profiles of the breeders, the eggs and the nauplii were very different and sometimes even opposite. Indeed, the breeders showed higher abundances of *Arcobacteraceae* than their offspring. On the contrary, the eggs and the nauplii respectively displayed larger proportions of *Comamonadaceae* and *Spongibacteraceae* compared to the male samples. Furthermore, *Cryomorphaceae* were less abundant in the male reproductive organs than in the egg and the larval stages. Finally, *Saccharospirillaceae* were less highlighted in the ovarian tissues than in the nauplii.

Shared Bacterial Lineages Among the Eggs and the Nauplii

The egg and the nauplius samples showed specific and shared ASVs in both global Venn diagrams. Indeed, the egg samples displayed a total of 27 specific ASVs in Figure 6A, whereas 22 specific ASVs were highlighted in Figure 6B. Analyzing the dominant bacterial families from these ASVs, *Longimicrobiaceae* and *Burkholderiaceae* appeared to be highly abundant in both groups. The eggs also shared ASVs with the nauplii in the two Venn diagrams. In the first Venn diagram, 35 ASVs were common to the both sample types (Figure 6C), while 72 ASVs were highlighted in the second Venn diagram (Figure 6D). The dominant bacterial families highlighted from

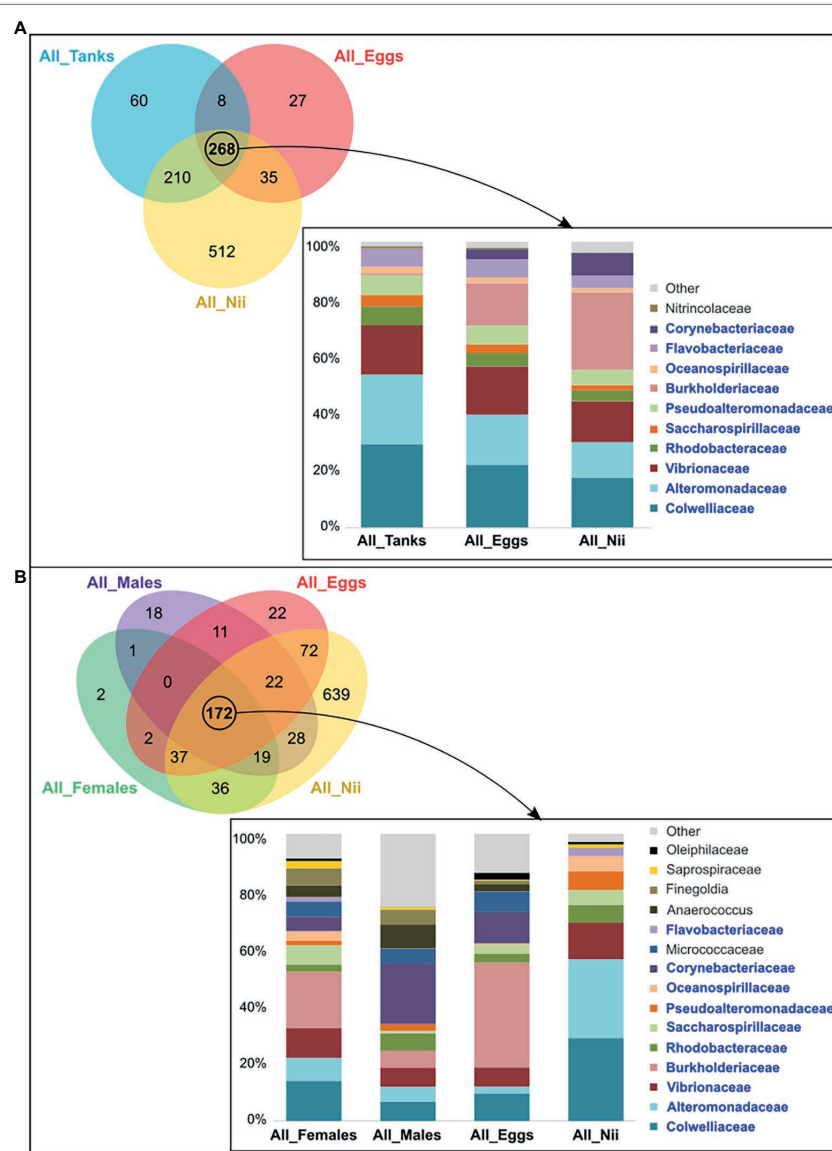
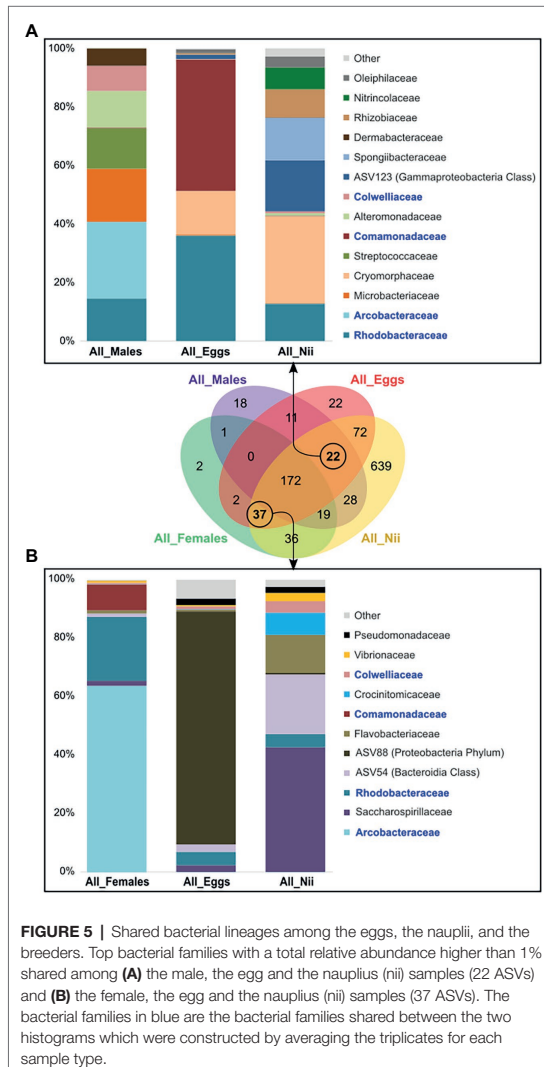


FIGURE 4 | Shared bacterial lineages among the eggs, the nauplii, the tank waters, and the reproductive organs of the breeders. Top bacterial families with a total relative abundance higher than 1% shared among **(A)** the tank water, the egg, and the nauplius (nii) samples (268 ASVs) and **(B)** the female and the male reproductive organs, the egg and the nauplius (nii) samples (172 ASVs). The bacterial families in blue are those shared between the two histograms which were constructed by averaging the triplicates for each sample type.

these ASV groups showed five consistent families: *Rhodobacteraceae*, *Nitrocolaceae*, *Vibrionaceae*, *Neisseraceae*, and *Burkholderiaceae*. In both cases, abundance profiles differed between the two sample types as bacterial lineages abundant in the eggs decreased in the nauplii and vice versa. Finally,

the nauplius samples showed a large amount of specific ASVs in both Venn diagrams (512 and 639 ASVs; **Figures 6E,F**). These groups of ASVs each showed various dominant bacterial families with homogeneous abundances. However, 11 families were common to both histograms: *Rhodobacteraceae*,



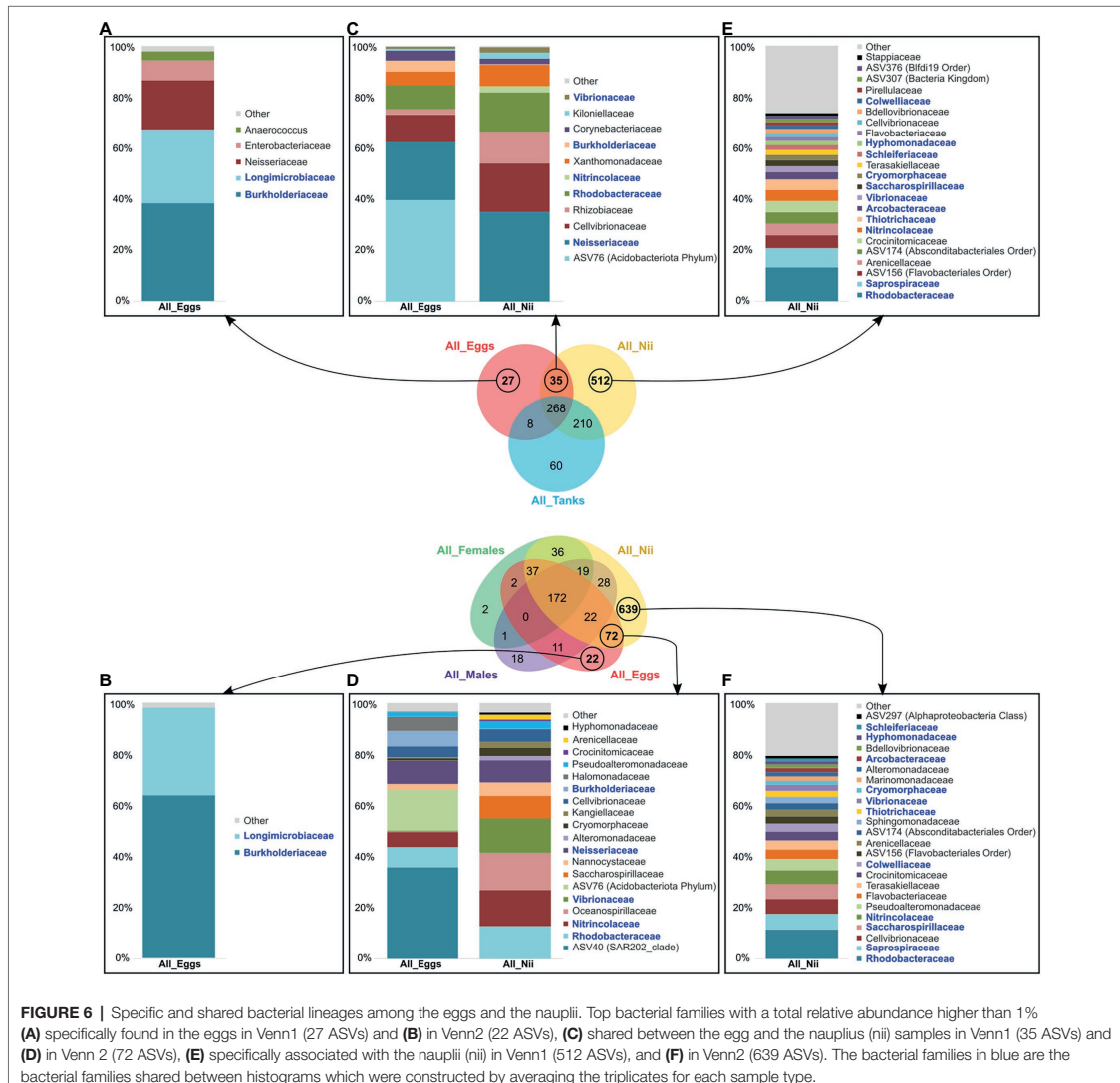
Saprosiraceae, *Saccharospirillaceae*, *Nitrocolaceae*, *Colwelliaceae*, *Thiotrichaceae*, *Vibrionaceae*, *Cryomorphaceae*, *Arcobacteraceae*, *Hyphomonadaceae*, and *Schleiferiaceae*.

DISCUSSION

Total Microbial Compositions Throughout all the Samples

The tank water samples were majorly composed of *Gammaproteobacteria* as well as *Alphaproteobacteria* and *Bacteroidia* (Figure 2B). These three major bacterial classes had been previously identified in water samples collected from the

water reservoirs of the Saint Vincent experimental shrimp hatchery in October and November 2018 and February 2019. However, these reservoir samples also showed high abundances of *Acidimicrobiia*, *Cyanobacteria*, and *Planctomycetes* (Giraud et al., 2021). Thus, differences in total microbial compositions were observed between the water in the tanks and the water used to fill the tanks. As samples were collected at different periods and seasons, these differences could be explained by both seasonal and annual variations impacting the bacterial composition of the natural seawater in the Saint Vincent Bay. Such variations have been shown in the coastal seawaters surrounding the subtropical Xiamen Island in China, where *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, and *Firmicutes* dominated all samples even though more than 400 bacterial groups were identified as unique to at least one season (Wang et al., 2019). Similar conclusions were drawn from a 5-year study focusing on the bacterial genera associated with seawater from the Ofunato Bay in Japan (Kobiyama et al., 2021). Beyond seasonal variations, another hypothesis can be made in order to explain the differences observed in total microbial compositions between the tanks and the reservoirs. Indeed, unlike our previous study, water from the hatchery tanks was sampled after EDTA addition. A recent research has shown that microbial communities can be influenced by different EDTA concentrations in different soils (Wei et al., 2020) making it possible for EDTA to also influence microorganisms associated with seawater. In any case, tank water samples were dominated by *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, and *Bacteroidia* which are common and important bacterial classes in various seawaters ranging from pelagic to benthic environments (Giovannoni and Stingl, 2005; Zinger et al., 2011). These bacterial classes were also very abundant in the nauplius samples which showed similar total microbial compositions than the water samples (Figure 2B). This was expected as these microbial communities have been shown in larvae and adults of different shrimp species under farmed conditions (Rungrassamee et al., 2013; Zheng et al., 2017). Furthermore, the rearing environment is known to be a key factor in the structure of the microbiota associated with fish larvae (Giatsis et al., 2015; Vadstein et al., 2018). Contrary to what we had shown previously, in this study, the nauplius samples grouped with the tank water samples and not with the eggs (Giraud et al., 2021). Indeed, when considering the microbial communities associated with the reproductive organs of the breeders, egg samples clustered with the male and the female samples (Figure 2A). In these samples, except for the Egg_3 and Female_2 samples which were clustered in a separate subgroup (Figure 2A), inter-individual variability was greater as abundances of *Clostridia*, *Bacilli*, and *Actinobacteria* varied (Figure 2B). High variability among the microbiotas of reproductive organs have already been shown in insects. Indeed, a study focusing on the microbiotas associated to different organs of nine mosquito species has shown that even though organs share core microbiotas, a tissue-specific tropism exists (Mancini et al., 2018). These results showed that the nauplii and the water from the hatchery tanks had similar microbial compositions, while the eggs were closer to the breeders. This suggested that the microbiota of the eggs could be under the influence of



vertically transmitted microorganisms from the breeders and that after hatching, the microbiota of the nauplii could then be shaped by the rearing environment. In order to confirm our hypotheses, Venn diagrams were constructed to investigate the specific and shared bacterial communities among all the considered sample types (Supplementary Figure S1; Figure 3).

Influence of the Rearing Environment on the Microbiota Associated With the Animals

Analyzing the constructed Venn diagrams, we were able to identify a core microbiota shared by the tank waters, the eggs and the nauplii and composed of 268 ASVs from which 11

dominant bacterial families were highlighted (Figure 4A). Out of these 11 families, 10 were also found in the core microbiota of the males, the females, the eggs, and the nauplii (Figure 4B): *Colwelliaceae*, *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Saccharospirillaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Flavobacteriaceae*, and *Corynebacteriaceae*. *Colwelliaceae*, *Alteromonadaceae*, and *Pseudoalteromonadaceae* are all affiliated to the *Alteromonadales* order and the *Gammaproteobacteria* class. Members of these bacterial families are found in various environments ranging from soil and sediments to coastal and open seawaters. They can also be associated with organisms such as algae, fish, and marine invertebrates. This ability to colonize very diverse habitats can

be explained by the production of various primary and secondary metabolites (hydrolytic enzymes, cyclic peptides, proteins, pigments, exopolymers, alkaloids...) which enable these microorganisms to decompose different organic compounds like hydrocarbons, lipids, proteins, and polysaccharides (Ivanova and Mikhailov, 2001; Bowman, 2014; Ivanova et al., 2014). *Vibrionaceae*, *Burkholderiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, and *Rhodobacteraceae* are also known for their metabolic versatility and ecological diversity as they can be found in fresh and seawaters, soil, mud, plants, animals, and even humans (Riegel, 2006; Bernardet, 2015; Farmer and Janda, 2015; Garrity et al., 2015a,c). *Saccharospirillaceae* and *Oceanospirillaceae* are ubiquitous as well but are restricted to aquatic environments (Garrity et al., 2015b; Kevbrin et al., 2020). In 2011, research on the intestinal microbiota of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* highlighted four out of eight bacterial genera (*Vibrio*, *Loktanella*, *Roseobacter*, and *Flavobacterium*) affiliated to the *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae*, and *Flavobacteriaceae* families (Liu et al., 2011). The three same bacterial families were also highlighted in a study focusing on the intestinal microbial communities of post-larvae and juveniles of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The authors even suggested that *Flavobacteriaceae* and *Rhodobacteraceae* formed the core microbiota of all the samples they considered (Huang et al., 2016). More recently, in 2020, studies focusing on the microbiota associated with the larval stages of *L. vannamei* highlighted *Vibrionaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Colwelliaceae*, *Rhodobacteraceae*, and *Alteromonadaceae* in their samples (Wang et al., 2020a,b). The same bacterial families were highlighted in the eggs and the nauplii of *L. stylirostris* (Giraud et al., 2021). Thus, *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Colwelliaceae*, and *Alteromonadaceae* were found in larvae and adults of different shrimp species. As these families were also associated with the tank water samples and as water was collected before transfer of the females into the hatchery tanks, we can hypothesize that some or all bacterial communities may be acquired from the rearing environment by the animals at larval or adult stages. As gut opening occurs after the nauplius stage in penaeid shrimps, water may modulate the epibiota of the larvae, while breeders could acquire microorganisms from the water and transmit them on to their offspring via a potential vertical transmission shaping the endobiota. In order to investigate this possible vertical transmission, we analyzed the ASVs shared among the larvae and the breeders taken separately.

Arguments in Favor of a Potential Vertical Transmission

Even though the males were never in direct contact with their offspring, they shared 22 ASVs and 14 bacterial families (Figure 5A). The females, the eggs and the nauplii had 37 ASVs and 11 bacterial families in common (Figure 5B). Among these two sets of core bacterial families, *Arcobacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Comamonadaceae*, and

Colwelliaceae were found. *Arcobacteraceae* are members of the *Campilobacteria* class and have been found in the intestinal microbiota associated with juveniles of *L. vannamei* (Zeng et al., 2017). This bacterial clade has also been identified in the eggs of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* (Guri et al., 2012; Methou et al., 2019). Vertical transmission of *Arcobacteraceae* has been proved in poultry and in pigs under farmed conditions (Collado and Figueras, 2011). *Comamonadaceae* belong to the *Burkholderiales* order and are thus metabolically diverse explaining why they are found in various environments such as soil, mud, and water in natural and anthropic environments (Willems and Gillis, 2015). Members of this bacterial family have been found in the discus fish *Symphysodon aequifasciata* in adults and their fry. The authors suggested that these microorganisms were vertically transferred from the parents to their offspring (Sylvain and Derome, 2017). *Comamonadaceae* have also been identified in the gut microbiota of *L. vannamei* at post-larval stage (Huang et al., 2016; Li et al., 2018). In order to explain the presence of these bacterial communities in the intestines of the post-larvae, Huang et al. (2016) hypothesized that these microorganisms were acquired from the *Artemia* larvae used for feeding. In our study, focus was made on the eggs and the first larval stages; thus, feeding could not explain the presence of *Comamonadaceae* in the eggs and the nauplii. However, they were found in the reproductive organs of the breeders. In the other mentioned studies, all bacterial strains were found in the intestinal microbiota as well. Relationships between the microbial communities of the gut and the reproductive organs are not well-documented but studies have established a link between the gut microbiota and the reproductive endocrine system in women. Indeed, disruption in the bacterial communities associated with intestines in women has been proved to cause reproductive diseases and syndromes. Overall, the gut microbiota is known to have various important effects on the intestines and to influence more distinct organs and molecular pathways in the human body (Qi et al., 2019, 2021). Taken together, these results suggest a potential vertical transmission of bacteria affiliated to the *Arcobacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Comamonadaceae*, and *Colwelliaceae* families from the breeders to their offspring. However, further studies will be necessary in order to prove this possible vertical transmission. For example, in salmon, vertical transmission of the pathogenic bacteria *Piscirickettsia salmonis* was proved using indirect immunofluorescence technique and scanning electron microscopy (Larenas et al., 2003). However, this was possible for only one bacterial strain while we have highlighted several possible microbial families. Applying such technique in shrimps would require more investigations and important technical developments. Indeed, validating vertical transmission involves understanding the underlying cellular mechanisms. The development of specific probes could be worth considering for qualitative and quantitative tracking of specific bacterial strains (Lee et al., 2009). However, it is important to note that targeting certain microorganisms of interest is necessary.

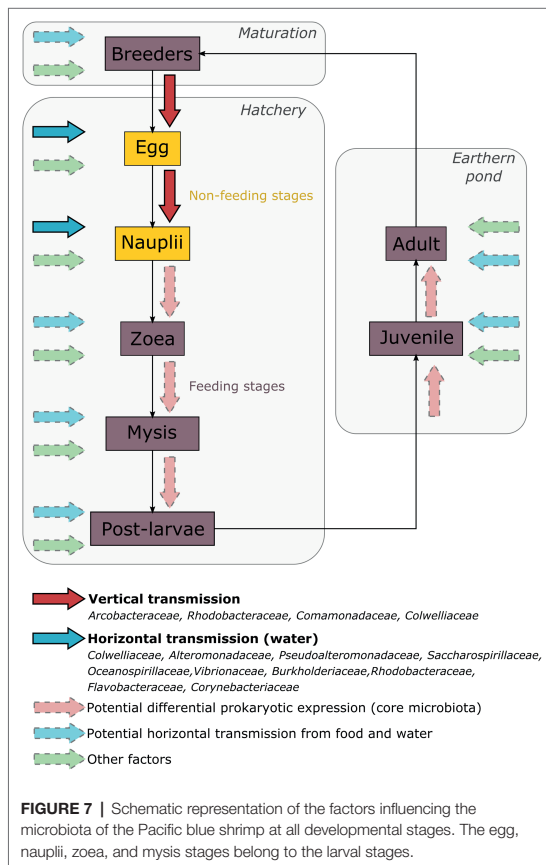
Undetermined Factors May Shape the Bacterial Communities Associated With the Eggs and the Nauplii

Our first results suggested that the environment and the breeders could shape the microbiota associated with the eggs and the early larval stages of *L. stylirostris*. However, as the eggs and the nauplii showed specific ASVs that were not highlighted in the tanks nor in the male and female reproductive organs, it seemed possible that other factors were involved. In both constructed Venn diagrams, ASVs which were only found in the egg samples were highlighted (Figures 6A,B). Only two dominant active bacterial families were highlighted from these ASVs: *Longimicrobiaceae* and *Burkholderiaceae*. Surprisingly, *Longimicrobiaceae* members (*Gemmatimonadota* phylum) are very common in soil and represent up to 2% of the soil microbial community (Bertrand et al., 2018). To our knowledge, these microorganisms have never been identified in marine seawaters or aquatic organisms. However, they have been found in the sediments of urbanized rivers (Ge et al., 2021). Adult shrimps are cultured in earthen ponds and their intestinal microbiota can share up to 80% ASVs with the sediments in their rearing environment (Hou et al., 2018). The potential influence of the gut microbiota has previously been discussed. However, *Longimicrobiaceae* were not highlighted in the reproductive organs of the breeders. As we studied active microbial communities, it is possible that this bacterial family was present and inactive in the breeders and became active when transmitted on to the eggs. Further investigations will be necessary to understand the role of *Longimicrobiaceae* in early larval stages of *L. stylirostris*. On the other hand, the presence of *Burkholderiaceae* was not surprising as they have been found in the intestines of post-larvae and juveniles of *L. vannamei* (Huang et al., 2016). As previously suggested for *Comamonadaceae*, *Burkholderiaceae* may be acquired at very early larval stages and may persist throughout the whole lifecycle of the shrimp. The egg samples also shared specific bacterial lineages with the nauplii in the Venn diagrams in Figures 6C,D. A total of five bacterial families were consistently found: *Rhodobacteraceae*, *Nitrospiraceae*, *Vibrionaceae*, *Neisseriaceae*, and *Burkholderiaceae*. *Rhodobacteraceae*, *Vibrionaceae*, and *Burkholderiaceae* were identified in all the samples but from different ASVs. Members of these families are able to produce extracellular proteins enabling them to colonize various habitats and to adapt, explaining why they were found in every compartment of our experiment. *Nitrospiraceae* has been identified in the gut microbiota of reared and wild salmon (Lavoie et al., 2021) as well as in the rearing water of sablefish larvae (Lee et al., 2021) and in *L. stylirostris* larvae (Giraud et al., 2021). The ability of the *Nitrospiraceae* members to colonize the intestines of marine species as well as their rearing environments may support our idea that some bacterial lineages could also be acquired from the environment. As previously suggested before for the breeders, environmental communities may activate when in contact with the larvae. Finally, nauplii displayed many specific ASVs that were not identified in the other sample types (Figures 6E,F). Considering the major active bacterial families identified from these ASVs, no family had a clear higher relative abundance. This was also

illustrated with the analysis of the diversity index (Supplementary Figure S2). Indeed, the nauplius samples showed a significantly higher Chao1 index reflecting a higher richness of their microbial communities. However, no differences were observed for the Simpson index reflecting no change in evenness (Kim et al., 2017). This has already been reported in *L. vannamei* as the nauplii presented higher richness index than the later larval stages (zoea and mysis; Wang et al., 2020a). The increase of microbial richness associated with the nauplii was explained by yolk nutrient release and surface expansion at this stage. The authors suggested that as larvae grew and as their intestinal tract formed, food and environment tended to structure the gut microbiota leading to less richness. The authors also suggested that the microbial communities associated with the nauplii originated from the eggs. However, our results suggest otherwise. As previously mentioned, these communities may have been acquired from the water and/or the breeders and activated as the environmental conditions were more favorable. Other factors could also influence the structure of the microbial communities associated with the larvae such as competition between microorganisms, genetic background, larval ontogenesis, and host associated selection pressure (Vadstein et al., 2018; Sun and Xu, 2021). This is supported by the abundance difference of the microbial communities that were shared by the samples. Indeed, even when samples shared bacterial families, their relative abundances varied greatly supporting our theory that microbial communities may find more or less favorable conditions in each compartment. This has been previously shown during larval stages of *L. vannamei* where bacterial family abundances varied from one stage to another and where several stage-specific groups were highlighted (Zheng et al., 2017; Wang et al., 2020b). These results suggest that even though environment and breeders could influence the microbiota of the early larval stages, some unconsidered factors could also structure the microbial communities associated with the eggs and the nauplii.

CONCLUSION

In conclusion, we highlighted an active core microbiota associated with all the considered samples. Indeed, the water filling the hatchery tanks, the eggs and the nauplii as well as the female and the male reproductive organs shared 10 bacterial families: *Colwelliaceae*, *Alteromonadaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Saccharospirillaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Vibrionaceae*, *Burkholderiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae*, and *Corynebacteriaceae*. Several bacterial families were also shared only by the breeders and their offspring: *Arcobacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Comamonadaceae*, and *Colwelliaceae*. Finally, the egg and the nauplius samples showed unique bacterial families that were not identified in the other sample types. Taken together, our results suggest that the early larval stages of *L. stylirostris* are shaped by their environment and by their breeders. Some bacterial lineages may be horizontally acquired from the rearing water through adsorption and adhesion process at the surface of the larvae (Hansen and Olafsen, 1999). As some microorganisms can enter the larvae before mouth opening,



these early acquired communities could shape the epibiota as well as the endobiota of the eggs and the nauplii. However, we also showed that some bacterial strains were shared with the breeders suggesting a potential vertical transmission affecting the structure of the larval microbiota. Furthermore, we highlighted bacterial families that were uniquely associated with the eggs and the nauplii suggesting that some unconsidered factors were involved (genetic background, host selection pressure, and so on). Thus, microbial communities associated with the eggs and the nauplii result in dynamic interactions that may persist through the whole larval cycle and even through the whole life cycle of the shrimp. Further investigations will be necessary in order to understand the evolution of the active microbial communities associated with later life stages as our results suggest that some bacterial lineages in shrimp larvae cultured in hatcheries may be determined way in advance by the breeders and their rearing environment. In addition, during further larval development, other factors like food could come into play to shape the microbiota (Figure 7). In aquaculture, microbial management of the rearing water is an important concern (Rurangwa and Verdegem, 2015). However, our study suggests that the microbiota associated with the animals can

also be modulated by other factors leading to rethink microbial management of the whole rearing process.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary Material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CG, NC, and NW conceived and designed the experiment. CG, NC, J-SL, DP, and NW performed the experiment and acquired the data. CG and NC analyzed the data, prepared the figures, and drafted the manuscript. VB, DP, NS-F, and NW reviewed the draft. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the RESSAC project (LEAD-NC, Ifremer New-Caledonia) within the framework agreement with the New Caledonian Provinces and Government and by the Pacific Doctoral School.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Julien De Lorgeril as well as Vincent Douchet for their valuable work in the hatchery and for their help during the sample collection.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.886752/full#supplementary-material>

Supplementary Figure S1 | Venn diagrams of each sample type. Specific and shared ASVs among all (A) the tank water samples, (B) the female reproductive organ samples, (C) the male reproductive organ samples, (D) the egg samples, and (E) the nauplius (nii) samples. For all the Venn diagrams, each ellipse color corresponds to a two-parent family. All samples from the first family are represented in blue. All samples from the second family are represented in yellow. All samples from the third family are represented in red. In both Venn diagrams, numbers noted in the overlapping areas correspond to the number of shared ASVs among samples while numbers noted outside of the overlapping areas correspond to the numbers of specific ASVs associated with each sample.

Supplementary Figure S2 | Alpha diversity index of all samples. (A) Chao1 and (B) Simpson index for all the tank waters, the egg, the nauplius (nii), the female and the male samples. Significant differences (value of $p < 0.05$) highlighted by a Kruskal-Wallis and Dunn test are represented by *.

REFERENCES

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., and Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5721–5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
- Bardou, P., Mariette, J., Escudé, F., Djemiel, C., and Klopp, C. (2014). Software open access jvenn: an interactive venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15:293. doi: 10.1186/1471-2105-15-293
- Bernardet, J. (2015). “Flavobacteriaceae,” in *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Wiley), 1–18.
- Bertrand, J. C., Normand, P., Ollivier, B., and Sime-Ngando, T. (eds.) (2018). *Prokaryotes and Evolution*. Cham: Springer International Publishing.
- Bowman, J. P. (2014). “The family colwelliaceae,” in *The Prokaryotes*. eds. E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 179–195.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., and Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., et al. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4516–4522. doi: 10.1073/pnas.1000080107
- Cho, I., and Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 13, 260–270. doi: 10.1038/nrg3182
- Collado, L., and Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Acrobacter*. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 174–192. doi: 10.1128/CMR.00034-10
- Egan, S., and Gardiner, M. (2016). Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems. *Front. Microbiol.* 7:991. doi: 10.3389/fmicb.2016.00991
- Farmer, J. J., and Janda, J. M. (2015). “Vibrionaceae,” in *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Wiley), 1–7.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., and Lilburn, T. (2015a). “Burkholderiaceae fam. nov.” in *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Wiley).
- Garrity, G. M., Bell, J. A., and Lilburn, T. (2015b). “Oceanospirillaceae fam. nov.” in *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Wiley).
- Garrity, G. M., Bell, J. A., and Lilburn, T. (2015c). “Rhodobacteraceae fam. nov.” in *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Wiley), 1–2.
- Ge, Y., Lou, Y., Xu, M., Wu, C., Meng, J., Shi, L., et al. (2021). Spatial distribution and influencing factors on the variation of bacterial communities in an urban river sediment. *Environ. Pollut.* 272:115984. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115984
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., et al. (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci. Rep.* 5:18206. doi: 10.1038/srep18206
- Giovannoni, S. J., and Stingl, U. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437, 343–348. doi: 10.1038/nature04158
- Giraud, C., Callac, N., Beauvais, M., Mailliez, J., Ansquer, D., Selmaoui-Folcher, N., et al. (2021). Potential lineage transmission within the active microbiota of the eggs and the nauplii of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: possible influence of the rearing water and more. *PeerJ* 9:e12241. doi: 10.7717/peerj.12241
- Guri, M., Durand, L., Cuffe-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B., et al. (2012). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J.* 6, 597–609. doi: 10.1038/ismej.2011.133
- Hansen, G. H., and Olafsen, J. A. (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38, 1–26. doi: 10.1007/s002489900158
- Hou, D., Huang, Z., Zeng, S., Liu, J., Weng, S., and He, J. (2018). Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment. *J. Appl. Microbiol.* 125, 792–799. doi: 10.1111/jam.13919
- Huang, Z., Li, X., Wang, L., and Shao, Z. (2016). Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res.* 47, 1737–1746. doi: 10.1111/are.12628
- Ikeda-Ohtsubo, W., Brugman, S., Warden, C. H., Rebel, J. M. J., Folkerts, G., and Pieterse, C. M. J. (2018). How can we define “optimal microbiota”? a comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture. *Front. Nutr.* 5:90. doi: 10.3389/fnut.2018.00090
- Ivanova, E. P., and Mikhailov, V. V. (2001). A new family, alteromonadaceae fam. nov., including marine proteobacteria of the genera alteromonas, pseudoalteromonas, idiomarina, and colwellia. *Mikrobiologiya* 70, 15–23. doi: 10.1023/A:1004876301036
- Ivanova, E. P., Ng, H. J., and Webb, H. K. (2014). “The family pseudoalteromonadaceae,” in *The Prokaryotes* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 575–582.
- Kevbrin, V., Boltyanskaya, Y., Grouzdev, D., Koziava, V., Park, M., and Cho, J.-C. (2020). Natronospirillum operosum gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic satellite isolated from decaying biomass of a laboratory culture of cyanobacterium Geitlerinema sp. and proposal of Natronospirillaceae fam. nov., Saccharospirillaceae fam. nov. and Gynuella. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 511–521. doi: 10.1099/ijsem.0.003781
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., et al. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 2089–2093. doi: 10.4014/jmb.1709.09027
- Kobiyama, A., Rashid, J., Reza, M. S., Ikeda, Y., Yamada, Y., Kudo, T., et al. (2021). Seasonal and annual changes in the microbial communities of Ofunato Bay, Japan, based on metagenomics. *Sci. Rep.* 11:17277. doi: 10.1038/s41598-021-96641-9
- Larenas, J., Bartholomew, J., Troncoso, O., Fernández, S., Ledezma, H., Sandoval, N., et al. (2003). Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Dis. Aquat. Org.* 56, 25–30. doi: 10.3354/dao056025
- Lavoie, C., Wellband, K., Perreault, A., Bernatchez, L., and Derome, N. (2021). Artificial rearing of Atlantic salmon juveniles for supportive breeding programs induces long-term effects on gut microbiota after stocking. *Microorganisms* 9, 27–31. doi: 10.3390/microorganisms9091932
- Lee, O. O., Chui, P. Y., Wong, Y. H., Pawlik, J. R., and Qian, P.-Y. (2009). Evidence for vertical transmission of bacterial symbionts from adult to embryo in the caribbean sponge *svenzea zeai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6147–6156. doi: 10.1128/AEM.00023-09
- Lee, J. S. F., Pierce, M. L., Cook, M. A., Berejikian, B. A., Goetz, F. W., and Poretsky, R. S. (2021). Effects of tank cleaning frequency and sea cucumber co-culture on larval sablefish growth and survival, water quality, and microbial communities. *Aquaculture* 545:737213. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737213
- Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., et al. (2018). Gut microbiota and its modulation for healthy farming of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Rev. Fish. Sci. Aquacult.* 26, 381–399. doi: 10.1080/23308249.2018.1440530
- Li, X., Yu, Y., Feng, W., Yan, Q., and Gong, Y. (2012). Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae. *J. Microbiol.* 50, 29–37. doi: 10.1007/s12275-012-1340-1
- Liu, H., Wang, L., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Ma, S., et al. (2011). The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses. *Aquaculture* 317, 32–36. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.04.008
- Mancini, M. V., Damiani, C., Accoti, A., Tallarita, M., Nunzi, E., Cappelli, A., et al. (2018). Estimating bacteria diversity in different organs of nine species of mosquito by next generation sequencing. *BMC Microbiol.* 18:126. doi: 10.1186/s12866-018-1266-9
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- Methou, P., Hernández-Ávila, I., Aube, J., Cuffe-Gauchard, V., Gayet, N., Amand, L., et al. (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. *Front. Microbiol.* 10:808. doi: 10.3389/fmicb.2019.00808
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac. Res.* 41, 1553–1573. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x
- Nyholm, S. V. (2020). In the beginning: egg–microbe interactions and consequences for animal hosts. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 375:20190593. doi: 10.1098/rstb.2019.0593
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2020). CRAN—Package vegan. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html> (Accessed August 17, 2021).

- Pham, D., Charmantier, G., Wabete, N., Boulo, V., Broutoi, F., Mailliez, J.-R., et al. (2012). Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the caledonian blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture* 362–363, 10–17. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.07.026
- Qi, X., Yun, C., Pang, Y., and Qiao, J. (2021). The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system. *Gut Microbes* 13:1894070. doi: 10.1080/19490976.2021.1894070
- Qi, X., Yun, C., Sun, L., Xia, J., Wu, Q., Wang, Y., et al. (2019). Gut microbiota–bile acid–interleukin-22 axis orchestrates polycystic ovary syndrome. *Nat. Med.* 25, 1225–1233. doi: 10.1038/s41591-019-0509-0
- Riegel, P. (2006). Actualités de l'épidémiologie et du rôle pathogène des corynébactéries. *Antibiotiques* 8, 153–161. doi: 10.1016/S1294-5501(06)70815-9
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. Available at: <http://www.rstudio.com/>
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., et al. (2013). Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. *PLoS One* 8:e60802. doi: 10.1371/journal.pone.0060802
- Rurangwa, E., and Verdegem, M. (2015). Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Rev. Aquac.* 7, 117–130. doi: 10.1111/raq.12057
- Shade, A., and Handelsman, J. (2012). Beyond the venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* 14, 4–12. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x
- Sun, F., and Xu, Z. (2021). Significant differences in intestinal microbial communities in aquatic animals from an aquaculture area. *J. Marine Sci. Engin.* 9:104. doi: 10.3390/jmse9020104
- Sylvain, F. É., and Derome, N. (2017). Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Sci. Rep.* 7, 1–14. doi: 10.1038/s41598-017-05662-w
- Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Hudcovic, T., Tučková, L., Cukrowska, B., Kozáková, H., et al. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 93, 97–108. doi: 10.1016/j.imlet.2004.02.005
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., and Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutr. Rev.* 70, S38–S44. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x
- Vadstein, O., Attramadal, K. J. K., Bakke, I., and Olsen, Y. (2018). K-selection as microbial community management strategy: a method for improved viability of larvae in aquaculture. *Front. Microbiol.* 9:2730. doi: 10.3389/fmicb.2018.02730
- Wang, H., Huang, J., Wang, P., and Li, T. (2020a). Insights into the microbiota of larval and postlarval Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) along early developmental stages: a case in pond level. *Mol. Gen. Genomics.* 295, 1517–1528. doi: 10.1007/s00438-020-01717-2
- Wang, Y., Liu, Y., Wang, J., Luo, T., Zhang, R., Sun, J., et al. (2019). Seasonal dynamics of bacterial communities in the surface seawater around subtropical Xiamen Island, China, as determined by 16S rRNA gene profiling. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 135–144. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.03.035
- Wang, Y., Wang, K., Huang, L., Dong, P., Wang, S., Chen, H., et al. (2020b). Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome* 8:106. doi: 10.1186/s40168-020-00879-w
- Wei, H., Liu, Y., Chao, Y., Tsang, D. C. W., Zhao, N., Liu, K., et al. (2020). Recovery of the biological function of ethylenediaminetetraacetic acid-washed soils: roles of environmental variations and microbes. *Sci. Total Environ.* 715:137032. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137032
- Whiteside, S. A., Razvi, H., Dave, S., Reid, G., and Burton, J. P. (2015). The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat. Rev. Urol.* 12, 81–90. doi: 10.1038/nrurol.2014.361
- Willems, A., and Gillis, M. (2015). “Comamonadaceae,” in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Wiley), 1–6.
- Yates, M., Derry, A., and Cristescu, M. (2021). Environmental RNA: a revolution in ecological resolution? *Trends Ecol. Evol.* 36, 601–609. doi: 10.1016/j.tree.2021.03.001
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., and He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ* 5:e3986. doi: 10.7717/peerj.3986
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, J., Qiao, Y., Wang, L., Li, Z., et al. (2017). Bacterial community associated with healthy and diseased pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Front. Microbiol.* 8:1362. doi: 10.3389/fmicb.2017.01362
- Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., et al. (2011). Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One* 6:e24570. doi: 10.1371/journal.pone.0024570

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Giraud, Callac, Boulo, Lam, Pham, Selmaoui-Folcher and Wabete. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

IV.2.3- Synthèse des résultats et perspectives

Cette étude a d'abord mis en évidence des communautés microbiennes partagées par les œufs et les larves nauplii avec leur eau d'élevage ainsi qu'avec les organes reproducteurs de leurs parents (géniteurs mâles et femelles). Au total, 10 familles bactériennes communes ont été identifiées : *Colwelliaceae*, *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Saccharospirillaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*. Parmi ces familles, 7 (*Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Colwelliaceae* et *Alteromonadaceae*) ont déjà été mises en évidence au cours d'élevages d'autres espèces de crevettes pénéides, aussi bien dans l'eau qu'associées aux animaux et ce à différents stades de développement (Liu et al. 2011; Huang et al. 2016; Wang et al. 2020a,b; Heyse et al. 2021). Ces résultats suggèrent une influence de l'environnement sur les communautés microbiennes associées aux crevettes tout au long de leur développement et renforcent ainsi les conclusions apportées par l'étude A concernant une potentielle transmission horizontale. Afin d'évaluer la contribution des géniteurs dans la mise en place du microbiote larvaire, des comparaisons microbiennes ont ensuite été réalisées entre les œufs, les larves au stade nauplius et les testicules des mâles ainsi qu'entre les œufs, les larves au stade nauplius et les ovaires des femelles. Par cette démarche, 4 familles bactériennes communes ont été mises en évidence et 2 n'avaient pas été identifiées dans les eaux d'élevage, *Arcobacteraceae* et *Comamonadaceae*. La transmission verticale de bactéries affiliées à ces familles a été prouvée chez le porc et suggérée chez les volailles ainsi que chez le Discus (Collado & Figueras 2011; Sylvain & Derome 2017). Des taxa appartenant aux *Comamonadaceae* ont également été mis en évidence dans le microbiote intestinal de *Penaeus vannamei*. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces microorganismes pourraient provenir de la nourriture (Huang et al. 2016). L'ouverture de la bouche ayant lieu après le stade nauplius, les larves analysées au cours de cette étude n'ont été exposées à aucune source de nourriture. La présence de *Comamonadaceae* pourrait ainsi être expliquée par une potentielle transmission verticale des géniteurs vers les larves. En conséquence, les premières études menées dans le cadre de cette thèse suggèrent que la mise en place du microbiote larvaire est sous l'influence de communautés microbiennes présentes dans l'environnement d'élevage et associées aux géniteurs. Cependant, la persistance d'ASVs spécifiques aux œufs et aux nauplii laisse à penser que d'autres facteurs pourraient également être impliqués (sélection de l'hôte, facteurs génétiques, développement, etc.). Certaines bactéries maternelles associées, par exemple, à la cuticule ou aux fèces et non considérées lors de cette étude pourraient aussi être verticalement transmises aux œufs. Il est également important de noter que certains microorganismes pourraient trouver des conditions favorables au sein des œufs et des larves au stade nauplius et ainsi devenir actifs, expliquant qu'ils ne soient pas détectés dans l'eau ou les géniteurs. Néanmoins, les 2 premières études présentées ici offrent de nouvelles perspectives de travail. En effet, il pourrait être intéressant de comparer des œufs et des larves nauplii obtenus à partir de géniteurs élevés dans des conditions différentes (températures différentes, séquences alimentaires différentes, exposition à des stress ou non, etc.). Il est également envisageable que les communautés établies en amont des élevages larvaires persistent tout au long du développement et influencent ainsi la survie des animaux. Cette dernière hypothèse sera abordée lors de la méta-analyse présentée dans le chapitre VII (partie VII.2).

CHAPITRE V

**Évolution des communautés
procaryotiques associées à un élevage
larvaire en bonne santé**

V- Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

V.1- Introduction

Après la mise en évidence de potentielles transmissions verticales et horizontales au cours de la mise en place du microbiote larvaire de *Penaeus stylirostris*, la thèse a ensuite eu pour objectif de caractériser les microorganismes procaryotiques associés à des élevages larvaires en bonne santé, ne présentant pas d'épisode de fortes mortalités. En effet, afin de pouvoir évaluer si une dysbiose du microbiote larvaire et / ou du microbiote environnemental pouvait expliquer les mortalités massives observées dans les écloséries calédoniennes (chap. I, partie I.1.2.c), une étude focalisée sur l'évolution des communautés procaryotiques au sein d'élevages en bonne santé était nécessaire. Au début de ce projet, dans la littérature, les études relatives à l'écosystème microbien d'élevages larvaires de crevettes concernaient uniquement l'espèce *P. vannamei* (chap. I, partie I.3.4.a). Elles suggéraient que le microbiote des larves était sous l'influence du stade de développement des animaux et de la nourriture mais aussi des communautés microbiennes présentes dans l'eau d'élevage (Zheng et al. 2017; Xue et al. 2018; Wang et al. 2020a; b). Afin de déterminer si ces facteurs pouvaient également moduler les microorganismes procaryotiques associés aux larves de *P. stylirostris*, des échantillonnages quotidiens d'eau et de larves ont été réalisés au cours d'élevages larvaires conduits dans une éclosérie privée du territoire (campagne d'échantillonnage E1 conduite dans éclosérie privée 1, chap. II, partie II.1.2). Les intrants (eau de remplissage provenant du lagon, eau de réserve, nourriture) ont également été prélevés. Deux élevages larvaires, désignés par A et B, ont été considérés et réalisés chacun en triplicats à partir d'une même eau de réserve et ensemencés avec des larves issues de 2 lots de géniteurs différents. La qualité des eaux prélevées a été évaluée par des mesures de pH et de température ainsi que par des dosages d'ammonium (TAN), de phosphate (SRP) et de matière organique dissoute colorée (CDOM) (chap. II, partie II.4.2). Ces paramètres physico-chimiques ont été visualisés par une heatmap et par une analyse en composantes principales (ACP, Tab. 2, chap. I, partie I.4.1.a). La diversité bactérienne de l'ensemble des échantillons (eaux, aliments, larves) a été évaluée par séquençage Illumina HiSeq (2 x 150pb) des ADNc obtenus après rétrotranscription des ARNs extraits (chap. II, partie II.5.1). Après analyse des données de séquençage avec le package DADA2 (Callahan et al. 2016) (chap. III, partie III.3.2) sous RStudio et normalisation de la table d'ASVs avec la méthode CPM (chap. III, partie III.4.2.b et chap. II, partie II.5.2), une classification ascendante hiérarchique basée sur une matrice de distance de Bray-Curtis et sur la méthode de Ward a été construite. Les diversités alpha (indices de diversité) et bêta (ordonnancements par dendrogramme et PCoA) ont été analysées. Les taxa enrichis en fonction du jour d'élevage ou du stade développement des animaux ont été mis en évidence par des analyses discriminantes linéaires (LDA) avec effet de taille (LEfSe). Des corrélogrammes ont également été construits pour évaluer les corrélations existantes entre les paramètres physico-chimiques considérés et les taxa bactériens enrichis dans l'eau ou dans les larves (chap. II, partie II.5.3).

V.2- Article 3 – Environmental factors and potential probiotic lineages shape the active microbiota associated with healthy *Penaeus stylirostris* larvae and their rearing water

L'article présenté dans cette partie est en cours de rédaction. Dans un souci de protection des données et dans l'attente de la signature d'une convention entre l'Ifremer et l'écloserie privée 1, cette dernière a été anonymisée. En conséquence, la liste des auteurs est susceptible d'être modifiée avant soumission.

Environmental factors and potential probiotic lineages shape the active microbiota associated with healthy *Penaeus stylirostris* larvae and their rearing water

Carolane Giraud^{1,2}, Nelly Wabete¹, Célia Lemeu¹, Nazha Selmaoui-Folcher², Dominique Pham¹, Viviane Boulo³, Nolwenn Callac¹

¹Ifremer, IRD, Université de la Nouvelle-Calédonie, Université de la Réunion, CNRS, UMR 9220 ENTROPIE, Noumea, New Caledonia

²University of New Caledonia, Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA), Noumea, New Caledonia

³IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan via Domitia, Montpellier, France

Keywords: Active microbial communities, shrimp larval rearing, physico-chemical factors, commensal microorganisms, probiotics

Abstract

Background: As most organisms, marine animals host microorganisms which are essential to their physiology and health. These commensal microbial communities maintain close interactions with the microbiota of their host's rearing water. In aquaculture systems, a disruption of these essential commensal and environmental microbial communities has been suggested to cause disease outbreaks. More specifically, such a microbial dysbiosis is hypothesized to cause larval mass mortalities in New-Caledonian shrimp hatcheries. In order to confirm this hypothesis and allow further microbial comparisons, this study focuses on the active microbiota of healthy *Penaeus stylirostris* larvae and their surrounding environment during the first 10 days of larval rearing.

Results: Using daily nutrient concentration quantitative analyses and spectrophotometric organic matter analyses, we highlight a global eutrophication of the rearing environment. We also evidence drastic microbial community modifications in the rearing water and the larvae samples using Illumina HiSeq sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene. We confirm that *Alteromonadales*, *Rhodobacterales*, *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales* and *Vibrionales* members form the core microbiota of shrimp larvae. We also identify, in the water and the larvae samples, several potential probiotic microbial strains affiliated to the *AEGEAN 169 marine group* and the *OM27 clade* as well as to the *Ruegeria*, *Leisingera*, *Pseudoalteromonas* and *Roseobacter* genera. Finally, investigating the existing correlations between the considered environmental factors and the major bacterial taxa of the rearing water and the

larvae samples, we suggest that deterministic and stochastic processes are involved in the assembly of microbial communities during the larval rearing of *P. stylirostris*.

Conclusion: During the first 10 days of larval rearing, we highlight important modifications of the microbiota associated with the rearing water and the larvae samples as well as physicochemical variations in the rearing environment. Overall, our results show that all these drastic changes mostly occurred during the zoea stages suggesting that this larval phase is crucial during shrimp larval development. Furthermore, the identification of different potential probiotics throughout the rearing could lead to adapt probiotic use in aquaculture facilities in New-Caledonia.

Background

There is a significant contrast between the very small size of microorganisms and their essential role in all environments. Through their metabolic and genetic diversity, microorganisms are able to colonize all sorts of habitats therefore forming a microbiota [1,2]. In water and soil ecological niches, microbial communities are involved in nutrient recycling and biogeochemical cycles which are necessary processes in the sustainability of all ecosystems [3]. Beyond their ecological interest, microorganisms are also able to establish symbiotic relationships with multiple organisms ranging from plants to mammals. In animals, these microbial symbionts colonize various types of tissues and produce many metabolites influencing the digestion, the growth and the immune system of the host as well as other key physiological processes [2,4,5,6,7]. The establishment and the modulation of the microbiota of a given host often results from complex interactions between environmental factors and vertically transmitted microbial communities as well as host selection pressure and genetic background [2,8]. For example, such processes have been suggested to modulate the commensal microorganisms associated with the early life stages of Pacific blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, larvae [9,10]. As a consequence of these very specific interactions, hosts harbor a very well adapted microbiota [11]. Under biotic or abiotic stress, this microbiota can be disrupted by an expansion of r-strategist microorganisms and opportunistic pathogens or by a loss of beneficial microorganisms and microbial diversity leading to a microbial dysbiosis [12,13,14]. In marine animals, such a dysbiosis has been suggested to lead to opportunistic or polymicrobial infections causing disease outbreaks in marine ecosystems [13] and more particularly in aquaculture systems [15]. For example, in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*, modifications of the gut microbiota were correlated with disease severity and beneficial bacteria were associated with healthy individuals while potential pathogenic strains were highlighted in diseased shrimps [16,17]. Furthermore, microbial dysbiosis in the rearing water and the larvae of the Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*, have been hypothesized to explain massive larval mortalities occurring in New-Caledonian hatcheries [18].

In New-Caledonia, the semi-intensive farming of *P. stylirostris* leads to an annual estimated production of 1500 tons and allows the employment of over 500 people. Shrimp farming is currently the island's first food-processing exporter and is therefore a very important socio-economic activity for the territory [19]. Unfortunately, due to the previously mentioned massive larval mortalities occurring in the hatcheries, the post-larvae production decreased by 25% between 2005 and 2019 and it is currently threatening the sustainability of shrimp farming in New-Caledonia [20]. In order to confirm the potential role of dysbiosis in the observed larval mortalities, a characterization of the microbiota associated with healthy *P. stylirostris* larvae and their rearing water seemed necessary to allow microbial comparisons

between healthy and moribund rearings. Thus, we present a new study focusing on the temporal evolution of the microbiota associated with healthy *P. stylirostris* larvae as well as with their surrounding environment during the first ten days of larval rearing. Using high-throughput Illumina sequencing (2x150 pb) of the active microbiota, we were able to identify the major bacterial orders daily associated with the water and the larvae samples and further investigated these microbial communities using Linear Discriminant Analyses (LDA) effect size (LEfSe) according to the rearing day and the larval developmental stage. We highlighted several potential probiotic strains with varying abundances throughout the experiment which could lead to adapt probiotic use during larval rearing in New-Caledonian hatcheries. Finally, we investigated the correlations existing between the highlighted microbial biomarkers and the physicochemical parameters of the rearing water. These results suggest that deterministic and stochastic processes may be involved in the assembly of the microbial communities associated with *P. stylirostris* larvae and their rearing water.

Materials and Methods

Study design

All samples were collected during an experiment conducted in a New-Caledonian private shrimp hatchery. Prior to larval rearing, mature male and female breeders were used to perform artificial inseminations, as described by Pham et al. (2012) [21]; and 250L hatching tanks were filled with treated natural seawater from the lagoon. Briefly, lagoon seawater was pumped through a sand filter and a 1 μ m pore size filter and stocked in a hatching reservoir equipped with heating and UV (ultraviolet rays) cycling systems. Before filling the hatching tanks, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was added to the hatching water reservoir (15ppm) (Fig. 1A). After artificial inseminations, inseminated females were placed in the hatching tanks at a rate of 1 individual per tank and were left to spawn in the dark. After spawning, females were retrieved while eggs were left in the hatching tanks. The next day, after hatching, the released nauplii (first larval stage) were pooled, abundantly rinsed and disinfected. On the same day, 10m³ rearing tanks were filled with treated natural seawater from the lagoon. Briefly, lagoon seawater was pumped the day before larval rearing through a sand filter and sent to a decantation reservoir equipped with a skimmer and a degassing system. Water from the decantation reservoir was then filtered through a series of 25, 10, 5 and 1 μ m pore size filters and stocked in a rearing reservoir equipped with heating and UV cycling systems (Fig. 1B). Before nauplii were added at a rate of 180 individuals per liter to the rearing tanks (Day 0 of the experiment), EDTA was added (15 ppm). Progressive bubbling was implemented during the whole rearing process, salinity was kept at 30ppt (\pm 1ppt) and no water renewal was performed. Water temperature was controlled by heating resistances placed in the tanks. Temperature was increased from 27°C to 30°C between D0 and D2 in order to help larval transitioning from nauplius to zoea stage and then remained stable until the end of the experiment (29.9°C \pm 0.4°C). From Day 4 (D4) to the end of the experiment (D9), oxytetracycline (OTC) was daily added to the rearing tanks. The first antibiotic dose was added at 70ppm and was reduced to 17ppm the following days. From D2 to D9, larvae were fed with different sources of microparticles according to their larval stage (feeding protocol developed by the hatchery). Diet was supplemented with frozen *Artemia* sp. larvae from D4 to the end of the experiment (Fig. 1C). Larvae were fed every 2 hours from 4am to 10pm.

During this experiment, 2 larval rearing cycles were considered and were named A and B. These rearing cycles were conducted using the same reservoir water but larvae were

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

obtained from artificial inseminations performed using different breeders on two successive days. For each rearing cycle, triplicates were performed (A1, A2, A3, B1, B2, B3). A 250L tank filled with the same water as the rearing tanks and with no larvae or food addition was considered to be the control of our experiment (Ctrl).

Sample collection

As larval rearing cycles A and B were conducted using the same reservoir water, unique samples of lagoon seawater (LS), decantation reservoir (DR) and rearing reservoir (RR) were collected prior to the beginning of the experiment (Fig. 1B). For each sample, 1l of seawater was collected using a 2l plastic vial. For each larval rearing cycle, on the day the hatching tanks were filled, 1l of water was collected from the hatching reservoir (named HR_A and HR_B). On the same day, after spawning, around a hundred eggs were sampled from the hatching tanks in 2ml sterile microtubes using a 100 μ m pore size net and sterilized tweezers. The next day, 1l of water was collected from all the rearing tanks after EDTA addition and before nauplii addition (W_D0). On the same day, around a hundred nauplii were sampled after the disinfection process and before addition to the rearing tanks (L_D0). From D1 to D9, prior to the first feeding of the day, larvae (L) and rearing water (W) were daily sampled from all the considered rearing tanks. Around 100 larvae were collected in sterile 2ml microtubes using a 120 μ m pore size net and sterilized tweezers. In order to sample 1l of rearing water with no larvae, a 120 μ m filtering device and a 2l plastic vial were used. Water samples were also daily collected from the control tank at the same sampling time as the rearing tanks. Every food type was sampled once during the experiment in 2ml sterile microtubes using sterilized tweezers (F1, F2, F3, F4, *Artemia* sp. larvae).

All the water samples were filtered using 0.2 μ m pore size filters (S-PAK membrane filter, Millipore). Filters as well as egg, larvae and food samples were stored at -80°C until further RNA extractions. Filtered water was used to fill 40ml sterile polyethylene vials which were stored at -20°C for further Total Ammonium Nitrogen (TAN) and Soluble Reactive Phosphorus (SRP) quantitative analyses. Filtered water was also used to fill 50ml pre-combusted (8h, 450°C) glass bottles in order to perform Colored Dissolved Organic Matter (CDOM) spectrophotometric analyses within hours after the sample collection.

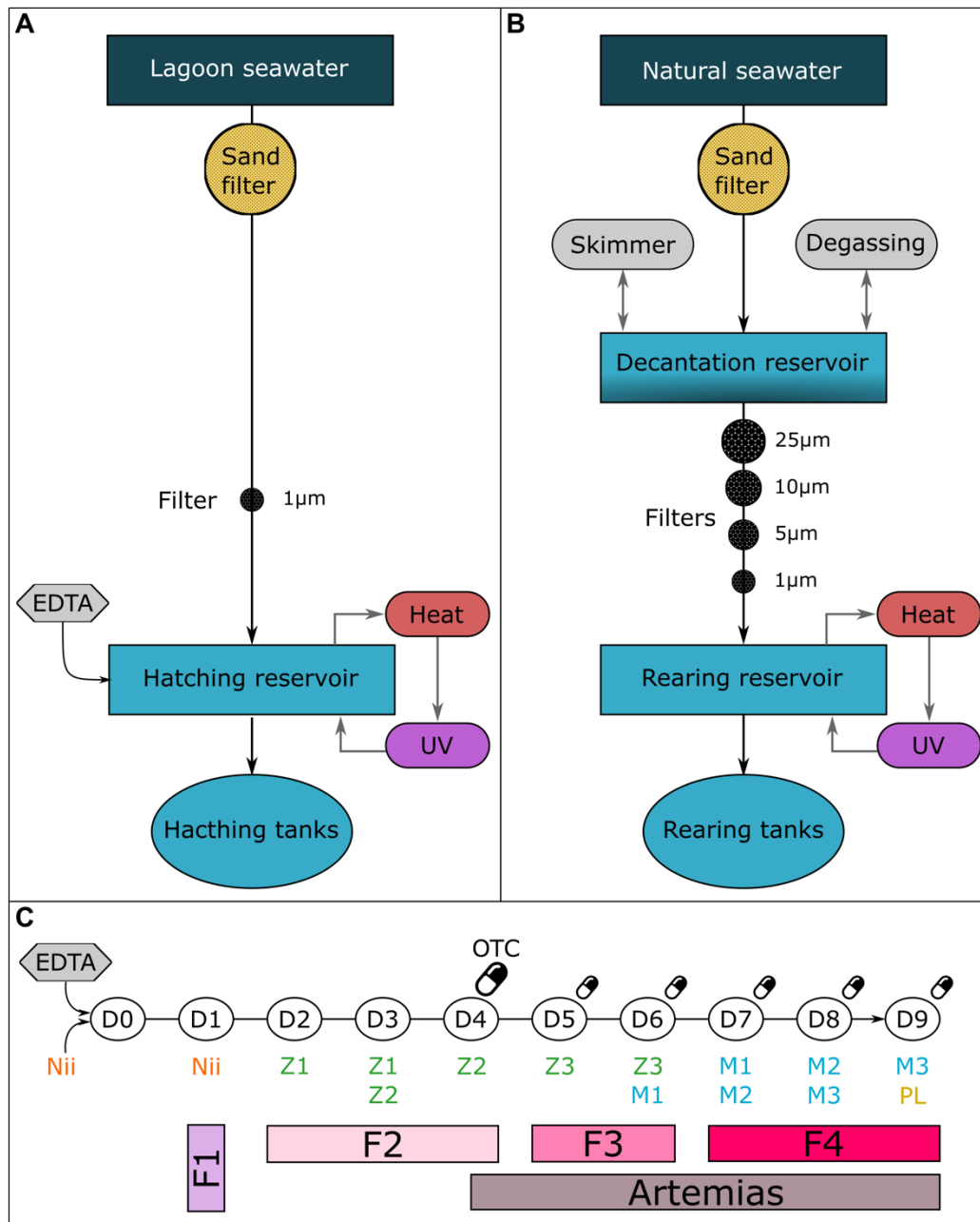


Figure 1 – Water treatments and larval rearing process.

Natural lagoon seawater was pumped, treated and used to fill (A) the hatching tanks and (B) the rearing tanks. (C) Larval rearing cycles started when nauplii (Nii) were added to the rearing tanks after ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) addition on Day 0 (D0). On Day 4 (D4), 70ppm of oxytetracycline (OTC) were added to the rearing tanks. Daily OTC doses were reduced to 17 ppm from Day 5 (D5) to Day 9 (D9). On Day 1 (D1), larvae were at nauplius stage (Nii) and were fed with a first type of microparticles (F1). From Day 2 (D2) to Day 4 (D4), larvae were at zoea 1 (Z1) and zoea 2 (Z2) stages and were fed with a second type of microparticles (F2). On Days 5 and 6 (D5 and D6), larvae were at stages zoea 3 (Z3) and mysis 1 (M1) and were fed with a third type of microparticles (F3). From Day 7 (D7) to Day 9 (D9), larvae were at mysis 1, 2, 3 (M1, M2, M3) and post-larvae (PL) stages and were fed with a fourth type of microparticles (F4). Microparticles were supplemented with frozen *Artemia* sp. larvae from Day 4 (D4) to Day 9 (D9).

Zootechnical parameters

For each considered rearing tank, larvae contained in 1l of rearing water were daily observed under a binocular magnifying glass in order to determine larval stages and survival rates.

The larval survival rate (LSR), expressed in percent, was daily determined using the following equation: $(n / T) \times 100$ where n is the number of counted living larvae in the considered rearing tank and T the number of larvae added to the rearing tank on D0.

The larval stage index (LSI) was daily determined using a modified equation of Maddox & Manzi (1976) [22]: $(0 \cdot N_{ii} + 1 \cdot Z_1 + 2 \cdot Z_2 + 3 \cdot Z_3 + 4 \cdot M_1 + 5 \cdot M_2 + 6 \cdot M_3 + 7 \cdot PL) / N$ where N_{ii} corresponds to the number of larvae observed at nauplius stage and Z_1 , Z_2 and Z_3 indicate the number of larvae respectively observed at stages zoea 1, 2 and 3. In the same way, M_1 , M_2 and M_3 correspond to larval stages mysis 1, 2 and 3. PL stands for the number of observed post-larvae. Finally, N indicates the total number of observed larvae on the considered rearing day.

Water quality analysis

For all water samples, temperature and pH were daily measured using the multiparameter probe pH/Cond 3320 (Mettler Toledo). Concentrations of Total Ammonia Nitrogen (TAN) and Soluble Reactive Phosphorus (SRP) were respectively measured using the methods described by Holmes et al. (1999) [23] and Murphy & Riley (1962) [24]. Colored dissolved organic matter (CDOM) analyses were performed by determination of the absorption spectra of the water samples from 200 to 700nm using a 10cm quartz tank and a SHIMADZU UV-1800 spectrophotometer [25]. MilliQ water was considered to be the reference of our analysis. The absorption coefficient at 325nm ($a_{\lambda 325nm}$) was used as a proxy of the CDOM concentration [26] and was determined using the following equation: $(2.303 \cdot a) / l$ where 2.303 is the logarithm transformation factor, a is the measured absorption at 325nm and l is the length of the quartz tank (10cm). The slope ratios of the absorption spectra from 275 to 295nm ($S_{275-295}$) and from 350 to 400nm ($S_{350-400}$) were determined in order to calculate the total slope ratio (SR) using the following equation: $S_{275-295} / S_{350-400}$.

RNA extractions and sequencing

RNA extractions were performed using the RNeasy PowerWater kit (Qiagen) for the water samples and the RNeasy minikit (Qiagen) for the egg, the larvae and the food samples. All RNAs were «reverse»-transcribed into complementary DNAs (cDNAs) according to the protocol described in Giraud et al. (2022) [10].

All the obtained cDNAs were sent to MrDNA (Shallowater, TX, United States) to amplify and sequence the V4 region of 16S rRNA gene using the 515F/806R primers [27]. Following this step, an HiSeq Illumina sequencing was performed using a 2x150pb paired-end run and an average sequencing depth of 50k raw reads per sample. Raw sequences obtained from the HiSeq Illumina sequencing were treated using the DADA2 package [28] implemented in RStudio [29] as described in Giraud et al. (2021) [9]. Prior to microbiota analysis, sequences affiliated to Eukaryotas, Chloroplasts and Mitochondrias were removed from the ASV table. A total of 68,490,986 reads were found and 13,291 ASVs were evidenced. Minimum library size was 117,730 reads and maximum library size was 1,474,219 reads. As a consequence, the final ASV table was normalized using the CPM method implemented in the normalize function of the phyloseq package in RStudio [30].

The datasets generated and analyzed during the current study are available in the NCBI SRA repository (BioProject PRJNA736535, SPR21099695 to SPR21099837).

Downstream analysis

Using the ggplot2 package implemented in RStudio [31], a heatmap was built to visualize zootechnical and physicochemical parameters. In order to reduce dimensions and to simplify visual representations of these parameters, a standardized Principal Component Analysis (PCA) was performed using the dudi.pca function of the ade4 package in RStudio [32].

Microbial analyses were conducted using the phyloseq package in RStudio [30]. Alpha diversity indexes were determined using the plot_richness function and Principal Coordinates Analysis (PCoA) ordinations were built using the ordinate and plot_ordination function. A dendrogram based on a Bray-Curtis dissimilarity matrix and the Ward method was also constructed using the vegan package in RStudio [33]. Linear discriminant analyses (LDA) effect size (LEfSe) [34] were performed using the microbiomeMarker package in RStudio [35]. Relative abundances of the ASVs highlighted by the LEfSe with a threshold set at 4, were visualized by constructing scatterplots using the ggplot2 package in RStudio [31]. The microeco package in RStudio [36] was used to build correlograms between the physicochemical parameters and the ASVs highlighted by the LEfSe.

All the statistical differences highlighted for the environmental factors were evaluated using Kruskal-Wallis tests followed by Wilcoxon post-tests using the rstatix package in RStudio [37]. Differences were considered significant when p-values were inferior to 0.05.

Results

Zootechnical and physicochemical parameters

Larval survival rates (LSR) decreased in all the rearing tanks and the lowest value observed on the final day of the experiment was 69% (A3 and B3 tanks) (Fig. 2A). On the contrary, as the larvae grew, larval stage indexes (LSI) increased in all the rearing tanks (Fig. 2B) and all observed larvae were transitioning to post-larvae stage (LSI = 7) on Day 9 (D9). All zootechnical parameters were homogeneous between the 2 considered larval rearing cycles (A and B).

As expected, temperature increased in all the rearing tanks from D0 to D2 (27 to 30°C) and remained stable ($29.9 \pm 0.4^\circ\text{C}$) from D3 to D9 (Fig. 2C). Ammonium (TAN) and phosphorus (SRP) concentrations increased progressively during both larval rearing cycles compared to the control tank (Fig. 2D and 2E). Indeed, TAN and SRP concentrations were null or near $0\mu\text{M}$ in the rearing tanks at the beginning of the experiment and respectively reached 322 and $9.9\mu\text{M}$ on D9 while values remained low in the control tank. CDOM concentration ($a_{\lambda_{325\text{nm}}}$) values were also significantly different as they increased in all the rearing tanks compared to the control tank (Fig. 2F). More precisely, $a_{\lambda_{325\text{nm}}}$ values (CDOM concentration proxy) shifted between D4 and D5 as they varied from 2 to 5 m^{-1} from D0 to D4 and from 19 to 35 m^{-1} from D5 to D9. On the contrary, pH (Fig. 2G) and slope ratio (SR) (Fig. 2H) values decreased from D5 to the end of the experiment. From D0 to D4 in the rearing tanks, pH values increased up to 8.2 and then decreased to 8 by the end of the experiment while pH was never inferior to 8.1 in the control tank. In the same way, SR values remained stable in the control tank while they equaled 5 from D0 to D4 and decreased to 3.8 from D5 to D9 in the rearing tanks.

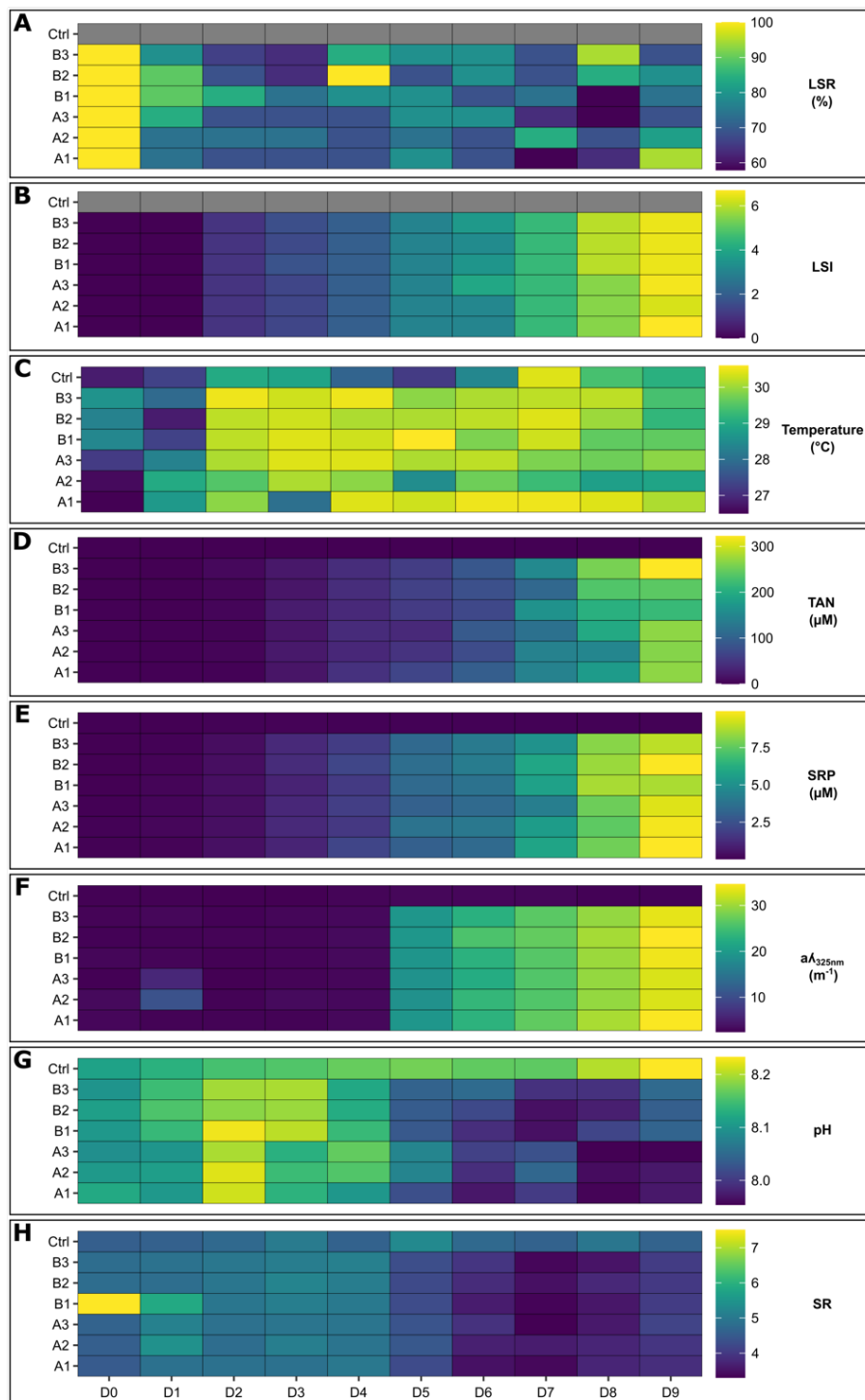


Figure 2 – Heatmap of all zootechnical and physicochemical parameters in the rearing and the control tanks.

(A) Larval Survival Rates (LSR) and (B) Larval Stage Indexes (LSI) in all the rearing tanks (larval rearing cycle A: A1, A2, A3, larval rearing cycle B: B1, B2, B3) from Day 0 (D0) to Day 9 (D9). As no larvae were added to the control (Ctrl) tank, no LSR or LSI were calculated. (C) Temperature, (D) Total Ammonium Nitrogen (TAN) concentration, (E) Soluble Reactive Phosphorus (SRP) concentration, (F) Colored Dissolved Organic Matter concentration ($a_{\lambda 325nm}$), (G) pH and (H) slope ratio (SR) values in the rearing and the control tanks from D0 to D9. In all the heatmaps, minimum values are represented in dark blue and maximum values are represented in yellow.

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

In order to allow better visual representation of all the physicochemical parameters in the rearing tanks, a standardized Principal Component Analysis (PCA) was performed and explained more than 87% of the total inertia for the first two principal axes (Fig. 3A). The correlation circle obtained from this analysis showed that the vectors associated with the $a\lambda_{325nm}$, TAN and SRP variables were oriented in the same way and were close to each other suggesting that these parameters were positively correlated. In the same way, pH and SR values also seemed to be positively correlated. As $a\lambda_{325nm}$, TAN, SRP, pH and SR were close to the horizontal axis, the PCA1 seemed to be driven by a pH and organic matter gradient. The vertical axis (PCA2) was driven by a temperature gradient which was not related to the other considered parameters. We observed how all the rearing samples clustered according to their physicochemical parameters, their sampling day and their larval stage (Fig. 3B and 3C).

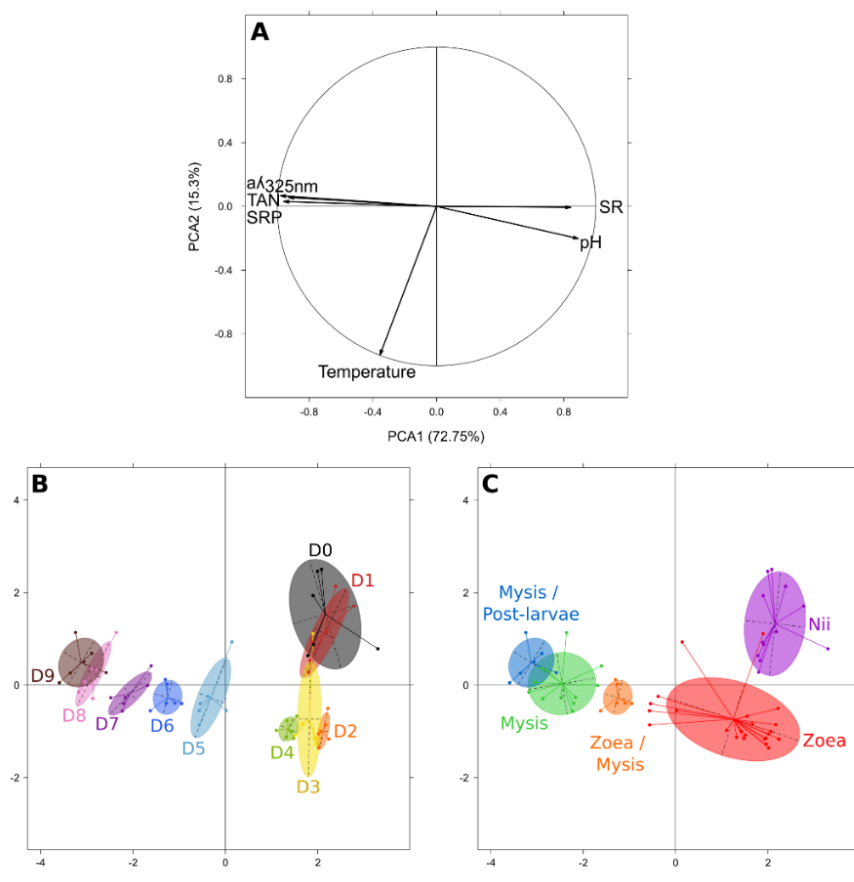


Figure 3 – Standardized Principal Component Analysis (PCA) of the physicochemical parameters in the rearing water of all the samples from Day 0 (D0) to Day 9 (D9).

(A) Correlation circle of the physicochemical parameters measured in the rearing tanks throughout the whole rearing cycle. Soluble Reactive Phosphorus (SRP) concentration, Total Ammonium Nitrogen (TAN) concentration, CDOM concentration ($a\lambda_{325nm}$), slope ratio (SR), pH and temperature, values were considered. (B) Visual representation of the samples according to their physicochemical parameters. Samples are clustered by rearing day, from Day 0 (D0) to Day 9 (D9). (C) Visual representation of the samples according to their physicochemical parameters. Samples are clustered by larval stage, from nauplii (Nii) to post-larvae stage. Larval transitioning phases from zoea to mysis and from mysis to post-larvae are respectively represented in orange and blue.

Samples collected at D0 and D1 were characterized by low temperature values, which was expected, as well as low TAN, SRP and CDOM ($a\lambda_{325nm}$) concentrations and by high pH and SR values. These samples corresponded to the nauplius (Nii) larval stage. When larvae grew to zoea stage from D2 (Z1) to D4 (Z2), samples were characterized by expected higher temperature values while pH, SR, TAN, SRP and CDOM values remained similar to the first samples. Finally, during the late zoea (Z3) and all the mysis stages, from D5 to D9, physicochemical parameters of the samples shifted and were characterized by decreasing SR and pH values and by increasing TAN, SRP and CDOM concentrations. Thus, it appeared that physicochemical parameters of the rearing water samples varied according to the rearing day and the larval stage which are 2 closely related factors. In order to evaluate if these changes of the rearing environment could impact the microbiota associated with the water and the larvae in the rearing tanks, we performed microbiota analyses.

Microbial compositions of all the samples

We first observed how samples clustered according to their global microbial composition. A hierarchical clustering of all the samples highlighted 7 clusters (Fig. 4A). The control and the rearing water samples collected on Day 0 (D0) were gathered in cluster 1 (C1). The second cluster (C2) was composed by the control samples collected from D2 to D9. The third cluster (C3) grouped the larvae samples collected on D0 as well as all the water and the larvae samples from D1 to D2. All the egg samples were also gathered in this cluster. Thus clusters 1, 2 and 3, which belonged to the same large cluster, gathered all the rearing water and the larvae samples from D0 to D2 as well as all the control and the egg samples. All the rearing water samples collected on D8 and D9 as well as all the water samples of the larval rearing cycle A from D6 to D7 were clustered in cluster 4 (C4). The fifth cluster (C5) gathered all the larvae samples collected from D5 to D9 for both rearing cycles. The water samples from the rearing cycle B and collected from D4 to D7 were grouped in the sixth cluster (C6). Finally, the last cluster (C7) was composed by all the larvae samples collected on D3 and D4 as well as water samples from the first rearing cycle (A) from D3 to D5 and from D3 of the second rearing cycle (B). Thus, clusters 4 to 7 formed a large group which gathered all the water and the larvae samples from D3 to D9. Thus, this first clustering analysis showed that microbial compositions of the samples changed after the second day of rearing. In addition, the water and the larvae samples were mixed in the clusters associated to the first rearing days (D0 to D2), while they were clustered in separate groups from D3 to D9. Furthermore, during that period, another microbial composition shift seemed to occur between D4 and D6 in all the samples. In order to investigate these observations, we conducted ordinations of the water and the control samples (Fig. 4B) as well as the larvae and the egg samples (Fig. 4C) using the Principal Coordinates Analysis (PCoA) method and a Bray-Curtis dissimilarity matrix.

The ordination of the water and the control samples showed a first cluster gathering all the control samples as well as the rearing water samples collected from D0 to D2 (Fig. 4B). The ordination of the egg and the larvae samples also clustered all the samples collected from D0 to D2 as well as all the egg samples (Fig. 4C). On these rearing days, larvae were at nauplii and zoea 1 stages. Furthermore, in both ordinations, samples collected from D3 to D5 clustered together and corresponded to the rearing days where larvae were at zoea stage. Samples collected from D7 to D9, which corresponded to the rearing days where the larvae were at mysis and post-larvae stage, grouped together in the 2 constructed ordinations. In order to understand these clusters, we investigated the major bacterial orders composing the considered samples (Fig. 4D and 4E). We first observed that *Rhodobacterales* were present

throughout the whole experiment in all the water samples (Fig. 4D). On D0, homogeneous proportions of *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales*, *Rhodospirillales* and *SAR11* were also observed in the control and the rearing tanks. Abundances of *Rhodospirillales* and *SAR11* drastically decreased in the rearing water samples on D1 while variable abundances of *Oceanospirillales* and *Flavobacteriales* persisted throughout the experiment. On D1, proportions of *Alteromonadales* increased then decreased from D2 to D5. During those rearing days, a shift occurred as abundances of *Chitinophagales* increased after *Alteromonadales* decreased. Then, as for *Oceanospirillales*, the proportion of *Chitinophagales* grew until the end of the experiment. Between D3 and D6, some bacterial communities peaked as high abundances of *Cytophagales* and *Bdellovibrionales* were only observed during that time period. Thus, the microbial composition of the water samples dramatically changed between D2 and D6. The microbial composition of the control water samples, which did not receive larvae nor antibiotic addition, was identical to the microbial composition of the rearing water samples on D0 and D1. However, this changed from D2 to D9 as *Cellvibrionales* largely increased in the control tank while they had a very low relative abundance in the rearing tanks.

The larvae and the egg samples showed 12 main bacterial orders with a total relative abundance higher than 1% and were majorly composed by *Alteromonadales* as well as *Rhodobacterales* in a smaller proportion (Fig. 4E). *Flavobacteriales* as well as *Vibrionales* and *Oceanospirillales* were also highlighted in the eggs. From D0 to D2, the bacterial compositions of the larvae samples were more heterogeneous. For example, some samples collected during the first larval rearing cycle (A) from D0 to D2 showed high abundances of *Burkholderiales* which were not highlighted in the other samples collected (rearing cycle B) on the same rearing day. In the same way, one sample collected on the 2nd day of rearing during the larval rearing cycle B was majorly composed by *Micrococcales* which were less abundant in the other samples of the rearing cycle A collected at the same time. *Chitinophagales* also had heterogeneous proportions in the larvae on D0 and D1 but their abundance increased in all the larvae samples on D2 and they were highlighted from D3 to D6. From D3 to the end of the experiment, the larvae samples had more homogeneous compositions even though compositions drastically changed between D3 and D9. Indeed, on D3 and D4, proportions of *Cytophagales* and *Caulobacterales* increased while they were less abundant from D6 to D9. In the same way, *Bdellovibrionales* peaked on the 5th and the 6th days of rearing. *Cellvibrionales* and *Alteromonadales* increased from D5 to the end of the experiment while *Flavobacteriales* decreased. Thus, as for the water samples, the composition of the larval microbiota drastically changed between D2 and D6 which corresponded to the time period where larvae were at zoea stage. As for the physicochemical parameters considered earlier, the microbial composition of the larvae and their rearing water seemed to be affected by the rearing day and the larval stage. Thus, we conducted LEfSe in order to further study the microbiota of the water and the larvae samples according to these 2 factors.

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

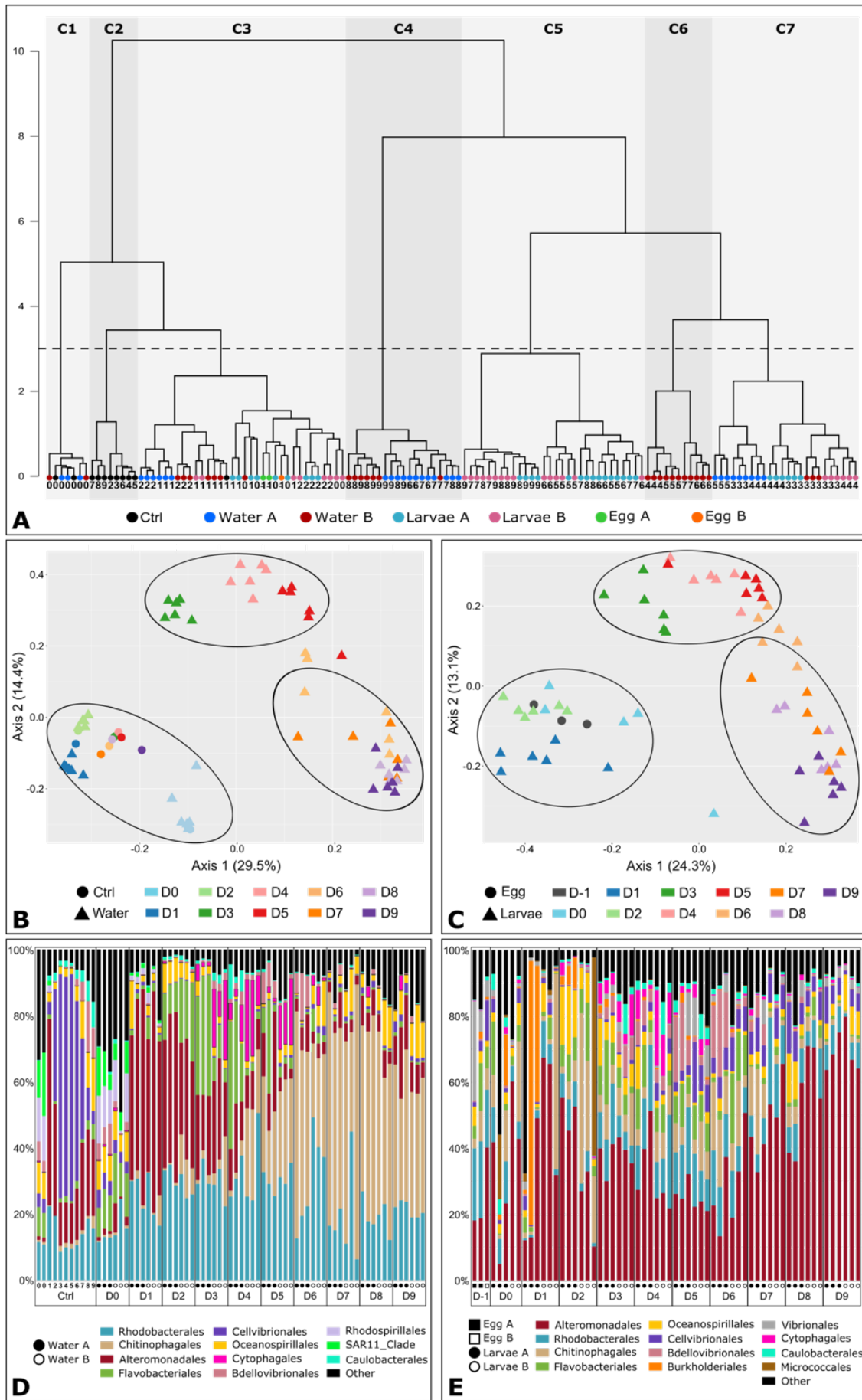


Figure 4 – Clustering and global microbial composition of the water and the larvae samples.

Two larval rearing cycles were analyzed during the experiment and are indicated as A and B. (A) Hierarchical clustering based on a Bray-Curtis dissimilarity matrix and the Ward method groups the water, the larvae, the egg and the control (Ctrl) samples in 7 clusters (C1 to C7) when considering a threshold of 3 represented by the black dotted line. Each sample type is represented by a colored circle and rearing days are noted under the circles. (B) Ordination of the control (Ctrl) and the water samples based on the PCoA method and a Bray-Curtis dissimilarity matrix. (C) Ordination of the egg and the larvae samples based on the PCoA method and a Bray-Curtis dissimilarity matrix. In figures 4B and 4C, clusters are represented by black circles. (E) Histogram of the 11 bacterial orders with a relative abundance higher than 1% in the control and the water samples. (D) Histogram of the 12 bacterial orders with a total relative abundance higher than 1% in the egg and the larvae samples. In figures 4D and 4E, all orders with a relative abundance lower than 1% are summed in the “Other” category. In figures 4B to 4E, all rearing days are indicated by the letter D followed by the number of the rearing day (from 0 to 9).

Enriched ASVs in the water and the larvae samples according to the rearing day and the larval stage

The first LEfSe was conducted to analyze the ASVs enriched in the rearing water samples according to their rearing day (Fig. 5A). We then analyzed the relative abundances of the highlighted ASVs in all the samples in order to observe if they were present since the beginning of the rearing process in the water and if they were also highlighted in the larvae and the food sources up to the considered rearing day (Fig. 5B). On the first day of rearing (D0), samples were dominated by 2 ASVs affiliated to the *Rhodobacteraceae* family and the *AEGEAN 169 marine group* (Fig. 5A). These ASVs were also found in the rearing reservoir with a relative abundance higher than 1% (Fig. 5B). The following day (D1), 4 ASVs were highlighted and were affiliated to the *Aestuariibacter*, *Alteromonas*, and *Cognatishimia* genera. On the second day of rearing (D2), 3 ASVs dominated the samples and were affiliated to the *Nautella* genus, the *Flavobacteriales* order and the *Rhodobacteraceae* family. On D3, 3 ASVs were highlighted and were affiliated to the *Cryomorphaeae* and the *Rhodobacteraceae* families as well as the *Saprospira* genus. A total of 5 ASVs dominated the water samples collected on D4. These ASVs were affiliated to 4 distinct genera: *Fabibacter*, *Aestuariicoccus*, *Owenweeksia* and *Lewinella*. On the fifth day (D5), the water samples showed 5 ASVs affiliated to *Ruegeria*, *Pseudoalteromonas* and *Nioella* as well as to the *Saprospiraceae* family. ASVs affiliated to the *OM27 clade* and the *Alcanivorax* genus dominated the rearing water samples collected on D6. The following day (D7), 2 ASVs were highlighted and were affiliated to the *Saprospiraceae* family and the *Marivita* genus. On D8, only 1 ASV belonging to the *Phaeodactylibacter* genus was highlighted. Finally, on the last rearing day (D9), ASVs affiliated to *Pseudoalteromonas*, *Litoricola* and *Leisingera* dominated. All the ASVs showed by the LEfSe were found in the water reservoirs, the larvae and the rearing water samples. Their relative abundance increased in these samples throughout the rearing days. All the ASVs had a relative abundance lower than 1% in the food samples except for ASV52 which was not found in the food and for ASVs 1 and 2 which had a relative abundance higher than 1% especially in F4 (Fig. 5B).

An LEfSe was also conducted considering the differentially abundant ASVs in the egg and the larvae samples according to their developmental stage (Fig. 6). As for the first LEfSe, we analyzed the relative abundances of these ASVs in all the samples in order to observe if

they were present since the beginning of the rearing process in the larvae and if they were also highlighted in the water and the food sources up to the considered rearing day. The egg samples were dominated by 2 ASVs which were affiliated to the *Rhodobacteraceae* family and the *Vibrio* genus (Fig. 6A). These 2 ASVs had a relative abundance higher than 0.1% in the hatching reservoirs (Fig. 6B). The nauplii (Nii) stage (from D0 to D1) was dominated by a *Saprospira* which was found in the hatching and the rearing reservoirs as well as in the eggs and the rearing waters on Days 0 and 1 (D0 and D1). The first zoea stage (Z1) on D2, was characterized by 5 ASVs affiliated to 4 distinct genera: *Aestuariibacter*, *Alteromonas*, *Saprospira* and *Thalassolituus*. All these ASVs were found in the water and the larvae samples prior to the second rearing day and their relative abundances increased constantly. Larvae on D3 were transitioning from stages zoea 1 (Z1) to zoea 2 (Z2) and were dominated by 2 ASVs; one was affiliated to the *Rhodobacteraceae* family while the other one was affiliated to the *Owenweeksia* genus. The Z2 stage (D4) was dominated by 3 ASVs affiliated to the *Fabibacter*, *Hyphomonas* and *Pseudoceanicola* genera. The zoea 3 (Z3) stage on D5 was characterized by 2 ASVs which belonged to the *Thalassotalea* and *Leisingera* genera. On the sixth day of rearing, larvae were transitioning from stages zoea to mysis 1 (M1) and were dominated by 5 ASVs from the *OM27 Clade*, and the *Fluviicola*, *Thalassotalea* and *Halioblogus* genera, as well as the *Saprospiraceae* family. During the first mysis stages (M1, M2) on D7, 2 ASVs were highlighted and affiliated to *Phaeodactylibacter* and *Roseobacter*. Only 1 ASV was highlighted when considering the larvae at M2 and M3 stages on D8. It was affiliated to the *Oleiphilus* genus. Finally, when larvae were transitioning from mysis to post-larvae (PL) on the last day of rearing (D9), 4 ASVs were highlighted. Among these ASVs, 3 were affiliated to the *Pseudoalteromonas* genus and 1 to *Thalassotalea*. All the highlighted ASVs were found in the reservoir and the egg samples as well as in all the larvae and the water samples collected prior to the considered sampling time. Relative abundances in these samples increased throughout the rearing cycle. The ASVs were also found in the food samples but almost always had a relative abundance inferior to 0.1%. Thus, we highlighted microbial biomarkers up to the genus level, when possible, of the rearing day and the larval stage for the water and the larvae samples and all these microbial strains were present in the water reservoirs since the beginning of the experiment. We finally investigated if any correlation existed between these evidenced microbial strains and the considered physicochemical parameters.

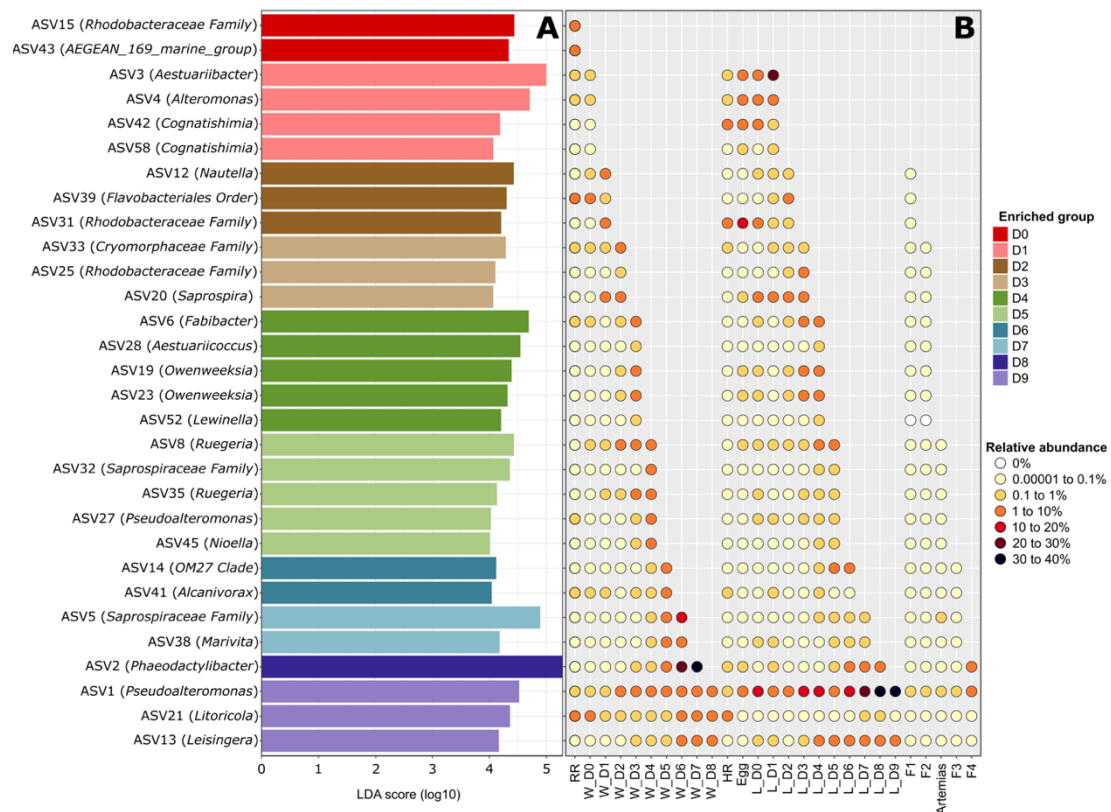


Figure 5 – Differentially abundant ASVs in all the rearing water samples (larval rearing cycles A and B) according to their rearing day and relative abundance of these ASVs in all the samples.

(A) Linear Discriminant Analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) showing ASVs significantly more abundant in the rearing water samples according to their rearing day, from Day 0 (D0) to Day 9 (D9). For each ASV, the lowest phylogenetic level reached for affiliation is specified in brackets. (B) Relative abundance of the ASVs highlighted by the LEfSe in all the samples prior to the rearing day during which they had been identified. For all the samples, the mean relative abundance per sample type is represented. The water and the larvae samples are respectively designated by W and L. The relative abundances of the ASVs in the lagoon seawater, the decantation reservoir and the rearing reservoir are averaged in RR. The samples collected from the hatching reservoir for the larval rearing cycles A and B are averaged in HR.

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

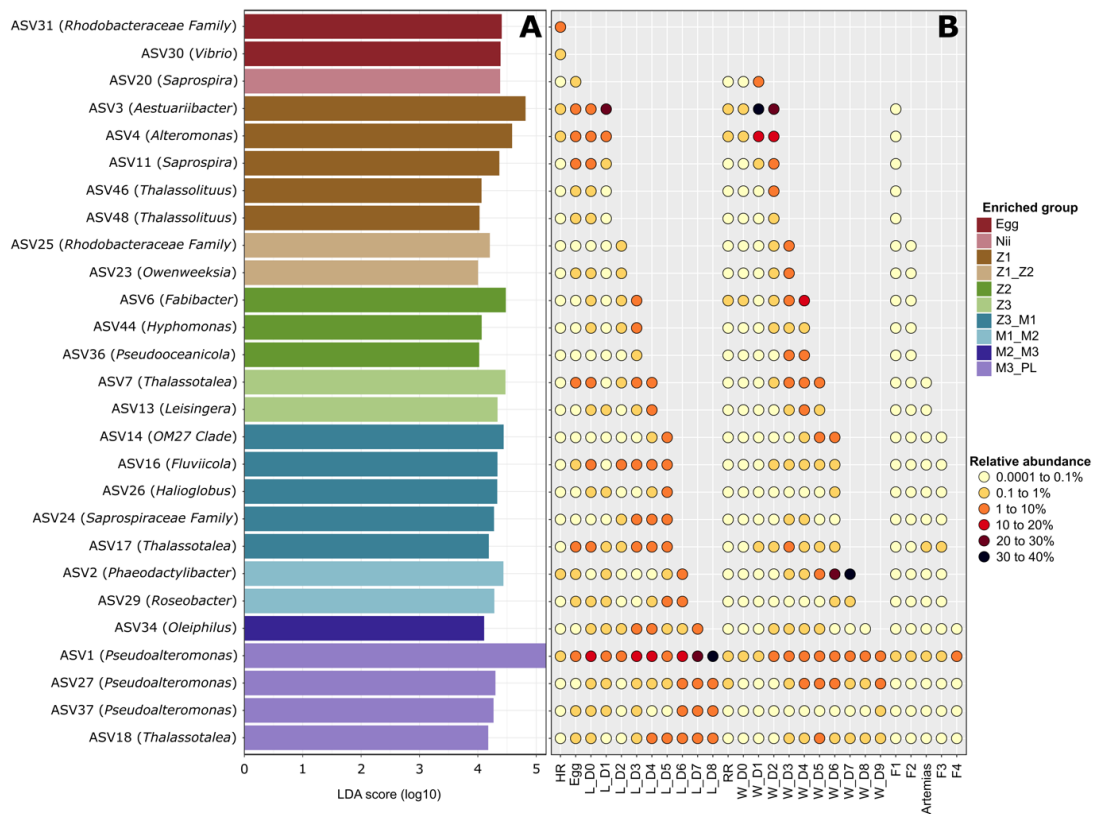


Figure 6 – Differentially abundant ASVs in all the egg and the larvae samples (larval rearing cycles A and B) according to their larval stage and relative abundance of these ASVs in all the samples.

(A) Linear Discriminant Analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) showing ASVs significantly more abundant in the egg and the larvae samples according to their larval stage: egg, nauplii (nii), zoea 1 (Z1), zoea 2 (Z2), zoea 3 (Z3), mysis 1 (M1), mysis 2 (M2), mysis 3 (M3) and post-larvae (PL). For each ASV, the lowest phylogenetic level reached for affiliation is specified in brackets. (B) Relative abundance of the ASVs highlighted by the LEfSe in all the samples prior to the larval stage in which they had been identified. For all the samples, the mean relative abundance per sample type is represented. The larvae and the water samples are respectively designated by L and W. The samples collected from the hatching reservoir for the larval rearing cycles A and B are averaged in HR. The relative abundances of the ASVs in the lagoon seawater, the decantation reservoir and the rearing reservoir are averaged in RR.

Correlations between the microbial biomarkers and the physicochemical parameters

In the water samples, 19 out of the 30 ASVs highlighted by the LEfSe were significantly positively or negatively correlated with at least one environmental factor (Fig. 7A). Temperature was negatively correlated with members of the *Rhodobacteraceae* family and the *AEGEAN 169 marine group*, which were both enriched on D0, as well as with an ASV affiliated to *Litoricola* on D9. All the ASVs enriched in the water samples on D1 and D2 were negatively correlated with ammonium, phosphorus and CDOM concentrations (TAN, SRP and $a\lambda_{325nm}$). On the contrary, they were positively correlated with pH and SR. ASVs which were highlighted by the LEfSe from D7 to D9 showed an opposite profile as they were positively correlated with organic matter concentrations and negatively correlated with pH and SR;

exception made for ASV1 affiliated to *Pseudoalteromonas*. Upon 15 ASVs identified as microbial biomarkers between D3 and D6, only 5 were correlated with physicochemical parameters. Indeed, ASVs affiliated to the *Rhodobacteraceae* family and to the *Alcanivorax* genus were respectively highlighted on D3 and D6 and were both inversely correlated with CDOM concentration ($a_{\lambda_{325\text{nm}}}$) and pH. CDOM concentration was also correlated with a member of the *Cryomorphaceae* family on D3 while pH was correlated with a *Saprospira* on D3. Finally, ASV8 affiliated to *Ruegeria* and enriched on D5 was negatively correlated with ammonium concentration (TAN).

In the larvae samples, 25 ASVs were highlighted by the LEfSe analysis and 18 of them were correlated with the considered physicochemical parameters (Fig. 7B). As for the water samples, 3 ASVs highlighted by the LEfSe of the larvae samples were negatively correlated with the water temperature: an *Aestuariibacter* and an *Alteromonas* at zoea 1 stage as well as a *Thalassotalea* during the transition between zoea and mysis stages. ASVs highlighted at zoea 1 stage were negatively correlated with TAN, SRP and CDOM concentration ($a_{\lambda_{325\text{nm}}}$) but positively correlated with pH and SR. Opposite trends were highlighted for ASVs enriched during the transitioning phase between mysis 1 and 2 as well as between mysis 3 and post-larvae transformation. They showed the same correlation profile as ASVs 13 (*Leisingera*) and 26 (*Halioglobus*) respectively highlighted in the zoea 3 larvae and during the zoea / mysis transitioning phase. The 2 ASVs affiliated to the *Saprospira* genus and enriched at nauplius and zoea 1 stages were only positively correlated with pH. CDOM concentration, pH and SR were also correlated with 3 ASVs highlighted during the zoea stage. One ASV was affiliated to the *Rhodobacteraceae* family while the 2 others belonged to the *Fabibacter* and the *Leisingera* genera.

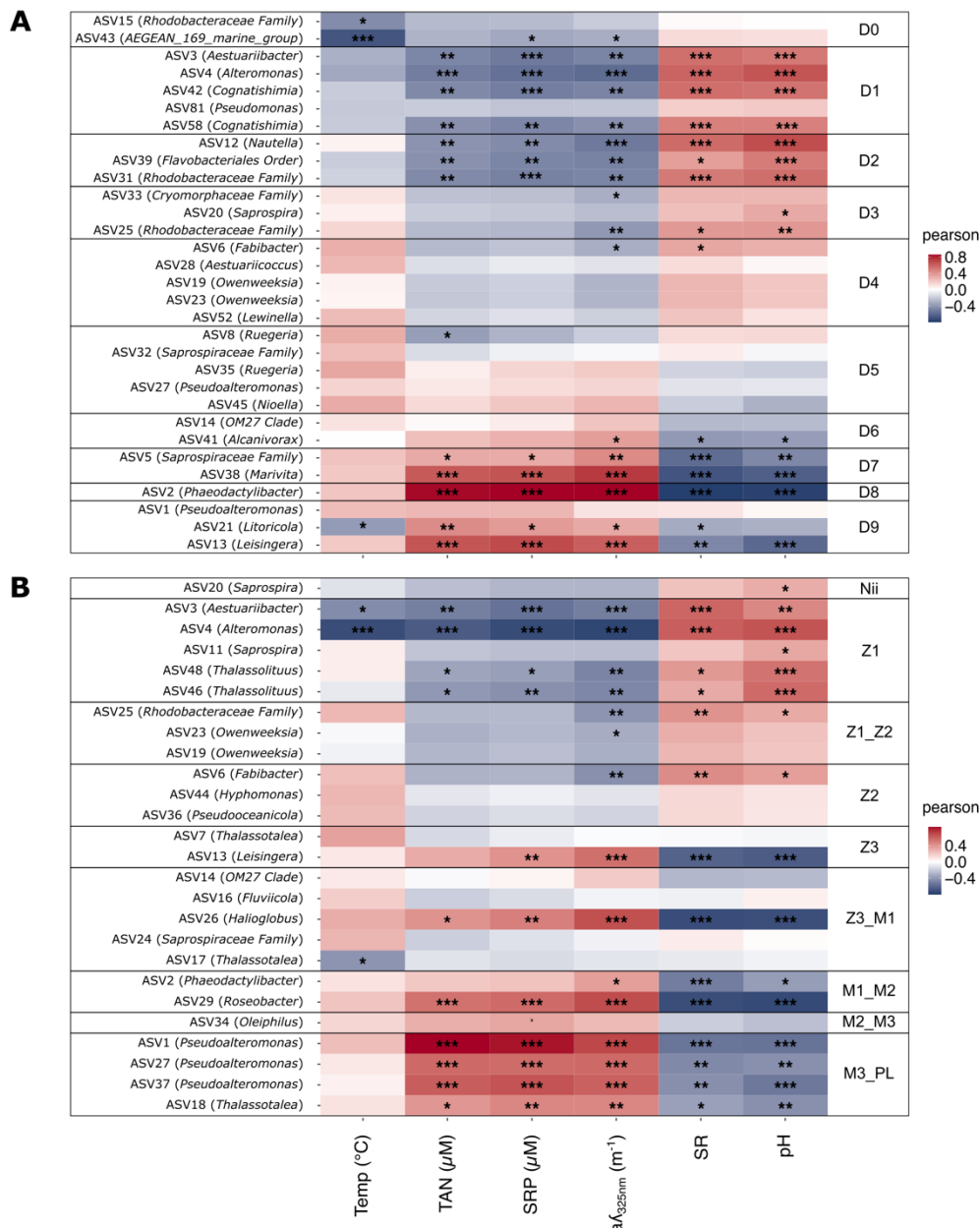


Figure 7 – Pearson correlations between the microbial biomarkers and the physicochemical parameters of the rearing water.

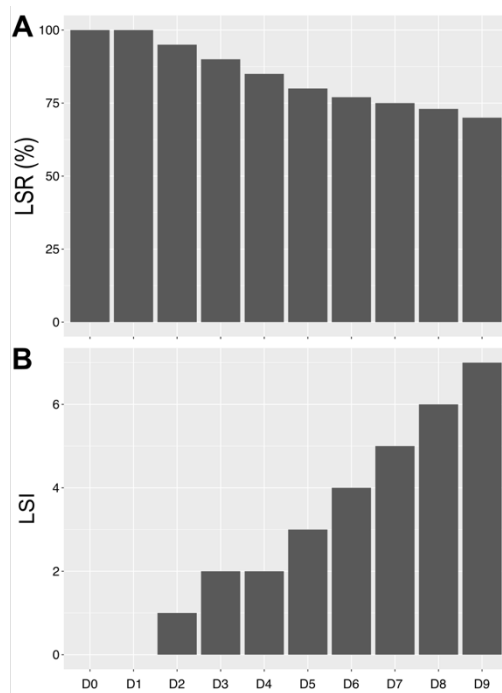
Correlations between the physicochemical parameters of the rearing water: temperature (Temp), total ammonia nitrogen (TAN) concentration, soluble reactive phosphorus (SRP) concentration, colored dissolved organic matter concentration ($a\lambda_{325nm}$), slope ratio (SR) and pH values were considered and the microbial biomarkers highlighted by the LEfSe analyses in (A) the water samples and (B) the larvae samples. Rearing days are represented by the letter D followed by the considered rearing day (from 0 to 9). Larval developmental stages are designated as follows: nauplii (Nii), zoea 1 (Z1), zoea 2 (Z2), zoea 3 (Z3), mysis 1 (M1), mysis 2 (M2), mysis 3 (M3) and post-larvae (PL). Negative correlations are represented in blue while positive correlations are represented in red. Significant results are designated by an asterisk symbol: p-values comprised from 0.01 to 0.05 are represented by *, p-values comprised from 0.001 to 0.009 by ** and p-values below 0.0009 by ***.

Discussion

Temporal evolution of the physicochemical parameters in the rearing water

In order to evaluate the larval health status of the considered rearing cycles, the larval survival rate (LSR) and the larval stage indexes (LSI) were daily calculated (Fig. 2A and 2B) and compared to reference values (Fig. S1). These references were estimated by averaging LSR and LSI values for each rearing day using 10 years of successful rearing data (Pham, comm. pers.). During this experiment, despite varying LSR values due to day-to-day count discrepancies, LSR and LSI values in the rearing tanks mimicked the reference values meaning that all larvae survived and were able to transition from nauplii to post-larvae in 9 days, as expected. Thus, both larval rearing cycles were considered healthy. We then characterized the physicochemical parameters of the water in the rearing tanks throughout these two rearing cycles (Fig. 2C to 2H).

Even though temperature was intentionally increased from D0 to D2 in order to help larval transitioning from nauplius to zoea (Fig. 2C), a variation of 3°C could have influenced the microbial communities associated with the rearing water and the larvae. As a consequence, temperature was the first considered physicochemical parameter. As room temperature was not monitored and as water temperature was only controlled by heating resistances directly placed in the water, water temperature values fluctuated around 30°C. This also explains the temperature variations observed in the control tank. Ammonium (TAN) and phosphorus (SRP) concentrations progressively increased in the rearing water (Fig. 2D and 2E). Even though these nutrients are known to be essential to the development of most organisms, they can be harmful if present in excess. For example, ammonium and phosphorus pollution may disturb growth, metamorphosis and survival of several *Penaeid* shrimp species at post-larvae, juvenile and adult stages [38,39,40,41]. In this study, ammonium, phosphorus and organic matter accumulation suggested a eutrophication of the rearing water throughout the experiment. As no water renewal was performed during the whole rearing cycle, this eutrophication could be explained by the accumulation of uneaten food, excreted feces and larval molts as previously described during the larval rearing of *P. stylirostris* [18]. A shift of CDOM concentration ($a_{\lambda_{325nm}}$), pH and SR values occurred between D4 and D5 as CDOM concentrations drastically increased (Fig. 2F) while pH and SR values decreased (Fig. 2G and 2H) during those rearing days. Overall, the environmental conditions drastically changed between the beginning and the end of the rearing process through a global eutrophication of the water and a major environmental shift occurred between D4 and D5, after antibiotic and *Artemia* sp. addition, when larvae were transitioning from zoea 2 to zoea 3 (Fig. 3). As eutrophication of the rearing environment can be linked to microbial dynamics in the water and in the host [42], we investigated if the microbial communities associated with the water and the larvae samples also exhibited major modifications.



Supplementary figure 1 – Reference values for larval survival rate (LSR) and larval stage index (LSI).

A) Larval survival rate (LSR) and B) Larval stage index (LSI) values expected for each rearing day. Rearing days are represented on the horizontal axis by the letter D followed by the considered rearing day (from 0 to 9).

Temporal evolution of the microbial communities in the rearing water and the larvae

Hierarchical clustering analysis showed that samples clustered according to their rearing day regardless of their rearing cycle (A or B). Therefore, the rearing tanks were considered to be suitable replicates. For all the constructed ordinations (Fig. 4A to 4C), samples collected from D0 to D2 grouped together as for samples collected from D3 to D5 and from D7 to D9. Samples collected on D6 were the only ones which could not be assigned to a unique cluster. Larvae in all the rearing tanks were at nauplius and zoea 1 stages from D0 to D2, at zoea 2 and zoea 3 stages from D3 to D5 and at mysis and post-larvae stages from D7 to D9. On D6, larvae were transitioning from zoea 3 to mysis stage. Thus, as for the physicochemical parameters previously analyzed, it appeared that the microbial composition of the water and the larvae samples changed according to the rearing day and thus, to the developmental stage of the larvae in the rearing tanks. Histograms allowed to highlight the major bacterial orders associated with the water and the larvae samples according to the rearing day and displayed major shifts in the microbial diversity (Fig. 4D and 4E).

All the considered water and larvae samples exhibited large proportions of *Rhodobacterales* and *Alteromonadales* throughout the experiment. *Rhodobacterales* are oligotrophic and metabolically diverse microorganisms colonizing various ecological niches within the marine environment [43,44,45]. As a result, they can represent up to 30% of the total marine bacterial communities in surface seawaters where they are essential to biogeochemical cycling [45]. Like *Rhodobacterales*, *Alteromonadales* are able to produce many different metabolites allowing them to adapt to various ecological niches and are, thus, found in very diverse ecosystems ranging from soil to seawater [46]. *Rhodobacterales* and *Alteromonadales* members have been identified in the rearing water and the post-larvae of

the Pacific white shrimp *P. vannamei* [47,48] as well as in the intestinal microbiota of adult Chinese shrimps *Fenneropenaeus chinensis* [49,50] and in the rearing water of *P. stylirostris* larvae [18]. Recently, studies focusing on the larval microbiota of *P. vannamei* and *P. stylirostris* have also highlighted microorganisms affiliated to these 2 bacterial orders [9,10,51,52,53]. Taken together, our results reinforce the hypothesis that *Rhodobacterales* and *Alteromonadales* members, originating from the rearing environment, partially form the core microbiota of several shrimp species where they play essential roles in the physiology of their hosts during the whole life cycle.

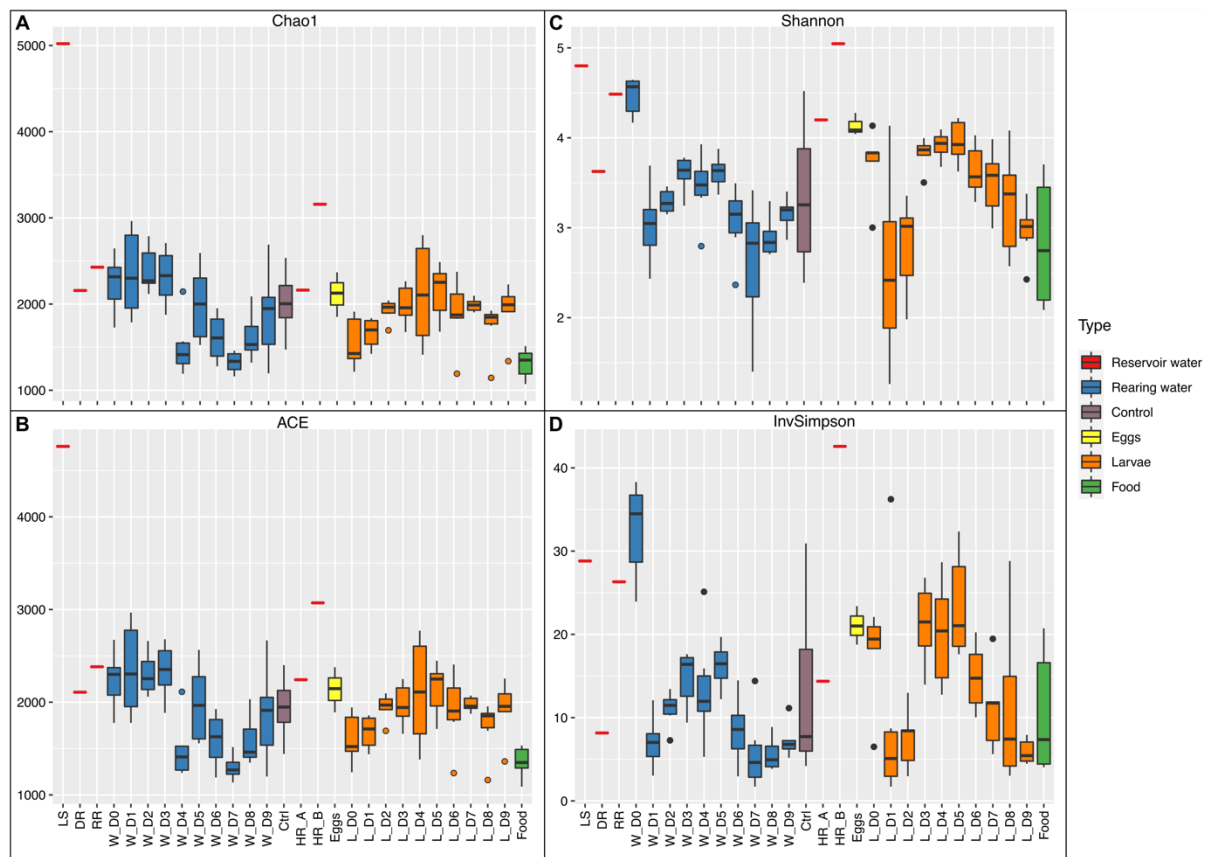
On D0, when the rearing tanks were filled, the water samples were partly composed by *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales*, and *SAR11* members. This was not surprising as they are very common in the marine environments where they play key roles in organic matter transformation and nutrient turnover [54,55,56]. *Rhodospirillales* were also highlighted in the water samples on D0. This bacterial order has previously been isolated in the stomach of healthy adult shrimps, which had been challenged with *Vibrio parahaemolyticus*, a bacteria known to induce the acute hepatopancreatic necrotic disease [57]. Due to their antagonist activity with various *Vibrio* lineages, *Rhodospirillales* were suggested as potential probiotic strains and the authors even suggested that they could have a protective role in shrimps under rearing conditions [57]. Furthermore, *Rhodospirillales* members have previously been identified in the rearing water of *P. stylirostris* larvae at nauplius stage and before larval mass mortalities, which could confirm their protective role during the early larval stages of the rearing process [18]. On the next rearing day (D1), proportions of *Alteromonadales* largely grew in the water samples while the other bacterial orders decreased. This was consistent with the α -diversity indexes which showed that evenness of the microbial communities in the water decreased between D0 and D1 while richness remained constant (Fig. S2). Indeed, during that rearing period, Shannon and Inverse Simpson indices dropped while Chao1 and ACE indices remained stable. *Alteromonadales* rapidly decreased in the rearing water from D2 to D5 while *Chitinophagales* abundances increased from D4 to D9. *Chitinophagales* belong to the *Bacteroidetes* phyla and are known to produce various exogeneous enzymes allowing them to degrade complex nutrient sources such as carbon polymers [58]. As suggested by their name, they are involved in the biodegradation of chitin, a polysaccharide composing the exoskeleton of crustaceans and therefore of shrimps [59]. To our knowledge, studies focusing on the microbiota associated with various shrimp species and their rearing environment have highlighted large abundances of *Bacteroidetes* at all developmental stages but never such high proportions of *Chitinophagales* [47,60]. As our study is the first to consider the active microbiota associated with healthy larvae of *P. stylirostris* and their surrounding environment, these contrasting *Chitinophagales* abundances could be explained by differences in studied shrimp species (different ontogenesis for example) and rearing environments (different antibiotics used or different water treatment and renewal protocols for example). Furthermore, dissimilarities in the choice of DNA (total microbial communities) or RNA (active microbial communities) extraction as well as extraction technique, sequencing method and downstream analyses could also explain the observed differences [61]. In any case, a shift between *Alteromonadales* and *Chitinophagales* communities occurred between D3 and D5 during the zoea stage in the water samples, at the same rearing time as the previously observed physicochemical shifts. Beyond larval transitioning, antibiotic as well as *Artemia* sp. larvae were added during this rearing period and could explain the observed modifications of the microbiota associated with the rearing water. However, antibiotic addition was shown to majorly impact the active rare biosphere of the surrounding water of

P. stylirostris at the beginning of the larval rearing [18] potentially rolling out the influence of oxytetracycline (OTC) addition on the observed microbial changes in this study. Furthermore, microbial composition of *Artemia* sp. larvae was dominated by *Vibrionales* members and by an unclassified *Bacteria* (ASV86) while *Chitinophagales* only accounted for 0.2% of the total relative abundance (Fig. S3). Thus, microbial profiles were very different between this feeding source and the rearing water. Even though, these observations tend to also rule out the influence of *Artemia* sp. larvae addition on the microbiota of the rearing water, it is important to notice that food samples were collected before addition to the tanks. As a consequence, active microbial communities associated with food sources could have increased when in contact with the rearing water or some dormant microorganisms may have been activated after addition to the tanks. Finally, larval transitioning may have led to the observed increase of *Chitinophagales*. Indeed, larval molting occur during all transitioning phases and could have resulted in a progressive increase of chitin in the rearing water [53,62]. Chitin is a high molecular weight linear assembly of N-acetylglucosamine residues [63]. Thus, chitin accumulation could explain the organic matter concentration increase showed by the high CDOM concentration ($a_{\lambda_{325nm}}$) values observed on D5 (Fig. 2F). Furthermore, as high SR values involve low molecular weight of the dissolved organic matter, the low SR values observed during our experiment (Fig. 2G) could also be explained by the increase of high molecular weight chitin [25,26]. This hypothesis is also supported by the increase of *Cytophagales* occurring at the same time. Indeed, *Cytophagales* also belong to the *Bacteroidetes* phyla and are known to degrade biomacromolecules explaining why they are very abundant in habitats rich in organic material [64]. Thus, an increase of chitin due to larval molting could also explain the increase of *Cytophagales* proportions. When *Chitinophagales* and *Cytophagales* increased in the rearing water samples, large proportions of *Bdellovibrionales* were also highlighted. Microorganisms affiliated to this bacterial order are *Bdellovibrio* and like organisms (BALOs) with an obligatory predatory lifestyle against Gram-negative bacteria [65,66]. They are considered as living antibiotics and water clean-up as well as biocontrol agents and are currently studied for their potential use as probiotics in aquatic, poultry and farm animals. For example, in shrimp farming, BALOs have been suggested as potential biocontrol agents to prevent *Vibrio* infections [66]. During shrimp larval rearing, *Bdellovibrionales* may regulate some bacterial lineages in order to preserve microbial balance.

In the egg samples, prior to the beginning of the larval rearing, members of the *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales* and *Vibrionales* orders were highlighted. This was expected as members of these bacterial orders have previously been identified in the eggs, the nauplii and the breeders of *P. stylirostris* where they formed the core microbiota of all the considered samples [10]. Even though their abundance varied throughout the experiment, these bacterial orders were maintained in the larval microbiota during the whole rearing process. As for *Alteromonadales* and *Rhodobacterales*, our results suggest that *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales* and *Vibrionales* members could form the core microbiota of *P. stylirostris* larvae. Furthermore, during the first 2 days of rearing, when larvae were at nauplius stage, they showed heterogeneous microbial compositions. Symbiotic microorganisms acquired from the breeders have been suggested to modulate the microbiota of several larval marine species and such a vertical transmission has been hypothesized to influence the establishment of the microbiota of *P. stylirostris* larvae [9,10,67]. Thus, the microbial variations observed between the larval samples at nauplius stage (D0 and D1) could be explained by this influence. However, at zoea stage (from D2 to D5), microbial compositions became more homogeneous. This was also shown by Wang et al. (2020) [53]

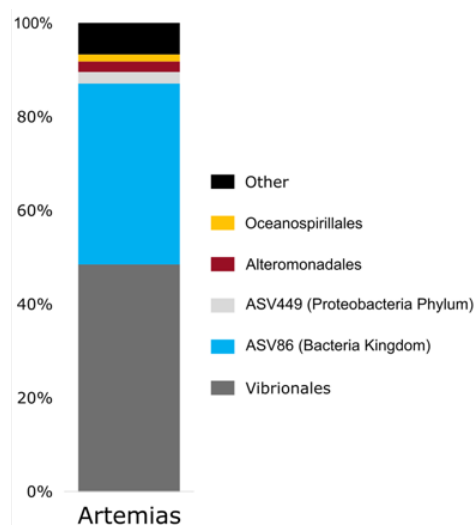
who found that microbial compositions of *P. vannamei* larvae at nauplius stage were more heterogeneous than at zoea and mysis stage. The authors explained that, after the mouth opening occurring at zoea 1 stage, the larvae could have selected particular microbial communities with specific functions in order to help digestion through their immature digestive tract. Furthermore, diet and environmental microbiota have been shown to influence the gut microbiota associated with fish [4,6,8]. Therefore, the observed homogenization of the larval microbial communities at zoea stage could be explained by a growing influence of the rearing environment on the larval microbiota. As for the water samples, high proportions of *Cytophagales* and *Bdellovibrionales* were associated with the larvae at zoea stage (from D2 to D5). Abundances of *Caulobacterales* also increased during that rearing period. Members of this bacterial order have previously been identified as enriched in healthy *P. vannamei* and *P. stylirostris* larvae [10,51]. After the zoea stage, during the mysis stage (from D6 to D8), proportions of *Cellvibrionales* largely increased in the larvae samples. *Cellvibrionales* members have previously been highlighted in the gut microbiota of healthy *P. vannamei* adults which had been fed with probiotic *Bacillus* strains and challenged with *Vibrio* infection [68]. Therefore, *Caulobacterales* and *Cellvibrionales* may also be important for maintaining larval health during shrimp rearing. Interestingly, *Cellvibrionales* abundances greatly increased in the control tank suggesting that they could proliferate under non-rearing conditions and that observed variations in the rearing tanks were due to rearing conditions and not to a natural evolution of the seawater. Thus, microbial communities in the water and the larvae samples changed according to the rearing day and the larval stage and several potential probiotic sources were highlighted throughout the experiment. In order to further investigate these microbial communities, we conducted LEfSe to highlight specific microbial biomarkers.

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé



Supplementary figure 2 - α -diversity indices in all the samples.

(A) Chao1, (B) ACE, (C) Shannon and (D) Inverse Simpson (InvSimpson) indexes in all the samples. LS stands for lagoon seawater, DR for decantation reservoir, RR for rearing reservoir, Ctrl for control and HR for hatching reservoir. All the water samples are designated by a W while all the larvae samples are designated by an L. The rearing days are represented by the letter D followed by the considered rearing day (from 0 to 9).



Supplementary figure 3 – Microbial composition of the Artemia larvae.

Top 5 bacterial orders (when possible) with a relative abundance higher than 1% associated with the Artemia sp. larvae.

Identifying microbial biomarkers in the water and the larvae samples

The predominance of *Rhodobacterales* in the water samples was confirmed by the LEfSe as 10 ASVs affiliated to this bacterial order were identified (Fig. 5A). Indeed, on D1 and D4, *Cognatishimia* and *Aestuariicoccus* were enriched in the rearing water (Fig. 5A). They are both aerobic marine bacteria therefore it was not surprising to identify them in the rearing environment of our experiment [69,70]. In the same way, *Marivita*, which were evidenced on D7 (Fig. 5A), were previously highlighted as associated with adult and larvae of *P. vannamei* as well as with their rearing environment [27,52,71]. More interestingly, *Nautella*, which were highlighted on D2 in the water samples (Fig. 5A), have been found associated with diseased *P. vannamei* larvae and were suggested as potential biomarkers of shrimp health status [51,72]. However, they have also been identified in healthy shrimp larvae at zoea and mysis stages as well as in the intestinal microbiota of healthy adult organisms [52,57]. In this study, we have also highlighted the *Nautella* genus in the rearing water of healthy shrimp larvae (Fig. 5A). Thus, under the considered rearing conditions, presence of these microorganisms in shrimp rearing may not necessarily be a sign of upcoming mortalities. However, they may be opportunistic pathogens if the health status of the shrimp deteriorates. In the same way, *Nioella* which were enriched on D5 in the rearing water during this experiment (Fig. 5A), have been identified in *P. vannamei* affected by the white feces syndrome and were suggested to be part of a polymicrobial pathogens infection [73]. As for *Nautella*, *Nioella* may be opportunistic pathogens which could lead to a microbial dysbiosis under specific conditions [12]. On the contrary, *Ruegeria* and *Leisingera*, which were respectively predominant in the water samples on D5 and D9 (Fig. 5A) as well as in the larvae samples on D5 (*Leisingera*) (Fig. 6A), have been reported as potential probiotics for shrimp and fish larval rearing [67,68] as they both exhibit antagonist activity against members of the *Vibrio* genus [74,75]. In this study, *Ruegeria* and *Leisingera* were identified in healthy *P. stylirostris* larvae and in their rearing environment at different rearing periods suggesting that they could play a defensive role in the surrounding water and in the larvae by limiting proliferation of opportunistic pathogens or r-strategist microorganisms at key moments during the rearing process. Other bacterial strains considered to be beneficial microorganisms were highlighted during the rearing process in the water samples. Indeed, members of the *AEGEAN 169 marine group*, belonging to the previously mentioned *Rhodospirillales* order, were enriched on D0 (Fig. 5A). This marine group has already been proposed to form the core microbiota of the eggs and the nauplii of *P. stylirostris* [9]. We have previously suggested that *Rhodospirillales* could be a potential source of probiotic strains in the rearing water and further on suggest that members of the *AEGEAN 169 marine group* could be beneficial to shrimp larval rearing. However, this group is very diverse and further metagenomic studies will be necessary to identify precise microbial genera [76,77]. *Flavobacteriales* and *Oceanospirillales* were also abundant on D0 in the water samples (Fig. 4E) and were maintained until the end of the experiment as *Owenweeksia*, *Alcanivorax* and *Litoricola* were highlighted by the LEfSe on D4, D6 and D9 (Fig. 5A). These genera have previously been identified during shrimp and salmon rearing so it was not surprising to find them in the rearing water of shrimp larvae [71,78]. On D1, proportions of *Alteromonadales* were greatly increased in the water samples as shown by the LEfSe which highlighted *Aestrauriibacter* and *Alteromonas* as predominant during that rearing time (Fig. 5A). *Aestuariibacter* and *Alteromonas* have been suggested to be part of the core microbiota associated with the eggs, the nauplii and the rearing water of *P. stylirostris* and this seems to be confirmed by this study [9]. Other *Alteromonadales* members were highlighted on D5 and D9 as *Pseudoalteromonas* were identified by the LEfSe on those rearing days (Fig. 5A).

Interestingly, *Pseudoalteromonas* are able to produce antibacterial compounds and have been identified as potential probiotic lineages for larval rearing of *P. stylirostris*. The NC201 strain is currently tested at the Saint Vincent experimental hatchery (Boulouparis, New Caledonia) [20, 79, 80]. Interestingly, *Pseudoalteromonas* members have also been identified in the surrounding environment of *P. stylirostris* larvae subjected to high mortalities and were hypothesized to restrain microbial dysbiosis of the rearing water in order to prevent the development of opportunistic pathogens [18]. Finding this genus in the rearing water of healthy larvae of the same species strengthens the potential probiotic role of *Pseudoalteromonas* members. During zoea stage, *Alteromonadales* decreased while *Chitinophagales* increased in the water samples (Fig. 4E). This was also highlighted by the LEfSe as *Saprospira*, *Lewinella* and *Phaeodactylibacter* were enriched from D3 to D8 (Fig. 5A). *Saprospira* were found in the eggs of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* [81] while *Lewinella* have been identified in the water and the intestines of *P. vannamei* adults [47]. *Phaeodactylibacter* were highlighted during the larval rearing of *P. vannamei* where they originated from algal feed [71]. During our experiment, no algae were fed to the larvae. However, *Phaeodactylibacter* were abundant in the fourth type of microparticles (F4) given on D7 (Fig. 5B). As water samples were daily collected before the first feeding of the day, this could explain why *Phaeodactylibacter* were enriched in the rearing water on the following day (D8). Nevertheless, *Saprospira*, *Lewinella* and *Phaeodactylibacter* belong to the *Chitinophagales* order and are, as previously discussed, capable of degrading the chitin composing the cuticle of the larvae. These bacterial strains could limit chitin accumulation in the rearing water occurring during the larval transformation. The LEfSe also highlighted *Fabibacter*, affiliated to the *Cytophagales* order, in the rearing water on D4, during the zoea stage (Fig. 5A). *Fabibacter* are known to degrade complex organic molecules and have also been found associated with the cuticle of crustaceans [64] which could confirm our previous hypothesis that abundance of *Cytophagales* members increased due to larval molting and chitin release in the rearing water during zoea stage. As for *Saprospira*, *Lewinella* and *Phaeodactylibacter*, *Fabibacter* may also restrict chitin concentrations in the larval environment at zoea stage. At the same time, *OM27 clade* members, which are *Bdellovibrio* and like organisms (BALOs), were enriched in the water samples on D5 (Fig. 5A). We have previously suggested that *Bdellovibrionales* could be a potential source of beneficial microbial strains for shrimp larval rearing and further on suggest that members of the *OM27 clade* could be of interest. However, as for the *AEGEAN 169 marine group*, the *OM27 clade* is very diverse and further analysis will be necessary to identify more accurate taxa [82].

In the egg samples, the LEfSe highlighted an ASV affiliated to the *Rhodobacteraceae* family and to the *Vibrio* genus (Fig. 6A) which is consistent with what has been previously highlighted [9,10]. The *Rhodobacteraceae* family was suggested as potentially essential to shrimp larval rearing and as a source of potential probiotic taxa [53] which strengthens the theory that they form the core microbiota of healthy shrimp larvae. Throughout the whole rearing process, the abundance of *Rhodobacterales* stayed relatively high in the larvae samples which also displayed large proportions of *Alteromonadales*. This was illustrated by the LEfSe focusing on the enriched microbial strains in the different larval stages (Fig. 6A). Indeed, ASVs affiliated to the *Rhodobacterales* order were highlighted at Z2, Z3 and M1-M2 stages (D4, D5 and D7): *Pseudooceanolicola*, *Leisingera* and *Roseobacter*. To our knowledge, this study is the first to identify *Pseudooceanolicola* in larvae of a marine organism and further studies will be necessary to understand their role in *P. stylirostris* larvae. On the other hand, as previously mentioned, *Leisingera* have been considered as potential probiotics because of

their ability to produce indigoidine, a compound demonstrating antimicrobial activity against *Vibrio* [75]. In the same way, *Roseobacter* have also been hypothesized to be probiotic microorganisms in marine animals as they produce a diverse range of secondary metabolites [74,83]. The larvae LEfSe also highlighted various genera affiliated to the *Alteromonadales* in the larvae samples. Indeed, *Aestuariibacter*, *Alteromonas* and *Thalassotalea* were highlighted at Z1, Z3, M1 and M3-PL stages (D2, D5, D6 and D9) (Fig. 6A). They have been previously identified as members of the core microbiota of the eggs and the nauplii of *P. stylirsotris* [9]. In the same way, *Pseudoalteromonas*, which were enriched in the larvae samples during the mysis / post-larvae transitioning phase (D9) (Fig. 6A), were found in the rearing water, the eggs, the nauplii and the breeders of *P. stylirsotris* [10]. Thus, our experiment strengthens the hypothesis that *Aestuariibacter*, *Alteromonas*, *Thalassotalea* and *Pseudoalteromonas* belong to the core microbiota of shrimp larvae. From D3 to D6, *Cytophagales*, *Caulobacterales* and *Bdellovibrionales* peaked in the larval microbiota (Fig. 4F). This was supported by the LEfSe which highlighted *Fabibacter* and *Hyphomonas* on D4 (Z2 stage) as well as *OM27 clade* on D6 (Z3-M1 stages) (Fig. 6A). We have already discussed the implication of *Fabibacter* and *OM27 clade* in shrimp larval rearing water. The *Hyphomonadaceae* family has been identified in shrimp larvae and more specifically in the nauplii of the Pacific blue shrimp where they were suggested to originate from the rare or inactive microbiota of the eggs and the rearing water [10]. As low abundances of *Hyphomonas* were also identified in the eggs and in the reservoir of the hatching tanks (Fig. 6B), our results reinforce this hypothesis. Interestingly all microbial taxa highlighted by the LEfSe in the water and the larvae samples were found in the reservoir waters of the hatching and the rearing tanks as well as in the eggs, as shown by the constructed scatterplots (Fig. 5B and 6B). The abundance of all taxa increased throughout the rearing days and the larval stages until reaching their maximum. This indicated that microorganisms present since the beginning of the experiment found more and more favorable conditions to their development throughout the rearing process. Furthermore, as microbial profiles were very different between the beginning and the end of the experiment (Fig. 4) in the rearing water and the larvae samples, it seemed that the rearing day and the larval stage influenced the microbiota. Thus, we highlighted microbial biomarkers of each rearing day in the water samples and of each larval developmental stage in the larvae samples (Fig. 5A and 6A). Interestingly, several bacterial lineages identified as potential probiotics were highlighted during the experiment (Fig. 5A and 6A) and their abundance varied greatly throughout the larval rearing (Fig. 5B and 6B). However, all the identified potential probiotics were found in the reservoir waters of the hatching and the rearing tanks suggesting that all these favorable microorganisms were present since the beginning of the rearing and originated from the natural lagoon seawater (Fig. 5B and 6B). As a consequence, we suggest that the classic use of probiotics in New-Caledonian hatcheries [20] (i.e., a unique bacterial strain regularly inoculated throughout the rearing process) should be adapted by using a mix of various probiotic stains or by managing bacterial communities naturally present in the rearing environment. This could also be applied to other aquaculture facilities using only one bacterial strain as a probiotic source [84,85] and could lead to a more sustainable world aquaculture. Indeed, our results suggest that several potential beneficial microbial strains with different functions are involved throughout the rearing at key moments of the larval development. Further analyses will be necessary to confirm the beneficial role of the highlighted microbial biomarkers, to better understand the cellular and molecular mechanisms involved and to establish better microbial management during shrimp larval rearing. In this context, we analyzed the correlations existing between the highlighted

microbial biomarkers and the considered physicochemical parameters to understand how the microbial communities in the water and the larvae samples could be influenced.

Correlations between environmental parameters and microbial communities

More than half of the ASVs highlighted by the LEfSe of the rearing water samples were correlated with at least one parameter related to organic matter concentration (Fig. 7A). This showed that the progressive eutrophication of the surrounding environment could influence the microbiota of the rearing water. This was expected as eutrophication was proved to alter bacterioplankton assemblies in the culture ponds of adult *P. vannamei* [86] and in the rearing water of *P. vannamei* larvae [71]. More generally, with growing impacts of human activities, such as agricultural activities and pollutant discharge, on fresh and seawater ecosystems, several studies have highlighted the influence of nitrogen and phosphorus enrichments on microbial communities [87,88]. Eutrophication has also been hypothesized to increase bacterial growth and biomass, leading to an enhanced consumption of dissolved oxygen and, furthermore, to an enlarged CO₂ concentration in the water causing the pH to decrease [89]. During our experiment, we indeed observed a decline of pH values. However, as intensive bubbling of the rearing water was implemented to maintain oxygen levels, the observed pH decrease was limited. Nevertheless, as pH variations and eutrophication are linked, it was not surprising that the ASVs positively correlated with organic matter concentrations were also negatively correlated with pH and *vice versa*. As for organic matter concentrations and pH, temperature is also known to strongly influence microbial compositions in all ecosystems [90]. Interestingly, a study focusing on the microbiota associated with the intestines of adult *P. vannamei* as well as with their rearing water and sediments showed that pH, temperature and total nitrogen most influenced the microbial communities of all the considered samples [91]. The authors showed that pH was the environmental factor most influencing the microorganisms in the water while temperature had the biggest impacts on the microbial communities in the shrimps and in the sediment, suggesting that environmental factors not only impacted the microorganisms associated to the water but also the microbiota of the animals. This was also highlighted by in our findings as several ASVs enriched in the larvae samples were correlated with the considered physicochemical parameters (Fig. 7B). More specifically, larvae associated ASVs were strongly correlated with eutrophication parameters. In natural freshwater ecosystems, eutrophication of the water due to anthropogenic activities was proved to affect the microbial diversity of the skin microbiota of the wild gudgeon *Gobio occitanie* therefore influencing the epibiota of the animals [92]. Furthermore, the gastrointestinal microbiota of several fish species is known to be influenced by several environmental factors [4]. These results suggest that the epibiota and the endobiota of *P. stylirostris* larvae could be influenced by the changing environmental conditions throughout the rearing process.

Surprisingly, during zoea stage, less correlations were highlighted between the physicochemical parameters and the microbial communities highlighted in the water and the larvae samples suggesting that other unconsidered parameters might have come into play. In *P. vannamei* larvae, differential microbial lineage distributions were evidenced between nauplii and zoea stages as larval microbial colonization shifted from dispersal to host selection processes after the mouth opening [53]. More generally, a meta-analysis conducted on several freshwater and marine shrimp species showed that environmental factors influenced the microbiota of the animals but that the developmental stage was also an important factor shaping these microbial communities [60]. Furthermore, many factors are involved when

considering the evolution of host microbiota. Indeed, many biotic and abiotic factors, such as rearing conditions, diet, vertical transmission and antibiotic addition, are known to influence symbiotic microbial communities [4,60]. As a consequence, it is currently recognized that microbial community assemblies in aquaculture systems result from deterministic and stochastic processes [93,94]. Indeed, many deterministic processes, also called non-random and niche-based mechanisms, such as species traits, interspecies interactions (competition, predation, mutualisms...) and environmental conditions are known to influence microorganisms in the environment [95]. However, many studies focusing on the microbiota of marine larvae and their environment have found that other mechanisms could be involved and that deterministic processes were not sufficient to explain the observed microbial patterns [71,96,97]. Therefore, stochastic processes have been suggested to also be involved in the assembly of microbial communities. Assuming that all species are ecologically functionally equivalent, these ecological mechanisms, ranging from probabilistic dispersal, random speciation or extinction to ecological drift, are considered to generate microbial diversity patterns identical to those randomly generated [95]. It is important to note that some environmental factors may not have been considered during our experiment explaining why few correlations were evidenced between the microbial communities and the physicochemical parameters during the zoea stage in the water and the larvae samples. However, it is undeniable that stochastic processes may also be involved. In zebrafish, deterministic processes influence the establishment of the microbiota while stochastic processes further shape the commensal gut microorganisms during the development [98]. Thus, the same alternation between stochastic and deterministic processes may also explain the microbial assembly of the Pacific blue shrimp larvae and their rearing water.

Conclusion

In conclusion, we were able to characterize the microbiota associated with healthy *P. stylirostris* larvae and their rearing environment. We described the temporal evolutions of the physicochemical parameters of the rearing water as well as the microbial communities associated with the larvae and their surrounding environment (Fig. 8). We show a global eutrophication of the surrounding rearing water implying drastic environmental changes between the beginning and the end of the rearing process with important shifts occurring during the zoea stage. Microbial communities associated with the water and the larvae also strongly changed throughout the experiment according to the rearing day and the larval developmental stage. However, our results confirm that members of the *Alteromonadales*, *Rhodobacterales*, *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales* and *Vibrionales* bacterial orders could belong to the core microbiota of shrimp larvae. As these microbial lineages were also found in the rearing water throughout the experiment, we hypothesize that these essential microorganisms may be acquired by the larvae from the rearing environment. Furthermore, several microbial variations were also observed and we identified, in the water and the larvae samples, several potential probiotic microbial taxa affiliated to the *AEGEAN 169 marine group* and the *OM27 clade* as well as to *Ruegeria*, *Leisingera*, *Pseudoalteromonas* and *Roseobacter*. As the abundance of these microorganisms varied throughout the experiment, we suggest that several beneficial microbial strains could be involved during shrimp larval rearing, each playing a key role at a very specific time leading to rethink probiotic use in aquaculture. Finally, we evidenced several correlations between the most abundant ASVs and the physicochemical parameters of the rearing water which could confirm that deterministic

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

processes are involved in the assembly of microbial communities during the larval rearing of *P. stylirostris*. However, as few correlations were evidenced during the zoea stage, stochastic mechanisms may also come into play. Overall, important microbial modifications occurred in the water and in the larvae during this larval stage suggesting that the zoea phase is crucial during shrimp larval development.

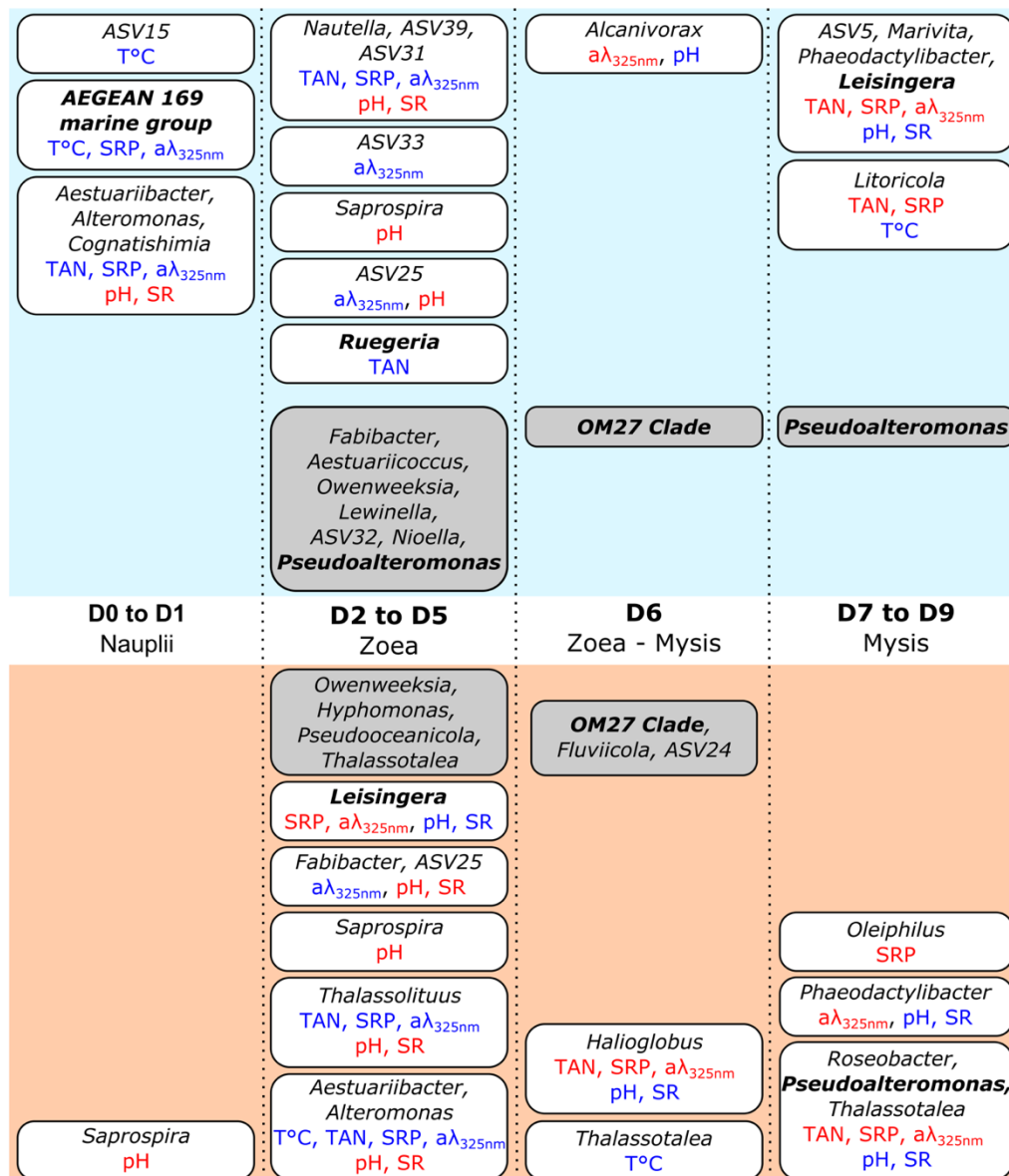


Figure 8 – Enriched microbial lineages and their correlation with environmental factors. Enriched microbial lineages (up to the genus when possible) evidenced by the LEfSe in the rearing water samples (in the upper blue frame) and in the larvae samples (in the upper orange frame). Environmental factors significantly correlated with these microbial lineages are noted in blue (negative correlations) or in red (positive correlations). Temperature (T°C), Total Ammonium Nitrogen (TAN), Soluble Reactive Phosphorus (SRP), Colored Dissolved Organic Matter (CDOM, aλ_{325nm}), pH and Slope Ratios (SR) were considered. Microbial lineages noted in grey boxes were not correlated with the considered environmental factors. Taxa in bold represent potential probiotic strains.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

The datasets generated and analyzed during the current study are available in the NCBI SRA repository (BioProject PRJNA736535, SPR21099695 to SPR21099837).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by the RESSAC project (LEAD-NC, Ifremer New-Caledonia) within the framework agreement with the New Caledonian Provinces and Government and by the Pacific Doctoral School of the University of New-Caledonia.

Acknowledgements

The authors would like to thank Florence Antypas and Dominique Ansquer for their help with material preparation and for their laboratory support during chemical and biological experiments. We also thank Jean-Sébastien Lam and Jean-René Mailliez for their help with zootechnical material preparation. We further on express our gratitude to Séverine Duval for her support and for coordinating this experiment. Finally, we greatly thank all the teams working in the new-caledonian private hatcheries for welcoming us and helping us during our experiments.

References

1. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat Rev Urol*. 2015; doi:10.1038/nrurol.2014.361
2. Ikeda-Ohtsubo W, Brugman S, Warden CH, Rebel JMJ, Folkerts G, Pieterse CMJ. How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. *Front Nutr*. 2018; doi:10.3389/fnut.2018.00090
3. Dhanjal DS, Dhole S, Singh R, Chopra C. Microorganisms-diversity analysis and approaches. *Plant Arch*. 2021; doi:21:576-582
4. Nayak SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac Res*. 2010; doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x
5. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; doi:10.1038/nature11234
6. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012; doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x
7. Moloney RD, Desbonnet L, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome: Stress, health and disease. *Mamm Genome*. 2014; doi:10.1007/s00335-013-9488-5
8. Sun F, Xu Z. Significant Differences in Intestinal Microbial Communities in Aquatic Animals from an Aquaculture Area. *J Mar Sci Eng*. 2021; doi:10.3390/jmse9020104
9. Giraud C, Callac N, Beauvais M, Mailliez J, Ansquer D, Selmaoui-Folcher N, et al. Potential lineage transmission within the active microbiota of the eggs and the nauplii of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* : possible influence of the rearing water and more. *PeerJ*. 2021; doi:10.7717/peerj/12241
10. Giraud C, Callac N, Boulo V, Lam J-S, Pham D, Selmaoui-Folcher N, et al. The Active Microbiota of the Eggs and the Nauplii of the Pacific Blue Shrimp *Litopenaeus stylirostris* Partially Shaped by a Potential Vertical Transmission. *Front Microbiol*. 2022; doi:10.3389/fmicb.2022.886752
11. Wippler J, Kleiner M, Lott C, Gruhl A, Abraham PE, Giannone RJ, Young JC, Hettich RL, Dubilier N. Transcriptomic and proteomic insights into innate immunity and adaptations to a symbiotic lifestyle in the gutless marine worm *Olavius algarvensis*. *BMC Genomics*. 2016; doi:10.1186/s12864-016-3293-y
12. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol*.

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

- 2014; doi: 10.1111/cmi.12308
13. Egan S, Gardiner M. Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems. *Front Microbiol.* 2016; doi: 10.3389/fmicb.2016.00991
 14. Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Olsen Y. K-selection as microbial community management strategy: A method for improved viability of larvae in aquaculture. *Front Microbiol.* 2018; doi:10.3389/fmicb.2018.02730
 15. Infante-Villamil S, Huerlimann R, Jerry DR. Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture. *Reviews in Aquaculture.* 2021; doi:10.1111/raq.12513
 16. Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Gallardo-Becerra L, Mendoza-Vargas A, Sánchez F, Vichido R, et al. Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Sci Rep.* 2017; doi:10.1038/s41598-017-11805-w
 17. Xiong J, Wang K, Wu J, Qiuqian L, Yang K, Qian Y, et al. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; doi: 10.1007/s00253-015-6632-z
 18. Callac N, Boulo V, Giraud C, Beauvais M, Ansquer D, Ballan V, Mailliez JR, Wabete N, Pham D. 2022. Microbiota of the rearing water of *Penaeus stylirostris* larvae influenced by lagoon seawater and specific key lineages of larval stage and survival. *Spectrum Microbiology.* doi: 10.1128/spectrum.04241-22
 19. <https://agence-rurale.nc/filieres/peche-et-aquaculture/crevettes/>. 2021.
 20. Pham D, Ansquer D, Chevalier A, Dauga C, Peyramale A, Wabete N, et al. Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. *Aquaculture.* 2014; doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.031
 21. Pham D, Charmantier G, Wabete N, Boulo V, Broutoi F, Mailliez J-R, et al. Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture.* 2012; doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.026
 22. Maddox MB, Manzi JJ. The Effects Of Algal Supplements On Static System Culture Of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) Larvae1,2. *Proc Annu Meet - World Maric Soc.* 1976; doi:10.1111/j.1749-7345.1976.tb00096.x
 23. Holmes RM, Aminot A, Kérouel R, Hooker BA, Peterson BJ. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Can J Fish Aquat Sci.* 1999; doi: 10.1139/f99-128
 24. Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta.* 1962; doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5
 25. Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K. Erratum: Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr.* 2009; doi:10.4319/lo.2009.54.3.1023
 26. Sadeghi-Nassaj SM, Catalá TS, Álvarez PA, Reche I. Sea cucumbers reduce chromophoric dissolved organic matter in aquaculture tanks. *PeerJ.* 2018; doi:10.7717/peerj.4344
 27. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; doi:10.1073/pnas.1000080107
 28. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016; doi:10.1038/nmeth.3869
 29. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. 2020. <http://www.rstudio.com/>
 30. McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One.* 2013; doi: 10.1371/journal.pone.0061217
 31. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* Springer-Verlag New York. 2016; <https://ggplot2.tidyverse.org>
 32. Thioulouse J, Dray S, Dufour A-B, Siberchicot A, Jombart T, Pavoine S. *Multivariate Analysis of Ecological Data with ade4.* New York, NY: Springer New York; 2018. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8850-1>
 33. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, et al. CRAN - Package vegan. 2020; <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>
 34. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011; doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60
 35. Cao Y. microbiomeMarker: microbiome biomarker analysis toolkit. 2020. R package version 0.0, 1.

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

- <https://yiluheihei.github.io/microbiomeMarker/>
36. Liu C, Cui Y, Li X, Yao M. *microeco* : an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2021; doi:10.1093/femsec/fiaa255/6041020
 37. Kassambara A. *rstatix* R package. 2021. <https://cran.r-project.org/web/packages/rstatix/index.html>
 38. Chen J-C, Kou Y-Z. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture.* 1992; doi:10.1016/0044-8486(92)90207-2
 39. Xia LZ, Yang LZ, Yang MC. Nitrogen and phosphorus cycling in shrimp ponds and the measures for sustainable management. *Environ Geochem Health.* 2004; doi:10.1023/B:EGAH.0000039587.64830.43
 40. Magallon Barajas FJ, Servin Villegas R, Portillo Clark G, Lopez Moreno B. *Litopenaeus vannamei* (Boone) post-larval survival related to age, temperature, pH and ammonium concentration. *Aquac Res.* 2006 ;doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01455.x
 41. Zhao M, Yao D, Li S, Zhang Y, Aweya JJ. Effects of ammonia on shrimp physiology and immunity: a review. *Rev Aquac.* 2020; doi:10.1111/raq.12429
 42. Sehnaal L, Brammer-Robbins E, Wormington AM, Blaha L, Bisesi J, Larkin I, et al. Microbiome Composition and Function in Aquatic Vertebrates: Small Organisms Making Big Impacts on Aquatic Animal Health. *Front Microbiol.* 2021; doi:10.3389/fmicb.2021.567408
 43. Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. *Rhodobacteraceae* fam. nov. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* Wiley. 2015; doi:10.1002/9781118960608.fbm00173
 44. Haggerty JM, Dinsdale EA, Davies J. Distinct biogeographical patterns of marine bacterial taxonomy and functional genes. *Glob Ecol Biogeogr.* 2017; doi:10.1111/geb.12528
 45. Simon M, Scheuner C, Meier-Kolthoff JP, Brinkhoff T, Wagner-Döbler I, Ulbrich M, et al. Phylogenomics of *Rhodobacteraceae* reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *ISME J.* 2017; doi:10.1038/ismej.2016.198
 46. Ivanova EP, Mikhailov VV. A new family, *alteromonadaceae* fam. nov., including marine proteobacteria of the genera *alteromonas*, *pseudoalteromonas*, *idiomarina*, and *colwellia*. *Mikrobiologiya.* 2001; doi: 10.1023/a:1004876301036
 47. Hou D, Huang Z, Zeng S, Liu J, Weng S, He J. Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment. *J Appl Microbiol.* 2018; doi:10.1111/jam.13919
 48. Yan M, Zhang X, Hu L, Huang X, Zhou Q, Zeng G, et al. Bacterial Community Dynamics During Nursery Rearing of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Revealed via High-Throughput Sequencing. *Indian J Microbiol.* 2020; doi:10.1007/s12088-019-00853-7
 49. Liu H, Wang L, Liu M, Wang B, Jiang K, Ma S, et al. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR–DGGE and clone library analyses. *Aquaculture.* 2011; doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.008
 50. Huang Z, Li X, Wang L, Shao Z. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res.* 2016; doi:10.1111/are.12628
 51. Zheng Y, Yu M, Liu J, Qiao Y, Wang L, Li Z, et al. Bacterial Community Associated with Healthy and Diseased Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Larvae and Rearing Water across Different Growth Stages. *Front Microbiol.* 2017; doi:10.3389/fmicb.2017.01362
 52. Wang H, Huang J, Wang P, Li T. Insights into the microbiota of larval and postlarval Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) along early developmental stages: a case in pond level. *Mol Genet Genomics.* 2020; doi:10.1007/s00438-020-01717-2
 53. Wang Y, Wang K, Huang L, Dong P, Wang S, Chen H, et al. Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome.* 2020; doi:10.1186/s40168-020-00879-w
 54. Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature.* 2002; doi:10.1038/nature01240
 55. Bernardet J. *Flavobacteriaceae*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* Wiley. 2015; doi:10.1002/9781118960608.fbm00069
 56. Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. *Oceanospirillaceae* fam. nov. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* Wiley. 2015; doi:10.1002/9781118960608.fbm00229
 57. Restrepo L, Domínguez-Borbor C, Bajaña L, Betancourt I, Rodríguez J, Bayot B, et al. Microbial community characterization of shrimp survivors to AHPND challenge test treated with an effective shrimp probiotic (*Vibrio diabolicus*). *Microbiome.* 2021; doi:10.1186/s40168-021-01043-8
 58. Fernández-Gómez B, Richter M, Schüler M, Pinhassi J, Acinas SG, González JM, et al. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *ISME J.* 2013; doi: 10.1038/ismej.2012.169

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

59. McIlroy SJ, Nielsen PH. The Family Saprospiraceae. In: The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2014; doi: 10.1007/978-3-642-38954-2_138
60. Cornejo-Granados F, Gallardo-Becerra L, Leonardo-Reza M, Ochoa-Romo JP, Ochoa-Leyva A. A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. PeerJ. 2018; doi:10.7717/peerj.5382
61. Hugerth LW, Andersson AF. Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. Front Microbiol. 2017; doi:10.3389/fmicb.2017.01561
62. Sathish Kumar T, Vidya R, Kumar S, Alavandi SV, Vijayan KK. Zoea-2 syndrome of *Penaeus vannamei* in shrimp hatcheries. Aquaculture. 2017; doi:10.1016/j.aquaculture.2017.07.022
63. Souza CP, Almeida BC, Colwell RR, Rivera ING. The Importance of Chitin in the Marine Environment. Mar Biotechnol. 2011; doi: 10.1007/s10126-011-9388-1
64. Reichenbach H. The Order Cytophagales. In: The Prokaryotes. New York, NY: Springer New York. 1992; doi:10.1007/978-1-4757-2191-1_37
65. Snyder AR, Williams HN, Baer ML, Walker KE, Stine OC. 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; doi: 10.1099/ijs.0.02261-0
66. Bratanis E, Andersson T, Lood R, Bukowska-Faniband E. Biotechnological Potential of *Bdellovibrio* and Like Organisms and Their Secreted Enzymes. Front Microbiol. 2020; doi:10.3389/fmicb.2020.00662
67. Nyholm SV. In the beginning: egg–microbe interactions and consequences for animal hosts. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2020; doi:10.1098/rstb.2019.0593
68. Amoah K, Huang Q cheng, Dong X hui, Tan B ping, Zhang S, Chi S yan, et al. *Paenibacillus polymyxa* improves the growth, immune and antioxidant activity, intestinal health, and disease resistance in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture. 2020; doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734563
69. Feng T, Jeong SE, Kim KH, Park HY, Jeon CO. *Aestuariicoccus marinus* gen. nov., sp. nov., isolated from sea-tidal flat sediment. Int J Syst Evol Microbiol. 2018; doi:10.1099/ijsem.0.002494
70. Wirth JS, Whitman WB. Phylogenomic analyses of a clade within the roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuaria*, *Citricella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal. Int J Syst Evol Microbiol. 2018; doi: 10.1099/ijsem.0.002833
71. Heyse J, Props R, Kongnuan P, De Schryver P, Rombaut G, Defoirdt T, et al. Rearing water microbiomes in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larviculture assemble stochastically and are influenced by the microbiomes of live feed products. Environ Microbiol. 2021; doi:10.1111/1462-2920.15310
72. Zheng Y, Yu M, Liu Y, Su Y, Xu T, Yu M, et al. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. Aquaculture. 2016; doi:10.1016/j.aquaculture.2015.09.020
73. Lu J, Zhang X, Qiu Q, Chen J, Xiong J. Identifying Potential Polymicrobial Pathogens: Moving Beyond Differential Abundance to Driver Taxa. Microb Ecol. 2020; doi:10.1007/s00248-020-01511-y
74. Porsby CH, Nielsen KF, Gram L. *Phaeobacter* and *Ruegeria* species of the Roseobacter clade colonize separate niches in a Danish turbot (*Scophthalmus maximus*)-rearing farm and antagonize *Vibrio anguillarum* under different growth conditions. Appl Environ Microbiol. 2008; doi: 10.1128/AEM.01738-08
75. Gromek SM, Suria AM, Fullmer MS, Garcia JL, Gogarten JP, Nyholm S V., et al. *Leisingera* sp. JC1, a bacterial isolate from hawaiian bobtail squid eggs, produces indigoidine and differentially inhibits vibrios. Front Microbiol. 2016; doi:10.3389/fmicb.2016.01342
76. Cram JA, Xia LC, Needham DM, Sachdeva R, Sun F, Fuhrman JA. Cross-depth analysis of marine bacterial networks suggests downward propagation of temporal changes. ISME J. 2015; doi:10.1038/ismej.2015.76
77. Reintjes G, Tegetmeyer HE, Bürgisser M, Orlić S, Tews I, Zubkov M, et al. On-Site Analysis of Bacterial Communities of the Ultraoligotrophic South Pacific Gyre. Nojiri H, editor. Appl Environ Microbiol. 2019; doi:10.1128/AEM.00184-19
78. Lavoie C, Wellband K, Perreault A, Bernatchez L, Derome N. Artificial rearing of atlantic salmon juveniles for supportive breeding programs induces long-term effects on gut microbiota after stocking. Microorganisms. 2021; doi:10.3390/microorganisms9091932
79. Sorieul L, Wabete N, Mailliez J, Pallud M, Zhang C, Lindivat M, Boulo V, Pham D. Survival improvement conferred by the *Pseudoalteromonas* sp. NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress. Aquaculture. 2018; doi:

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

- 10.1016/j.aquaculture.2018.06.058
80. Sorieul L, Rückert C, Al-Dilaimi A, Winkler A, Kalinowski J, Pham D, Wabete N, Boulo V. Whole-genome sequence of *Pseudoalteromonas* sp. NC201, a probiotic strain for *Litopenaeus stylirostris* hatcheries in New Caledonia. *Microbiol Resour Announc*. 2019; doi: 10.1128/MRA.00477-19
 81. Methou P, Hernández-Ávila I, Aube J, Cuffe-Gauchard V, Gayet N, Amand L, et al. 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. *Front Microbiol*. 2019; doi:10.3389/fmicb.2019.00808
 82. Orsi WD, Smith JM, Liu S, Liu Z, Sakamoto CM, Wilken S, et al. Diverse, uncultivated bacteria and archaea underlying the cycling of dissolved protein in the ocean. *ISME J*. 2016; doi: 10.1038/ismej.2016.20
 83. Buchan A, González JM, Moran MA. Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol*. 2005; doi:10.1128/AEM.71.10.5665
 84. Balcázar JL, Blas I de, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol*. 2006; doi:10.1016/j.vetmic.2006.01.009
 85. Dawood MAO, Koshio S, Abdel-Daim MM, Van Doan H. Probiotic application for sustainable aquaculture. *Rev Aquac*. 2019; doi:10.1111/raq.12272
 86. Yang W, Zheng C, Zheng Z, Wei Y, Lu K, Zhu J. Nutrient enrichment during shrimp cultivation alters bacterioplankton assemblies and destroys community stability. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018; doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.043
 87. Qin BQ, Gao G, Zhu GW, Zhang YL, Song YZ, Tang XM, et al. Lake eutrophication and its ecosystem response. *Chinese Sci Bull*. 2013; doi: 10.1007/s11434-012-5560-x
 88. Liu Q, Zhang Y, Wu H, Liu F, Peng W, Zhang X, et al. A review and perspective of edna application to eutrophication and hab control in freshwater and marine ecosystems. *Microorganisms*. 2020; doi:10.3390/microorganisms8030417
 89. Smith VH, Schindler DW. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends Ecol Evol*. 2009; doi: 10.1016/j.tree.2008.11.009
 90. Aragno M. Responses of Microorganisms to Temperature. *Physiol Plant Ecol I*. 1981; doi: 10.1007/978-3-642-68090-8_12
 91. Huang F, Pan L, Song M, Tian C, Gao S. Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018; doi: 10.1007/s00253-018-9229-5
 92. Côte J, Jacquin L, Veyssièrre C, Manzi S, Etienne R, Perrault A, et al. Changes in fish skin microbiota along gradients of eutrophication in human-altered rivers. *FEMS Microbiol Ecol*. 2022; doi:10.1093/femsec/fiac006/6517683
 93. De Schryver P, Vadstein O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *ISME J*. 2014; doi:10.1038/ismej.2014.84
 94. Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Forberg T, Olsen Y, Verdegem M, et al. Managing the Microbial Community of Marine Fish Larvae: A Holistic Perspective for Larviculture. *Front Microbiol*. 2018; doi:3389/fmicb.2018.01820
 95. Zhou J, Ning D. Stochastic Community Assembly: Does It Matter in Microbial Ecology? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017; doi:10.1128/MMBR.00002-17
 96. Bakke I, Coward E, Andersen T, Vadstein O. Selection in the host structures the microbiota associated with developing cod larvae (*Gadus morhua*). *Environ Microbiol*. 2015; doi:10.1111/1462-2920.12888
 97. Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, Heilig H, Benvenuti G, Verreth J, et al. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci Rep*. 2015; doi: 10.1038/srep18206
 98. Yan Q, van der Gast CJ, Yu Y. Bacterial Community Assembly and Turnover within the Intestines of Developing Zebrafish. Bereswill S, editor. *PLoS One*. 2012; doi:10.1371/journal.pone.0030603

V.3- Synthèse des résultats et perspectives

Les bacs d'élevage larvaire considérés lors de cette étude ont tous montré une eutrophisation de l'eau d'élevage au cours du développement des animaux. En effet, en conséquence de l'accumulation de nourriture non ingérée, de fèces et de mues de larves, une augmentation de la concentration en sels nutritifs (ammonium et phosphate) et en matière organique (CDOM, $a\lambda_{325}$) a été observée. En parallèle, une diminution du SR a également été mise en évidence dans l'ensemble des eaux d'élevage. L'implication des variations du SR a précédemment été discutée dans le chapitre IV (partie IV.1.3). Enfin, une acidification du pH a été constatée. Elle peut potentiellement être liée à une augmentation de la biomasse et de la croissance bactérienne conduisant à des concentrations en CO₂ plus importantes dans le milieu (Smith & Schindler 2009). Des modifications drastiques du milieu d'élevage, pouvant moduler l'écosystème microbien associé à l'eau et aux larves, ont donc été mises en évidence. Les ordonnancements (dendrogramme et PCoA) construits à partir des données de diversité procaryotique ont d'ailleurs montré 3 groupes distincts composés des échantillons de J0 à J2 (stades nauplius et zoé 1), de J3 à J5 (stades zoé 2 et 3) et de J7 à J9 (stades mysis et post-larve). Ces résultats suggèrent un potentiel effet du stade de développement et du milieu d'élevage sur les communautés procaryotiques environnementales et larvaires. Il est également possible que l'ajout d'antibiotiques à J4 et les modifications de séquence alimentaire (ajout d'Artémias à J4 et changement de microparticules à J2, J5 et J7) puissent moduler les communautés procaryotiques associées aux élevages. Malgré ces variations, plusieurs bactéries affiliées aux ordres *Alteromonadales*, *Rhodobacterales*, *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales* et *Vibrionales* ont été mises en évidence dans l'ensemble des échantillons d'eau et de larves. Ces ordres bactériens ont également été identifiés dans la littérature chez d'autres espèces de crevettes. Ces observations renforcent les hypothèses faites précédemment concernant une potentielle transmission horizontale de certaines communautés microbiennes et une persistance de microorganismes spécifiques tout au long de la vie des animaux. Les variations d'abondances bactériennes au cours des élevages ont été analysées à l'aide de LEfSe. Aussi bien dans l'eau que dans les larves et à différents moments de l'élevage, ces analyses ont montré un enrichissement de plusieurs bactéries potentiellement probiotiques affiliées aux groupes AEGEAN 169 (*Rhodospirillales*) et OM27 (*Bdellovibrionales*) ainsi qu'aux genres *Ruegeria*, *Leisingera*, *Pseudoalteromonas* et *Roseobacter*. Un probiotique est défini comme un microorganisme vivant qui exerce des effets positifs sur la santé de son hôte (stimulation du système immunitaire, amélioration de la nutrition, etc.) lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante (FAO 2001). En aquaculture, la définition s'élargit et réfère également à un microorganisme vivant capable d'améliorer la qualité de l'eau d'élevage (dégradation de certains composés physico-chimiques, compétition avec des microorganismes opportunistes ou pathogènes, etc.) (Verschuere et al. 2000). Ainsi, il semblerait que diverses bactéries potentiellement bénéfiques soient impliquées à différents moments de l'élevage larvaire de *P. stylirostris*. Elles pourraient chacune jouer un rôle à des périodes clés du développement larvaire. Ces observations sont en faveur d'une adaptation de l'usage des probiotiques dans les systèmes aquacoles en Nouvelle-Calédonie (classiquement une seule souche est utilisée au cours de l'élevage) (Pham et al. 2014). Il est également intéressant de noter que l'ensemble des ASVs enrichis dans l'eau et dans les larves étaient présents dans les eaux de réserve et dans les œufs montrant l'importance de la mise en place du microbiote larvaire sur le devenir de l'élevage ainsi que l'importance de la composition microbienne de l'eau de mer lagunaire. Des corrélogrammes ont enfin permis

Chapitre V – Évolution des communautés procaryotiques associées à un élevage larvaire en bonne santé

de mettre en évidence des corrélations existantes entre les paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage et les ASVs enrichis au cours du développement larvaire suggérant l'implication de processus déterministes dans la modulation de l'écosystème microbien associés aux élevages. Cependant, le faible nombre de corrélations observées entre les bactéries enrichies au stade larvaire zoé et les paramètres environnementaux suggèrent également l'implication de processus stochastiques. Il est néanmoins possible que certains facteurs, non pris en compte lors de cette étude, puissent également expliquer ces observations. En conclusion, l'ensemble des résultats témoignent de changements radicaux entre le début et la fin du développement larvaire tant au niveau du milieu d'élevage que du microbiote de l'eau et des larves.

CHAPITRE VI

**Caractérisation des communautés
procaryotiques de l'eau d'élevage au
cours de mortalités larvaires :
identification de biomarqueurs**

VI- Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs

VI.1- Introduction

L'intensification des pratiques aquacoles au cours des dernières décennies a contribué à l'émergence d'épisodes de mortalités massives dont les causes sont souvent inexplicables (Balcázar et al. 2006; Egan & Gardiner 2016). En effet, la complexité de distinguer les microorganismes pathogènes des saprophytes chez des animaux moribonds ou morts ainsi que l'émergence de maladies polymicrobiennes complexifient la mise en évidence d'un unique responsable des mortalités. De plus, certains pathogènes opportunistes peuvent appartenir au microbiote de leur hôte et ne devenir néfastes que sous certaines conditions. Enfin, des phénomènes de dysbiose peuvent également survenir (Egan & Gardiner 2016). Ces facteurs, et notamment la dysbiose, ont un impact sur la santé de crevettes *Penaeus vannamei* adultes (Xiong et al. 2015; Cornejo-Granados et al. 2017). Dans ce contexte, des modifications des communautés microbiennes associées à l'eau et aux larves de *P. stylirostris* ont été suspectées d'être impliquées dans les mortalités larvaires massives constatées dans les écloseries de Nouvelle-Calédonie (chap. I, partie I.1.2.c). L'article 3 présenté dans le chapitre V (partie V.2) a permis de caractériser les communautés procaryotiques associées à l'eau et aux larves de *P. stylirostris* au cours d'élevages en bonne santé. Il montre également une succession de taxa bactériens potentiellement bénéfiques durant le développement avec une mise en évidence de ces microorganismes en amont des élevages, dans les eaux de remplissage (provenant du lagon) et de réserve (alimentant les bacs d'élevage). À partir de ces connaissances et dans l'objectif de vérifier si un phénomène de dysbiose cause les mortalités larvaires observées, 2 études ont été conduites (article 4, partie VI.2 et article 5, partie VI.3). Elles visent à caractériser les communautés procaryotiques associées à des élevages en mauvaise santé, présentant donc d'importantes mortalités larvaires, et à mettre en évidence de potentiels biomarqueurs bactériens de la santé de ces élevages. La première étude (article 4) se concentre sur la dynamique des communautés procaryotiques associées à l'eau traitée des élevages avec (TA0) et sans (TSA) antibiotique de la campagne M3 réalisée en novembre 2018 à la Station Aquacole de Saint Vincent (SASV) (Tab. 6, chap. II, partie II.1.1a). Une analyse de la qualité physico-chimique de ces échantillons d'eau a également été réalisée par dosages des sels nutritifs et évaluation de la concentration en matière organique dissoute colorée (CDOM) (chap. II, parties II.4.2 et II.4.3). La seconde étude (article 5) vise à comparer, pendant l'élevage larvaire, l'évolution des communautés procaryotiques de l'eau non traitée des élevages avec (NTA0) et sans (NTSA) antibiotique de la campagne M4 réalisée en février 2019 à la SASV (Tab. 6, chap. II, partie II.1.1a). Pour chaque étude, la survie et le stade larvaire ont été estimés quotidiennement. Des échantillons de larves ainsi que d'eau de remplissage (eau provenant du lagon et stockée dans la réserve primaire) et de réserve (eau traitée dans la réserve secondaire et alimentant les bacs d'élevage) ont également été considérés (chap. II, partie II.1.1.a). Après extraction des ARNs et rétrotranscription en ADNc, des séquençages Illumina HiSeq (2 x 150pb) ont été réalisés (chap. IV, partie IV.1.1). Les données de séquençage ont été traitées avec le pipeline FROGS (Escudié et al. 2018) (chap. III, partie III.3.1) dans l'article 4 et avec le pipeline DADA2 (Callahan et al. 2016) (chap. III,

Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs

partie III.3.2) dans l'article 5. Dans les 2 cas, les tables de comptage (OTU ou ASV) obtenues ont été normalisées par la méthode CPM (chapitre III, partie III.4.2.b) avant les analyses d'ordonnement (dendrogramme, NMDS, PCoA). Des histogrammes, des diagrammes de Venn et des LEfSe ont également été effectués (chap. II, partie II.5.3). Dans l'article 5, une PERMANOVA a été réalisée sous RStudio.

VI.2- Article 4 – Microbiota of the rearing water of *Penaeus stylirostris* larvae influenced by lagoon seawater and specific key lineages of larval stage and survival



RESEARCH ARTICLE



Microbiota of the Rearing Water of *Penaeus stylirostris* Larvae Influenced by Lagoon Seawater and Specific Key Microbial Lineages of Larval Stage and Survival

Nolwenn Callac,^a Viviane Boulo,^{a*} Carolane Giraud,^{a,b} Maxime Beauvais,^{a,§} Dominique Ansquer,^a Valentine Ballan,^a Jean-René Maillez,^a Nelly Wabete,^a Dominique Pham^a

^aIfremer, IRD, Université de la Nouvelle-Calédonie, Université de La Réunion, CNRS, UMR 9220 ENTROPIE, Nouméa, New Caledonia

^bInstitut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA), University of New Caledonia, Nouméa, New Caledonia

ABSTRACT Aquacultured animals are reared in water, where they interact with microorganisms which can be involved in their development, immunity, and disease. It is therefore interesting to study the rearing water microbiota, especially in the hatcheries of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris*, where larval mass mortalities occur. In this study, using HiSeq sequencing of the V4 region of the 16S rRNA molecule coupled with zootechnical and chemical analyses, we investigated whether any microbial lineages could be associated with certain mortality rates at a given larval stage. Our results indicate that the active microbiota of the rearing water was highly dynamic throughout the rearing process, with distinct communities influenced by progressive water eutrophication, larval stage, and survival rate. Our data also highlighted the role of the lagoon seawater on the rearing water microbiome, as many operational taxonomic units (OTUs) specific to a given larval stage and survival rate were detected in the primary reservoir which contained the lagoon water. We also identified biomarkers specific to water eutrophication, with *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, and *Methylophilaceae*, respectively, linked to increases in ammonia, nitrogen, and soluble reactive phosphate, or to increases in colored dissolved organic matter in the rearing water; other biomarkers were specific to certain larval stages and survival rates. Indeed, the *Marinobacteraceae* were specific to the Nauplii, and the *Thalassospiraceae* and *Saprospiraceae* to the Zoea Good condition; when mortality occurred, the *Litoricolaceae* were specific to the Zoea Bad, *Microbacteraceae* to the Mysis Bad, and *Methylophilaceae* to the Mysis Worst condition. Thus, these biomarkers might be used as potential early warning sentinels in water storage to infer the evolution of larval rearing to improve shrimp larval rearing.

IMPORTANCE In New Caledonia, rearing of *P. stylirostris* is one of the main economic activities; unfortunately, mass larval mortalities cause important production decreases, involving major economic losses for the farmers and the Territory. This phenomenon, which has occurred at any larval stage over the past decade, is poorly understood. The significance of our research is in the identification of biomarkers specific to larval stage and survival rate, with some of these biomarkers being already present in the lagoon water. This enhances the role of the lagoon on the active microbiota of the rearing water at various larval stages and survival rates. Together, our results help us understand which active microbial communities are present in the rearing water according to larval stage and health. This might lead to broader impacts on hatcheries by helping to develop useful tools for using the water—lagoon, reservoir, or rearing—to test for the presence of these biomarkers as an early monitoring strategy.

KEYWORDS active microbiota, rearing water, core microbiome, specific microbiome, larvae, shrimp

Editor John M. Chaston, Brigham Young University

Copyright © 2022 Callac et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Nolwenn Callac, nolwenn.callac@ifremer.fr.

*Present address: Viviane Boulo, IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan via Domitia, Montpellier, France.

§Present address: Maxime Beauvais, Sorbonne Université, UMR 7261, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, CNRS, Banyuls-sur-Mer, France.

The authors declare no conflict of interest.

Received 17 October 2022

Accepted 9 November 2022

Published 23 November 2022

Aquatic animals are influenced by the physical, chemical, and microbiological composition of their surrounding water, with microorganisms playing the greatest role. Indeed, they are involved in various biogeochemical cycles, such as the carbon and nitrogen cycles, through organic matter degradation, remineralization, and organic matter turnover (1–3). In addition, microorganisms are also involved in animal development, physiology fitness, and immunity, as some microorganisms may help protect against diseases or, inversely, be pathogenic (4–7). Aquacultured animals are reared in water and are therefore continuously surrounded by the water microbiota, with which they share close relationships (8–11). Several studies have shown that microbial exchanges occur between the water and various tissues of reared aquatic animals such as the gills or intestines. Thus, the host can enrich its own microbiota by selecting microorganisms from its environment (12–14). It has also been proven that the microbiome of the larvae, especially for fish such as cod or tilapia, shared more common taxa with the surrounding rearing water than with the feed products (12, 15, 16). Many studies have argued the importance of the microbiota of the rearing water for both the health of the animal and the modulation of its microbiome during all life cycle stages (17, 18). Research on the health of reared aquatic animals or the evolution of their rearing water usually focuses on the most abundant taxa. However, for many macroorganisms, such as humans or aquatic organisms (corals or fish), it has been established that, except for a conserved core microbiome, the overall microbiota changes in response to environmental disturbances while the rare taxa are cornerstone microorganisms which shape the community structure (19–22). In addition, more and more studies have proven that the low-abundance taxa have a crucial role in the ecosystem, playing substantial roles in biogeochemical cycles and often driving concealed functions of the microbiome (22, 23).

In New Caledonia, the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* is farmed, and its semi-intensive production achieved up to 1,444 tons in 2019. Around 55% of this production is exported to the rest of the world, making this sector the second biggest economic source for the territory after the nickel industry (<https://www.agence-rurale.nc/filieres/peche-et-aquaculture/crevettes/>) (24, 25). In 2019, 128 million post-larvae were produced, compared to 167 million in 2005. This dramatic drop is due to the huge mortality issues occurring at all larval stages which hatcheries have been facing for the past decade. This phenomenon is still poorly understood, and the causes are still unidentified (24). Water quality has been considered as a possible cause, but the discrepancy in larval survival during the same rearing cycle in the same hatchery eliminates this hypothesis. Bacterial infection has often been suspected, but an analysis conducted by the Neo-Caledonian Network of Shrimp Epidemiological Vigilance (REC-DAVAR) revealed no evidence of larval septicemia. A multifactorial cause seems to prompt mass larval mortality. Our hypothesis is that a shift in the active microbial diversity of the rearing water could lead to microbial dysbiosis in both water and larvae, which could then hamper the larvae and lead to the mass mortality observed. To address whether the microbiome of the rearing water could be linked to lower larval survival rates, we especially investigated whether any microbial lineages or families were associated with certain mortality rates at given larval stages and whether the composition of the rearing seawater had any effect. Because antibiotics are used for prophylactic reasons under veterinary advice during shrimp larval rearing in New Caledonian hatcheries, we also investigated the effect of the addition or absence of erythromycin on the rearing water microbiota and larval survival. Thus, we followed the evolution of the dissolved organic matter, dissolved total nitrogen, reactive phosphorus, and active microbial diversity from the storage water to the rearing tanks during the first 10 days of larval rearing. A core microbiome of all the rearing waters was found and most of these operational taxonomic units (OTUs) were previously present in the water storage, highlighting the huge influence of the lagoon seawater on the larval rearing. Several biomarkers at the family level were specific to a given larval stage and survival rate or specific to the rearing water eutrophication. Furthermore, in the context of our study, we highlighted potential

bacterial lineages present during early rearing that could either be putative larvae pathogen or potential indicators of upcoming and progressive larval mortality.

RESULTS

Time-series analyses of the chemical parameters and larval development.

Throughout the 9 rearing days, the temperature and salinity of all tanks remained constant at $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 35 ± 0.2 ppt, respectively. Total ammonia nitrogen (TAN), soluble reactive phosphate (SRP), and the absorption coefficient at 325 nm ($A_{\lambda 325}$, proxy for CDOM [chromophoric dissolved organic matter]) remained low and constant in the control waters whereas they increased constantly in the larval rearing waters, with or without antibiotic treatment (Fig. 1). Indeed, in the rearing water, TAN concentrations increased around 7-fold between day 3 (D3) and D9 in both treatments (with and without antibiotic) (Fig. 1A). The same trend was observed for SRP, with the same magnitude (Fig. 1B). The CDOM tripled from D0 to D9 in all larval rearing water tanks (Fig. 1C). Compared to the reference, significant mortality was observed between D6 and D9 regardless of the treatment. Overall, the two treatments resulted in survival rates below 45% on D9, except for the third tank with antibiotic (samples with D9-3), with a survival rate of 57% (Fig. 1D). At the end of the experiment, a delay in larval growth was observed because all larvae in all tanks were still in the mysis stage (Fig. 1E) compared to the reference, where at least half of the shrimp cohort usually reached the post-larvae stage at D9 (the stage reference is an average of the daily larval stage calculated using 10 years of data for successful rearing; Pham, personal communication). Mann-Whitney tests showed that the addition of antibiotic had no significant effect on TAN, SRP or CDOM concentrations, with *P* values of 0.851, 0.860, and 0.649, respectively. Furthermore, the addition of antibiotic did not impact larval development or larval survival, with *P* values of 0.276 and 0.786, respectively.

Dynamic of the active microbial diversity in the rearing water. We used a metabarcoding approach to characterize the prokaryotic communities associated with the water samples, resulting in, after filtration, chimera, chloroplast and mitochondrial removal, and taxonomic assignment, a total of 4,612,207 reads clustered into 1,563 OTUs according to the database Silva 132-165. The OTUs were spread into 21 phyla, 3 from Archaea and 18 from Bacteria. The alpha diversity index values, shown in Table S1, indicated that the richness estimated using ACE and Chao1 was generally higher in the rearing water samples without antibiotic than in the rearing water with antibiotic and the control water. The richness was higher in the reservoirs than in the control water. The same trend was observed for the evenness estimated with the Shannon and Inverse Simpson indexes. The Mann-Whitney tests performed on the alpha-diversity indices between water samples on D1 with and without antibiotic indicated that diversity was not significantly different; whereas considering the entire set of samples (from D1 to D9) with and without antibiotic, the alpha diversity indices were significantly different, with *P* < 0.05.

We first visualized how the samples clustered together according to the entire normalized OTU table. The dendrogram displayed 10 clusters at a threshold of 1, with clear distinction among the samples regarding the water type: control, rearing water with antibiotic, rearing water without antibiotic, and reservoir water. Clusters 1 and 8 were the exception, as they included samples with and without antibiotic (Fig. 2A). Indeed, cluster 1 encompassed all the rearing water samples without antibiotic collected on D8 and D9 and all the rearing water with antibiotic samples between D7 and D9. Cluster 2 pooled the water samples without antibiotic collected on D6 and D7. The water reservoirs (primary [GR] and secondary [RC and C]) were gathered together in cluster 3. Clusters 4, 5, and 6 encompassed all the rearing waters without antibiotic sampled from D2 to D9; while clusters 7, 9 and 10 gathered all the rearing waters with antibiotic sampled from D2 to D9. Cluster 8 was composed of all the rearing water samples collected on D1. As pictured in Fig. 2A, the clustering was mostly consistent with the larval stages, while survival status did not influence grouping.

Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) displayed a clear distinction between the water reservoirs (cluster reservoirs), the control water (cluster control), and the rearing water samples with (clusters A, F, G, and H) or without antibiotic (clusters B, C, D,

Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs

Microbiota of the Rearing Water of Shrimp Larvae

Microbiology Spectrum

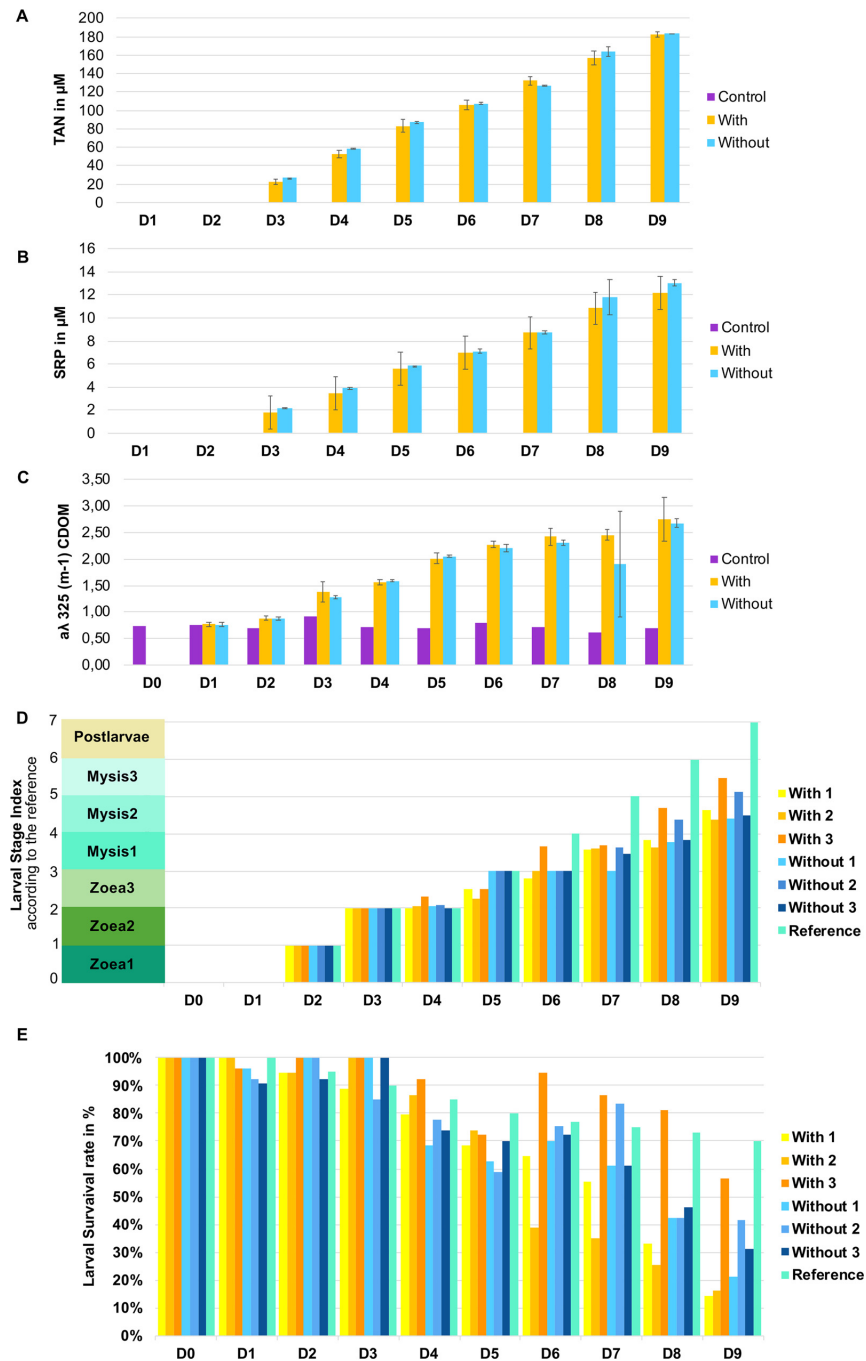


FIG 1 Evolution of hydrochemical values, larval survival rates, and development according to the days of the rearing period. Evolution of (A) total ammonia nitrogen (TAN), (B) soluble reactive phosphate (SRP) (for the control, both the TAN and SRP values were around $0 \mu\text{M}$ throughout the rearing), and (C) chromophoric dissolved organic matter (CDOM) concentrations using the $A_{\lambda 325}$ proxy, measured during the 10 days of rearing. Each bar of the bar plot (Continued on next page)

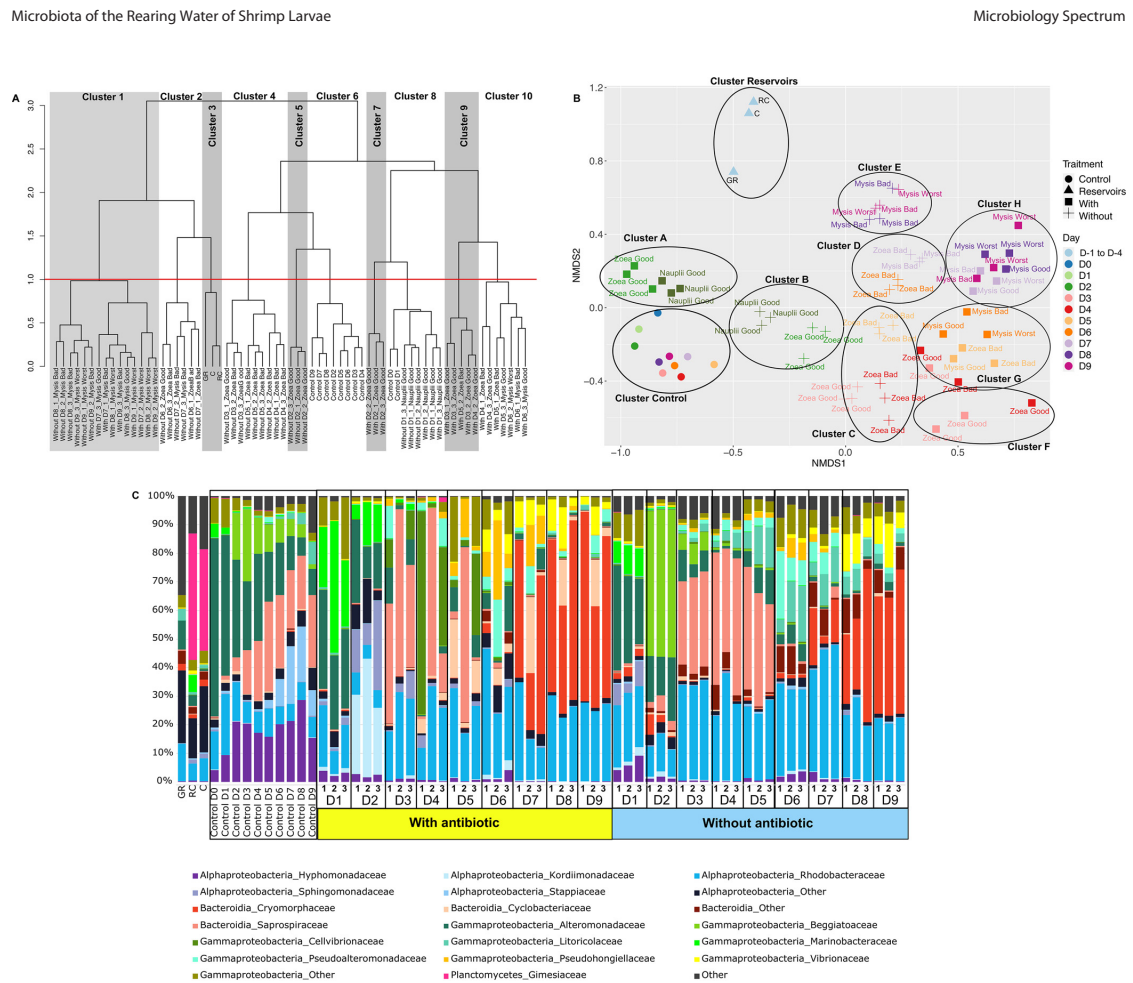


FIG 2 Clustering and microbial composition of the water samples with bacterial distribution at the family level in all the water samples. (A) Hierarchical clustering diagram based on microbial community dissimilarity, made at the operational taxonomic unit (OTU) level using the Bray-Curtis matrix. To define clusters, a threshold of 1 was set (red dotted line). (B) Nonmetric multidimensional scaling (NMDS), with stress at 0.15, allows visual representation of the rearing water samples according to the treatment (antibiotic or not), sampling day, and the larval stage and survival rate as labelled; clusters are represented by black circles. (C) Relative abundance of the main prokaryotic families. Relative abundance is shown as a percentage of the total prokaryotic sequences per sample. Only families representing more than 1% of the overall abundance in at least 3 samples are shown. GR, primary reservoir sample; RC, secondary reservoir sample; C, water circulated over 3 days through the filters and skimmer of the secondary reservoir; Control, control water without larvae or food. D indicates the sampling day, 1, 2, or 3, corresponding to the replicate tanks for the rearing water with or without antibiotic. Good survival: larval survival rate above, equal to, or slightly below the reference (less than 5%). Bad survival rate: survival rate between 50% and 100% of the reference value. Worst survival rate: survival rate below 50% of the reference value.

and E) as shown in Fig. 2B. However, the NMDS did not gather the samples as in the dendrogram; for example, cluster A encompassed the rearing water with antibiotic collected on D1 and D2, while in the dendrogram these samples were grouped in cluster 8 with the control samples collected on D0 and D1 and the rearing water without anti-

FIG 1 Legend (Continued)

corresponds to the average concentration of the triplicate tanks according to condition (with or without antibiotic) and to its standard deviation for each day of rearing. Time series of (D) larval stage with the theoretical Larval Stage Index (LSI) to be reached each day and (E) larval survival during the experiment compared to the reference in turquoise (e.g., usual survival and stage obtained for a specific day; both the survival and stage reference were calculated for each day using data from 10 years of successful rearing [fremer data, Pham, personal communication]). Left side of panel D, larval stages indices of 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 correspond to nauplii, zoea stages 1 to 3, mysis stages 1 to 3, and post-larva stage, respectively. Control indicates the control water without larvae and food; With-1, With-2, and With-3 correspond to the rearing water with antibiotic in tanks 1, 2, and 3; and Without-1, Without-2, and Without-3 correspond to the rearing water without antibiotic in tanks 1, 2, and 3. D0 to D9 indicate the days of rearing.

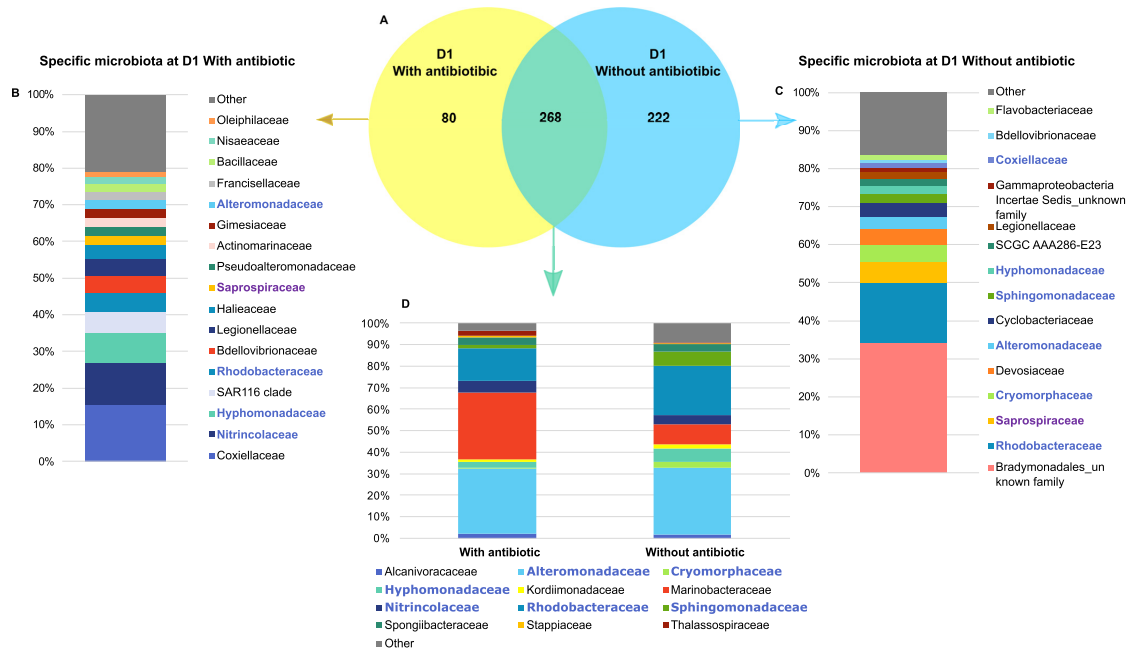


FIG 3 Microbial communities associated with specific and core microbiomes on D1 in the rearing waters supplemented or not supplemented with antibiotic. (A) Venn diagram of shared OTUs between the rearing waters with and without the antibiotic erythromycin. Blue ellipse represents OTUs common to the rearing water from the tanks without antibiotic collected on D1; yellow ellipse represents OTUs common to the rearing waters from the tanks with antibiotic on D1. The overlapping area between the blue and yellow ellipses represents the OTUs common to all water samples collected on D1. The numbers inside the ellipses and in the overlapping zones correspond to the total number of OTUs present under each condition. (B) Top 17 families with a relative abundance higher than 1% corresponding to the specific microbiome of the rearing water with antibiotic. (C) Top 15 families (when possible, higher level otherwise) with a relative abundance higher than 1% corresponding to the specific microbiome of the rearing water without antibiotic. (D) Top 12 families with a relative abundance higher than 1% corresponding to the core microbiome common to the rearing water with and without antibiotic collected at D1. Shown in blue are the families present in the core microbiome on D1 and in the specific microbiomes of the rearing water collected on D1 with and without antibiotic.

biotic samples collected on D1 and D2. However, like the dendrogram, it showed a daily evolution according to the sampling time and no clear grouping according to larval survival rate.

The active microbiota of the water samples showed different patterns according to the presence or absence of larvae or antibiotic (Fig. 2C). The primary reservoir (GR) which contained the lagoon seawater was mostly composed of members of *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Bacteroidota* classes and lineages related to the *Rhodobacteraceae* and *Alteromonadaceae* families. The secondary reservoirs (RC and C), before (RC) and after (C) recirculation through filters, exhibited the same outlines, with a high abundance of the *Gimesiaceae* family, which comprised around or less than 1% of the relative abundance in the rearing water sample and the control (Fig. 2C). The control water without larvae, antibiotic, or food was mainly composed of *Hyphomonadaceae*, *Alteromonadaceae*, and *Saprospiraceae*, with their relative abundances varying over the 10 days. The microbial composition of the rearing water with and without antibiotic displayed a homogeneous distribution among the replicates throughout the whole rearing, as shown in Fig. 2C. They were both mostly composed of *Rhodobacteraceae*, *Alteromonadaceae*, *Saprospiraceae*, *Litoricolaceae*, and *Cryomorphaceae* (Fig. 2C). On D2, and only on D2, the *Beggiatoaceae* were highly present in the water without antibiotic and the *Kordiimonadaceae* were found in the rearing water with antibiotic.

Specific and core microbiomes of the rearing water. To determine the impact of the antibiotic erythromycin on the microbiome of the rearing water, we made a Venn diagram of the rearing waters on D1 with and without antibiotic (Fig. 3A). On D1, the

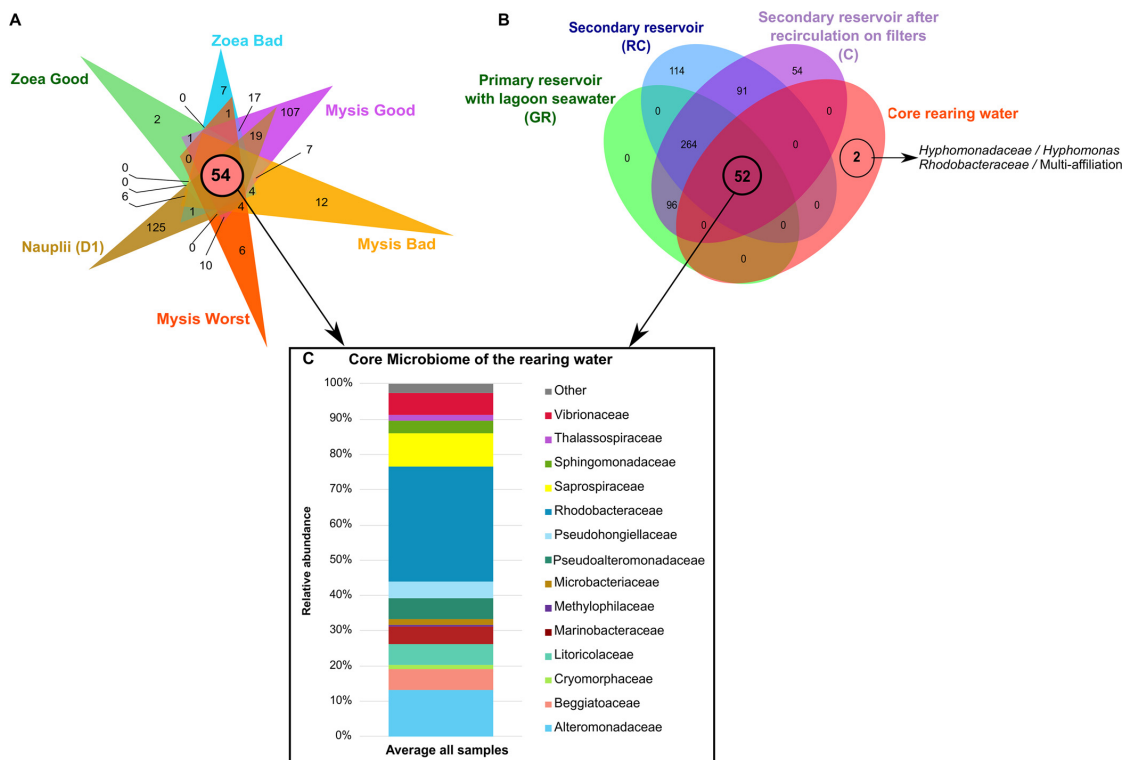
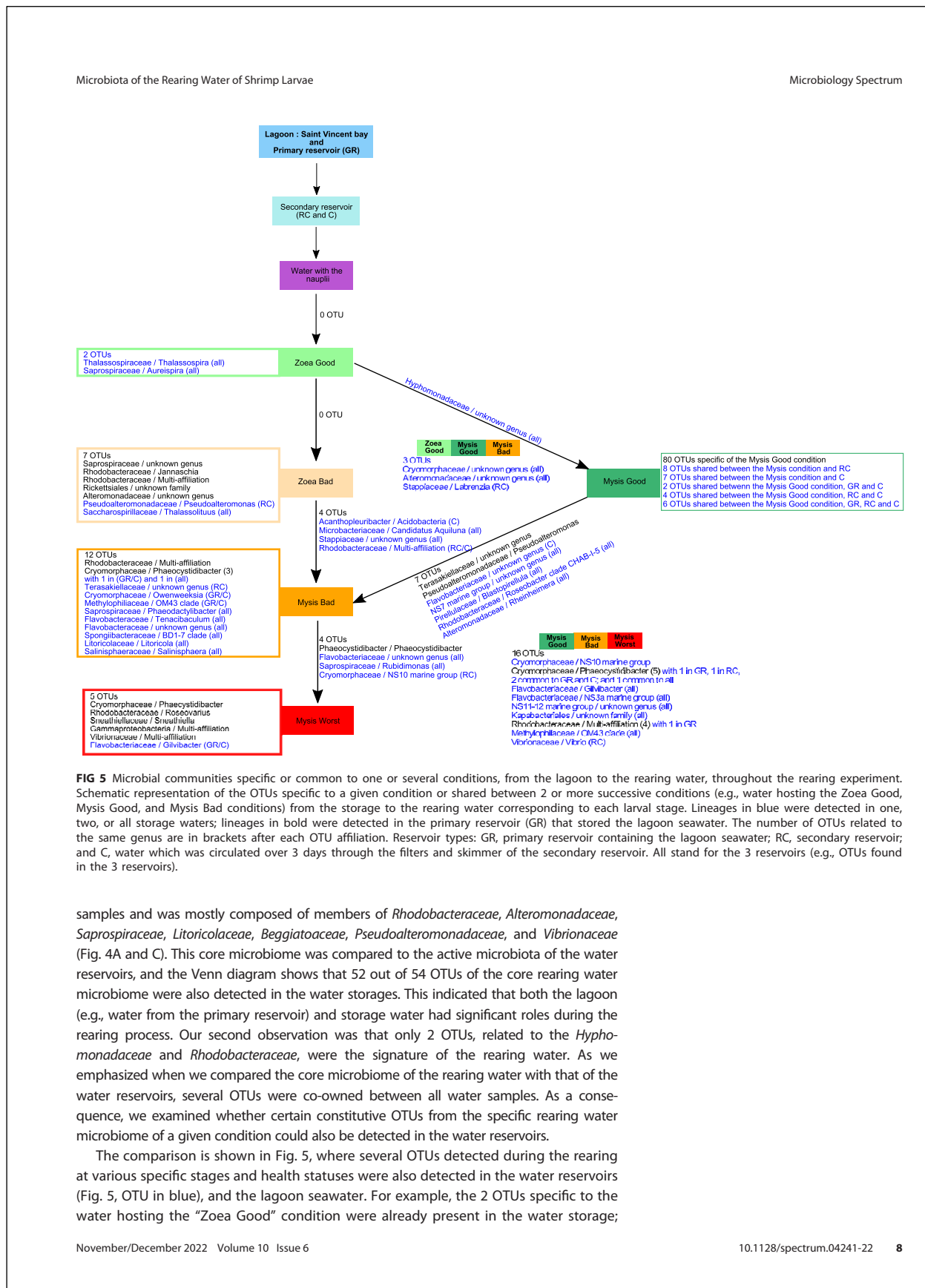


FIG 4 Microbial communities associated with the specific and core microbiomes of the entire rearing experiment in the rearing water. (A) Venn diagram of shared OTUs among rearing water samples. The overlapping area between all the ellipses, represented by a salmon circle, corresponds to the core microbiome composed of the 54 OTUs common to all samples. The numbers inside the ellipses and in the overlapping zones correspond to the total number of OTUs present under each condition. (B) Venn diagram of shared OTUs among the core rearing water samples and water storages. The numbers inside the ellipses and in the overlapping zone correspond to the total number of OTUs present under each condition. (C) Histogram of the families with relative abundance higher than 1%, constitutive of the core microbiome of all samples. All families with a relative abundance lower than 1% are included as "Other.". Barplot was constructed by averaging all rearing water samples.

rearing water hosted the nauplii which had a 100% survival rate, and these originated from the same nauplius batch; thus, we mostly expected to highlight the effect of the antibiotic on the rearing water microbiota. The water with antibiotic had 80 specific OTUs. These were mostly composed of members of *Coxiellaceae*, *Nitrincolaceae*, *Rhodobacteraceae*, and *Hyphomonadaceae* families and the SAR 116 clade (Fig. 3B). A total of 222 OTUs were specific to the water without antibiotic on D1, accounting for an average of 4% of the relative abundance, and these were dominated by an unknown family of the *Bradymonadales* and by *Rhodobacteraceae* (Fig. 3C). A core microbiome of 268 OTUs was shared in the rearing waters without or with antibiotic. This core microbiome encompassed an average of 97% of the reads. These 268 OTUs were mostly related to the *Marinobacteraceae*, *Alteromonadaceae*, and *Rhodobacteraceae* (Fig. 3D).

As described previously, the water samples were grouped according to larval stage and sampling day regardless of health status (Fig. 2A and B). However, we wondered whether several OTUs were specific to a given larval stage and health status and whether all the rearing water samples shared a core microbiome. Thus, in addition to the core microbiome on D1, several core microbiomes specific to a given condition were compared (Fig. 4): water hosting the zoea with a good survival rate (Zoea Good), water with the zoea with a bad survival rate (Zoea Bad), water with the mysis with a good survival rate (Mysis Good), water with the mysis with a bad survival rate (Mysis Bad), and rearing water with the mysis with a low survival rate (Mysis Worst). A core microbiome of 54 OTUs was co-owned by all



while of the 5 OTUs specific to the “Mysis Worst” condition, only 1 was also found in the water reservoirs. These observations indicated that many OTUs detected as specific lineages for a given condition were present in the lagoon and the water reservoirs and were reactivated during rearing according to water quality, larval stage, and/or larval health status.

Differential analyses of microbial communities. An initial linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) analysis was performed to investigate the families which were significantly more abundant in the water according to rearing day. On D1, 3 families were prevalent in the rearing water, *Hyphomonadaceae*, *Marinobacteraceae*, and *Alteromonadaceae*. On D2, only one family, *Thalassospiraceae*, was enriched. The following day (D3), one biomarker was highlighted with the *Saprospiraceae* family. On D4, the samples were dominated by *Rhodobacteraceae*, while no biomarker was found on D5. On D6, the samples were enriched in *Pseudoalteromonadaceae*. The following day (D7), two biomarkers, *Microbacteriaceae* and *Pseudohongiellaceae*, dominated the rearing water. On D8, *Methylophilaceae* and *Vibrionaceae* were enriched in the rearing water; while at the end of the larval rearing, on D9, the water samples were enriched in *Cryomorphaceae*.

A second LEfSe analysis was conducted to expose the families which were significantly more abundant in the rearing water according to larval stage and health status. When the nauplii with a good survival rate were in the rearing water, the most prevalent biomarkers in the samples were the same as those exhibited at D1 in the previous LEfSe: *Hyphomonadaceae*, *Marinobacteraceae*, and *Alteromonadaceae*. The rearing water hosting the zoea with a good survival rate had 3 enriched families: *Saprospiraceae*, *Sphingomonadaceae*, and *Thalassospiraceae*. Except for *Sphingomonadaceae*, all of these were detected in the first LEfSe, with the *Saprospiraceae* highlighted on D2 and the *Thalassospiraceae* on D3. The *Litoricolaceae* and *Rhodobacteraceae* were enriched in the rearing water hosting the zoea with a bad survival rate. *Rhodobacteraceae* was also the prevalent family on D4. The biomarker specific to the mysis with a good survival rate in the rearing water was *Pseudohongiellaceae*, previously detected as prevalent biomarker on D7. When the mysis had a bad survival rate, the samples were dominated by the *Cryomorphaceae* and *Microbacteriaceae*, families which were previously detected as biomarkers on D9 and D7, respectively. Three families were significantly enriched in the rearing water when it hosted the mysis with the worst survival rate, *Methylophilaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, and *Vibrionaceae*, previously detected in the first LEfSe on D8 for *Methylophilaceae* and D6 for *Vibrionaceae* and *Pseudoalteromonadaceae*.

Next, we performed a Pearson correlation to determine which factor, hydrochemical parameters or larval stage and status, shaped the biomarkers highlighted with the LEfSe, the most abundant families in the rearing water. The correlogram displayed that the “Mysis Good” condition was not correlated with any family and that the *Cryomorphaceae* were correlated with all factors tested. The “Nauplii Good” condition was positively correlated with the *Marinobacteraceae*, *Alteromonadaceae*, and *Hyphomonadaceae*; however, these families positively correlated with TAN and SRP concentrations, making it difficult to untangle the effect of the nauplii on the rearing water. However, because the *Marinobacteraceae* exhibited a strong coefficient correlation with the nauplii, we suggest that they are linked to the presence of the nauplii in the rearing water. The “Zoea Good” factor was strongly positively correlated with the *Saprospiraceae* and *Thalassospiraceae*, slightly positively correlated with the *Alteromonadaceae*, and negatively correlated with the *Litoricolaceae* and *Vibrionaceae*. Because the *Thalassospiraceae* were slightly positively correlated with TAN and SRP and the *Saprospiraceae* were negatively correlated with SRP, we inferred that both the *Thalassospiraceae* and *Saprospiraceae* were linked to the “Zoea Good” condition. The “Zoea Bad” condition was positively correlated with the *Rhodobacteraceae* and *Litoricolaceae*, families that either did not correlate or slightly correlated with other factors. The “Mysis Bad” condition was slightly positively correlated with the *Microbacteraceae* and the *Vibrionaceae*. The *Microbacteraceae* were also moderately correlated positively with the

CDOM proxy, while the *Vibrionaceae* were greatly correlated positively with both the "Mysis Worst" condition and the CDOM proxy. In addition, the "Mysis Worst" condition had a significant positive correlation with the *Methylophilaceae*, which were also positively correlated with the CDOM proxy. Regarding the correlation coefficient, the *Methylophilaceae* appeared to be linked to the "Mysis Worst" condition. The *Alteromonadaceae* appeared to be positively correlated with increasing TAN and SRP, while the *Vibrionaceae* were positively correlated with increased CDOM ($A\lambda_{325}$ proxy).

DISCUSSION

To explore whether the microbiome of the rearing water was linked to the survival rate of *P. stylirostris* larvae, we tracked the active microbial diversity of the water storage and rearing water of 7 tanks during larval development: 3 with larvae treated with antibiotic, 3 with larvae not treated with antibiotic, and 1 with only water. The meta-analysis aimed to investigate whether specific OTUs were key lineages and whether families could be used as biomarkers of good or bad survival rates. Hydrochemical analyses were also performed to monitor the behavior of the dissolved organic matter, dissolved total nitrogen, and reactive phosphorus throughout the larval rearing.

In shrimp hatcheries worldwide, antibiotics are regularly used for prophylactic purposes (under veterinary advice) or to prevent larval mortality due to pathogenic *Vibrio* species (26, 27). At the Station Aquacole de Saint Vincent shrimp hatchery, erythromycin was added into the rearing water of 3 tanks on day 0 (before nauplii addition) and days 3, 5, 7 and 9 to determine whether it could increase larval survival and larval stage metamorphosis. In this experiment, we evaluated that neither larval development nor larval survival rates were dependent on the addition of antibiotic, likewise for the alpha diversity indices of the microbiota of the rearing water on D1 with the nauplii. This is interesting because erythromycin is known to target a large spectrum of bacteria, inhibit bacterial growth, and exhibit bacteriostatic effect (28). In our case, at least in the water on D1, only the rare biosphere was affected, as less than 3% of the active microbiome was specific to the condition with or without antibiotic. At the time of writing, only one study has examined the effect of antibiotic on the microbiome of the shrimp *Macrobrachium rosenbergii* at the zoea stage (29). The authors showed that the diversity indices did not show any significant differences between the water control and the water in which zoea had been reared during 3 days in the presence of oxytetracycline; this was similar to what we found in our samples on D1. Studies on erythromycin resistance in both bacterial strains and biofilms have shown that several gammaproteobacterial strains are less sensible to erythromycin than other taxa related to the *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, or *Bacteroidetes* (30). This may explain why taxa affiliated with the *Gammaproteobacteria* were more abundant in the rearing water with antibiotic on D1 (Fig. 2 and 3). However, this changed when we considered the whole rearing microbiome because alpha diversity indices were significantly different between the samples with or without antibiotic. This was consistent with the dendrogram and NMDS (Fig. 2). Indeed, both the dendrogram and NMDS grouped all the rearing water samples with antibiotic together into several clusters (with a threshold of 0.5 for cluster 1 in the dendrogram). However, as larval mortalities began to really occur at the Zoea stage on D3 to D4 in all tanks with or without antibiotic, it became difficult to untangle the effect of antibiotic from that of larval mortality on the rearing water microbiome.

Throughout the larval rearing, a global eutrophication of the water was observed compared to that in the control water which remained in the oligotrophic condition. Here, eutrophication was evaluated in the dissolved fraction with CDOM, TAN, and SRP measurements and was mostly due to particles from the larval leftover feed, feces, and exoskeleton as well as dead larvae and absence of water renewal. The CDOM, TAN, and SRP concentrations in the larval tanks were irrespective of antibiotic presence, larval stage, or larval survival rates (Fig. 1). The active microbial diversity dynamic over the rearing period seemed to be linked to the gradual water eutrophication and the larval stages as exhibited by the dendrogram, NMDS (Fig. 2A), LEfSe, and correlogram (Fig. 6A and C). This is linked to an overall increase in the proportion of *Bacteroidia* accompanied by decreases in *Alpha-* and *Gammaproteobac-*

Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs

Microbiota of the Rearing Water of Shrimp Larvae

Microbiology Spectrum

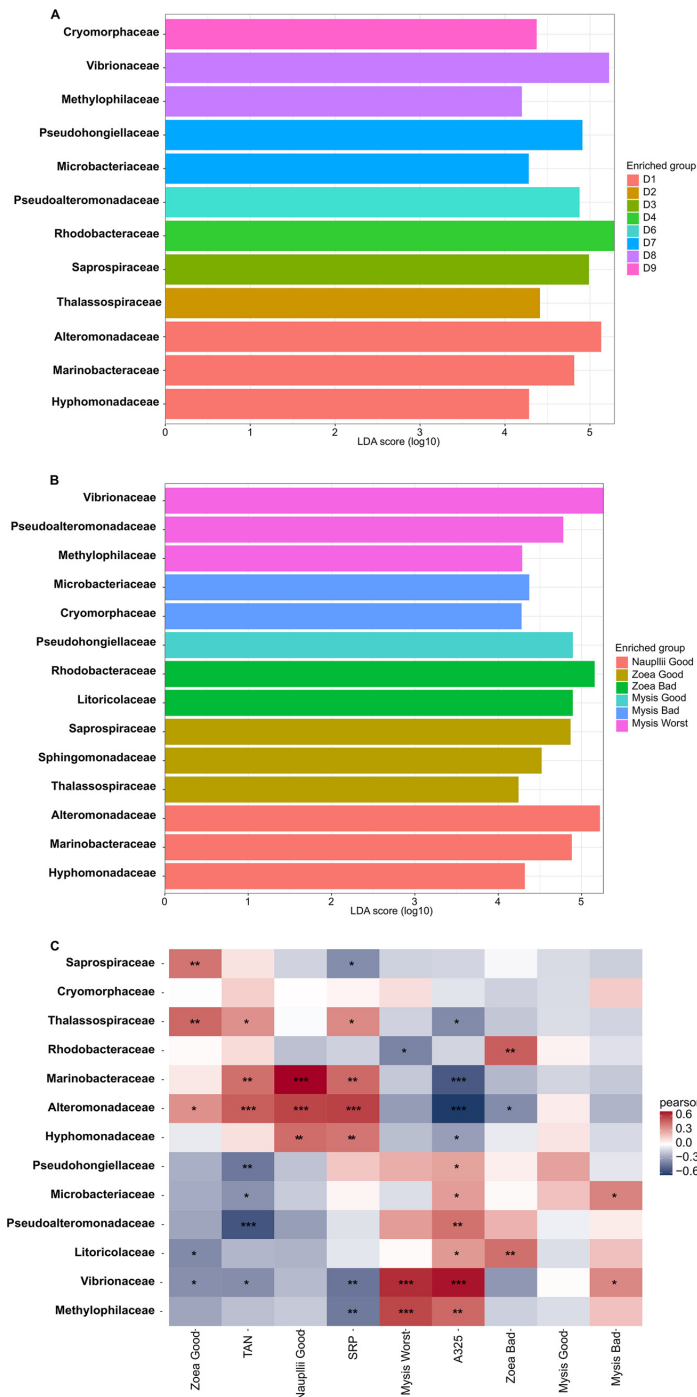


FIG 6 Differentially abundant families according to the rearing day, to the larval growth and survival status; and Pearson correlations between the biomarkers, hydro-chemical parameters of the rearing (Continued on next page)

teria (Fig. 2C); these classes were also predominant in the rearing water of *P. vannamei* (8) and *P. monodon* breeding (9). At the beginning of the experiment, the predominant families were *Alteromonadaceae* and *Marinobacteraceae*, and at the end, it was *Cryomorphaceae*. The fact that the *Alteromonadaceae* were highly represented in the water at the start of the rearing, positively correlated with TAN and SRP concentrations and negatively correlated with the CDOM proxy (Fig. 6C), and were even present in the control water is quite unusual because they are generally found in nutrient-sufficient to nutrient-rich environments (31, 32). This family has been found in one other shrimp larval rearing water, but at lower proportions than in our study (8). In this study, the *Alteromonadaceae* could play a significant role in larval health and/or in carbon biogeochemical cycle in the rearing water by metabolizing and removing some of the labile or semi-labile dissolved organic compounds and by breaking down organic matter molecules (33–35). Members of the family *Cryomorphaceae* are often detected in organic-rich oceanic water (36), so it was not surprising that they encompassed the most lineages at the end of the experiment in the eutrophic water (Fig. 2C and 6A). The relative abundance of the *Rhodobacteraceae* was highly distributed (>10% in most of the samples) during the entire rearing period; this was similar, but at a lower magnitude, to the findings of Zheng et al. 2017 (8). Members of the *Rhodobacteraceae* were found throughout all steps of the rearing process, from the storage water to all samples and even in the control, which was not surprising because *Rhodobacteraceae* has been defined as a keystone lineage in aquatic ecosystems (37). That fits with the suggested significant role of the *Rhodobacteraceae* as keystone taxa in the rearing water proposed by Zheng et al. (8). We have also shown that through the entire rearing, several taxa present in the primary reservoir, so in the lagoon, and in the secondary reservoirs, were not active in some intermediate sampling points and were found back active later in the rearing water highly suggesting a role of the lagoon water composition during the rearing. These data also suggested the activation of certain lineage according to the rearing condition such as the eutrophication of the water, larval development and/or survival (Fig. 5). Then, it appeared that the larval development and health also seemed to drive the dynamic of the active microbiome. In order to distinguish the effect of the rearing conditions hydro-chemical parameters or larval stage and health, on the main families highlighted with the LEfSe, we performed Pearson correlations (Fig. 6). The correlogram shows that the *Alteromonadaceae* and *Vibrionaceae*, respectively, were linked to increased ammonia, nitrogen, and soluble reactive phosphate or to increased colored dissolved organic matter in the rearing water. It also shows that the *Rhodobacteraceae*, for example, were positively correlated with the "Zoea Bad" condition. This contrasts with the keystone role of *Rhodobacteraceae* in the rearing water as described above. However, this correlation was made from both the core microbiome and the LEfSe data, meaning that when we only examined the shared microbiota among the samples, the *Rhodobacteraceae* were statistically enriched in the "Zoea Bad" condition. In addition, one could not deny that, for the entire rearing, the *Rhodobacteraceae* were always present regardless of larval stage or health status, highlighting their significant role.

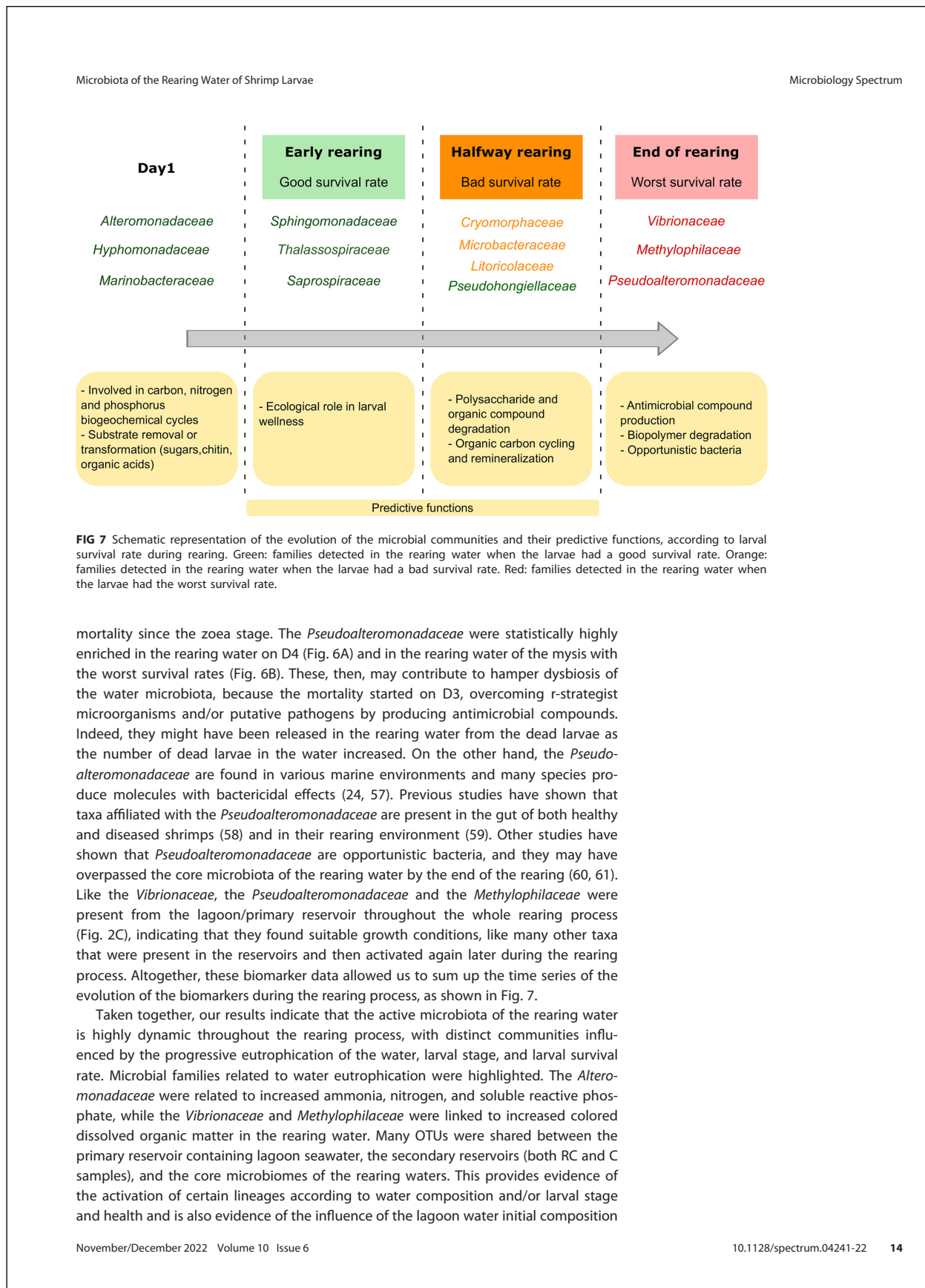
Our hypothesis to understand the mass larval mortality was that a shift in the active microbial diversity of the rearing water could hamper the larvae and lead to high larval mortality. We therefore explored whether biomarkers at the family level were associated with a certain mortality rate at a given larval stage and whether these biomarkers could ultimately be used to monitor larval health. The biomarker investigation revealed the prevalence of the *Hyphomonadaceae*, *Marinobacteraceae* and *Alteromonadaceae* in the "Nauplii Good" condition (Fig. 6B). These 3 families could be involved in the

FIG 6 Legend (Continued)

water and larval growth and survival status. (A) LEfSe (linear discriminant analysis [LDA] effect size) showing the families which were significantly more abundant in the rearing water according to rearing day from days 1 to 9. (B) Family-level biomarkers significantly more abundant in the rearing water according to larval growth and survival status. (C) Correlogram comparing biomarkers at the family level highlighted by LEfSe, with the following hydrochemical parameters: TAN, SRP, and A_{325} (stands for $A_{\lambda 325}$) proxy of the CDOM. Larval growth and survival status: Nauplii Good, Zoea Bad, Zoea Good, Mysis Good, Mysis Bad, and Mysis Worst.

carbon, nitrogen, and phosphorus biogeochemical cycles by removing or transforming various substrates such as sugars, chitin, and organic acid (33–35, 38, 39) during the early stage of rearing. However, the Pearson correlation showed that only the *Marinobacteraceae* were a biomarker related to the “Nauplii Good” condition (Fig. 6C). Two families were found as biomarkers of the “Zoea Good” condition, the *Thalassospiraceae* and the *Saprospiraceae* (Fig. 6B), as also confirmed by the Pearson correlation (Fig. 6C). They seemed to have an important ecological role in larval wellness. Indeed, members of the *Thalassospiraceae* are known to be able to degrade complex carbon sources (40) or hydrocarbon and xenobiotic molecules (41, 42). The “Zoea Bad” condition had 2 biomarkers, the *Litoricolaceae* and the *Rhodobacteraceae*, as shown by the LEfSe and correlogram (Fig. 6B and C). Few data are available on *Litoricolaceae* except that they grow on oligotrophic medium; this could explain why they were prevalent during this stage of rearing (43). Interestingly, it has been shown that marine *Rhodobacteraceae* can produce antibacterial compounds or secondary metabolites that influence both the producing strain and the surrounding microbiota (44). Thus, the *Rhodobacteraceae* might contribute to the beginning of dysbiosis, as the larvae started to die under this condition; by producing antimicrobial compounds, they act on the rearing water microbiota to overcome r-strategist microorganisms and/or putative pathogens. The LEfSe displayed that the *Pseudohongiellaceae* were the biomarker for the “Mysis Good” condition; while the correlogram showed no correlation between any families and the “Mysis Good” condition. So far, *Pseudohongiellaceae* have been detected in the gut of the silver carp fish (45), in marine sediments (46), and in seawater (47). According to the genome annotations of several *Pseudohongiellaceae* species, they can degrade bio-polymers (48). This could explain their enrichment at that point of the rearing, where the mortality rate was still low and did not affect the main families. The biomarkers related to the “Mysis Bad” condition were the *Cryomorphaceae* and the *Microbacteraceae* (Fig. 6B). However, the Pearson correlation showed that only the *Microbacteraceae* were positively correlated with the “Mysis Bad” condition (Fig. 6C). This is surprising because in a previous study by Zheng et al. (8), the *Microbacteraceae* were the main contributors during the post-larval stage of rearing. The “Mysis Worst” condition included 3 biomarkers, *Methylophilaceae*, *Pseudolateromonadaceae*, and *Vibrionaceae*, with the LEfSe (Fig. 7B), while the Pearson correlation showed a strong positive correlation with the *Methylophilaceae* and the *Vibrionaceae*; the latter was also highly positively correlated with the chromophoric dissolved organic matter (Fig. 6C, A₃₂₃). The biomarker *Pseudolateromonadaceae* was also positively correlated with the chromophoric dissolved organic matter (Fig. 6C). The *Methylophilaceae* are methylophilic (49). They have been detected in the gut of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*, where it has been suggested that they help degrade organic matter, reduce the toxic effects of certain intestinal contents, and maintain gut health by influencing the intestinal microbiota (50). In our study, the *Methylophilaceae* might also act to reduce the amount of organic matter in the rearing water, as they were also positively correlated with the CDOM proxy; however, this biomarker exhibited the best correlation with the “Mysis Worst” condition. The *Vibrionaceae* and *Methylophilaceae* were positively correlated with the “Mysis Worst” condition and the CDOM proxy (Fig. 6C). *Vibrios* are often associated with shrimp rearing, either in the rearing water and/or the shrimp microbiome at all life stages, from eggs and larvae to juveniles, adults and broodstock, and in both healthy and diseased shrimps (8, 9, 11, 17, 51). Several *Vibrio* species are known to be shrimp pathogens in shrimp culture (52, 53). In New Caledonia, 2 *Vibrios* are known: *Vibrio nigripulchritudo* (5) and *V. penaeicida* (54). They cause juvenile and adult mass mortality but do not affect larvae (55). In our study, members of the *Vibrionaceae* family were present in all samples from the lagoon/primary reservoir to the control and the rearing water supplemented or not with antibiotic (Fig. 2C). Because many *Vibrio* species are opportunistic bacteria with an r-strategy (56), they might have outcompeted the other communities that were hampered by the unbalanced microbiome of the rearing water due to the larval

Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs



on the larval rearing water microbiome. Biomarkers at the family level were revealed according to a given larval stage, larval health status, and specific microbiome (Fig. 7). This suggests that each larval stage and status condition has its specific microbial signature in the rearing water. In addition, our findings provide evidence of biomarkers which could be used as sentinels to monitor larval health during the early stages of rearing. Indeed, *Marinobacteraceae* were specific to the "Nauplii Good" condition, *Thalassospiraceae* and *Saprospiraceae* to the "Zoea Good," *Litoricolaceae* to the "Zoea Bad," *Microbacteraceae* to the "Mysis Bad," and *Methylophilaceae* to the "Mysis Worst." We eliminated the *Vibrionaceae* as biomarkers of the "Mysis Worst" condition because they had a stronger correlation with dissolved organic matter. The *Microbacteraceae* and *Methylophilaceae* could be potential announcers of upcoming and progressive larval mortality. Indeed, their prevalence and abundance in the rearing water, or even earlier in the lagoon or reservoir, might indicate the future fate of larval rearing. Thus, the highlighted biomarker families might be used as potential early warning sentinels in water storage to infer the evolution of the larval rearing during its early days. Potential future steps could be developed, such as designing PCR or qPCR primers specific to these key lineages to test the lagoon water before rearing and during the early days of rearing. Ultimately, we may eventually be able to manage the active microbiota of the rearing water, which is a major concern in aquaculture (62), and select beneficial microorganisms to improve larval shrimp rearing.

MATERIALS AND METHODS

Larval shrimp rearing. The experiments were carried out in November 2018 in an experimental shrimp hatchery hosted in a shrimp farming research facility at the Station Aquacole de Saint Vincent (Boulouparis, New Caledonia). The reproduction of *P. stylirostris* was performed by artificially inseminating mature females as described by Pham et al. (63). The day after hatching, nauplii were transferred into 100-L rearing tanks at a density of 180 nauplii/L. The water salinity was 35 ppt, the temperature was 30°C, and a 14:10 h day:night photoperiod was applied. From the zoea 1 to zoea 2 stages, larvae were fed with microparticles six times per day and supplemented with frozen *Tetraselmis* sp. twice a day. For larvae from the zoea 3 stage to the post-larvae stage, in addition to microparticles, living *Artemia* sp. nauplii (from 20 to 40 nauplii/larvae/day) were administered twice per day instead of frozen *Tetraselmis* sp. Throughout the 10 days of the larval rearing, there was no water exchange. The seawater was collected from the Saint Vincent Bay (Boulouparis, New-Caledonia) to a primary reservoir through a pumping system with pores of 1 cm. Next, the water was filtered through a sand filter and a 10- μ m filter prior to storage in a secondary reservoir, where it was continuously circulated through a skimmer and a series of 10- and 5- μ m filters over 3 days. The day following the fecundations, the 100-L rearing tanks were filled with water which had passed through a 1- μ m filter and been treated with UV. This water followed the same path as described by Giraud et al. (17). EDTA at 5 g·m⁻³ was added in all tanks. An increasing intensive bubbling was implemented in each tank to allow good oxygenation of the water. The experiment was performed in triplicate for each condition except for the control. Thus, 7 tanks were monitored during the experiment: 3 larval tanks with erythromycin added at 2 ppm a few hours after the EDTA (day 0) and on days 3, 5, 7 and 9; 3 tanks with larvae but without antibiotic; and 1 tank (control) without larvae, antibiotic, or food.

Water sample collection and storage. Prior to the start of the experiment, 1 L of lagoon seawater from the primary reservoir was collected for both chemical and microbial diversity analyses (GR sample). Next, just after being pumped, 1 L of water from the secondary reservoir was collected (RC sample) after an additional 3-day circulation through the skimmer and filters of the secondary reservoir (C sample). The tanks were filled the day after the fecundations and, after addition of EDTA, 1 L was collected in the control tank (sample control, D0). The nauplii were introduced to the tanks on D0 and sample collection began on D1. Throughout the 10 days of the experiment, 1 L of water was collected daily from each tank in the morning before the 1st feeding of the day (6 AM). Samples were collected in opaque containers and immediately kept on ice until filtration. The water samples were filtered through 0.22- μ m sterile membrane filters (S-Pak, MilliporeSigma, Burlington, MA). In order to examine the active microbial diversity, the filters were directly stored at -80°C. The filtrates were distributed and stored accordingly: 50 mL was poured into a pre-combusted (8 h, 450°C) glass bottle for chromophoric dissolved organic matter (CDOM) analysis and kept in the dark until further analysis done within the hour after the sample collection; 40 mL for the total ammonium determination and 40 mL for the soluble reactive phosphate, both stored in acid-washed plastic vials and put at -20°C until analysis. A total of 67 samples were collected throughout the rearing in addition to the 3 storage water samples. The rearing and control waters were named as follows: "control" for samples collected from the control tank; "with" for samples collected from tanks with antibiotic and "without" for those collected from tanks without antibiotic, followed by the sampling day (D0 indicating the day after the fecundation, which corresponds to the day where the nauplii were placed in the rearing tanks; to D9, indicating the 10th day of rearing) and the replicate numbers 1 to 3 corresponding to the triplicates.

Daily determination of the zootechnical parameters: shrimp larval stages and survival rates.

Every day, larval stages and survival rates were determined by examination under a binocular magnifying glass. The Larval Stage Index (LSI) was calculated as follows, based on the equation made by Maddox and Manzi (64) but modified to consider all life stages:

$$LSI = [(0 \times N_n) + [1 \times Z1] + [2 \times Z2] + [3 \times Z3] + [4 \times M1] + [5 \times M2] + [6 \times M3] + [7 \times PL)]/N \quad (1)$$

where N_n is the number of larvae observed during the nauplius stage, Z1 indicates the number observed during the zoea 1 stage, Z2 is zoea 2, Z3 is zoea 3, M1 is mysis 1, M2 is mysis 2, M3 is mysis 3, PL is post-larval 1, and N is the total number of observed larvae (minimum 30). The Larval Survival Rate (LSR) was determined by averaging 3 direct counts of the living and dead larvae in 1 L of rearing water per tank and per day. The LSR was determined as follows: $LSR = 100 \times \text{counted living larvae}/\text{initial number of nauplii}$.

Hydrochemical analysis. The temperature and salinity in each tank were monitored twice a day (morning and afternoon) using the probe pH/Cond 3320 (Mettler Toledo, Columbus, OH). The absorption spectra of the chromophoric dissolved organic matter was recorded directly at wavelengths from 200 to 700 nm at 1-nm intervals using a 10-cm quartz tank and a Shimadzu UV-1800 spectrometer (65). MilliQ water was used as the reference. The absorption coefficients at 325 nm ($A_{\lambda 325}$), which was a proxy for CDOM concentration, were used to describe the evolution of CDOM in the tanks (66). Concentrations of TAN and SRP in the filtered water were analyzed using the methods described by Holmes et al. (67) and Murphy and Riley, respectively (68).

RNA extraction, reverse transcription, sequencing method, and sequence processing. RNAs of the water samples were extracted from the filters using the RNeasy Powerwater kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Then, the RNAs were reverse-transcribed into cDNAs using 10 μ L of RNA (200 ng/ μ L), 1 μ L of the reverse transcriptase M-MLV at 200 u/ μ L (Promega, Madison, WI), 2 μ L random hexamers at 50 μ M, 4 μ L of 5 \times buffer, 2 μ L of a mix of deoxynucleoside triphosphate at 10 mM each, and 1 μ L of RNase/DNase free water. The reverse transcriptions were carried out on a Veriti instrument (Applied Biosystems, Waltham, MA) using the following program: 10 min at 25°C, 2 h at 42°C, and 5 min at 85°C. The cDNAs were stored at -80°C until shipping to MrDNA (Molecular Research LP, Shallowater, TX), where PCR, barcode indexing, and sequencing of the V4 hyper-variable region of the reverse-transcribed bacterial 16S rRNA molecule were conducted. PCRs were performed for each sample using the universal primer combination 515F and 806R (69, 70). The sequencing was performed using Illumina HiSeq technology with 2 \times 300 bp chemistry following MrDNA protocols. The raw prokaryotic 16S rRNA gene sequencing data from HiSeq sequencing were processed using the pipeline Find, Rapidly, OTU with the Galaxy Solution (FROGS) version 2.0.0 (71). In brief, all reads first were trimmed by length and assigned to a specific sample based on barcode recognition using the demultiplex tool in FROGS. Next, the sequences were clustered using the SWARM algorithm with an aggregation distance of 3. Chimeras were removed using the Vsearch algorithm. An additional filtering step for the abundance was used at a threshold of 0.005% (72) to select the most relevant OTU sequences. Taxonomic affiliation was assigned by BLASTn+ using the Silva database 132-16S (73).

Diversity analyses were performed after removing the chloroplast and the mitochondria sequences.

Statistical analyses and Venn diagrams. The alpha diversity, ACE, Chao 1, Shannon, and inverse Shannon indices were calculated for each sample using FROGSSTAT Phyloseq in Galaxy. Mann-Whitney tests were performed using XLSTAT (Addinsoft, Paris, France), a statistic tool appended to Microsoft Excel, on the alpha diversity indices to assess significant differences between the following treatments: rearing water with versus without antibiotic on D1, rearing water versus without antibiotic throughout the rearing, control versus rearing water with antibiotic, and control versus the rearing water without antibiotic. Mann-Whitney tests were also performed to determine the impact of the absence or presence of antibiotic on the chemical values (TAN, SRP, and CDOM) and on larval stages and survival rates. Results with a P value below 0.05 were considered statistically significant. Prior to microbiota analysis, the sequencing data were normalized with the count per million (CPM) method using the edgeR package in R Studio software. Beta diversity was visualized using an agglomerative hierarchical clustering method and an NMDS plot. The dendrogram was built using a Bray-Curtis dissimilarity matrix and the agglomeration method of Ward (74), using the Vegan package (75) in R Studio. The NMDS and Bray-Curtis distances were built using the packages phyloseq (76) and ggplot2 (77) in R Studio. For further statistical analyses, we divided the larval survival rates into 3 groups as follows: good survival rate corresponding to a larval survival rate (LSR) above, equal to, or slightly below the reference (less than 5%) (the reference is an average survival rate calculated for each day using data from 10 years of successful rearing; Ifremer data, Pham, personal communication); bad survival rate corresponding to a larval survival rate between 50% and 100% of the reference value (e.g., an LSR of 60% is a bad survival rate when the reference, on the same day, is at 80%); and worst LSR displaying a survival rate below 50% of the reference value. Several Venn diagrams (78) were constructed using the Jvrenn interactive tool (79) to highlight specific microbial communities and particular patterns specific to given conditions. An initial Venn diagram was made to compare the impact of the antibiotic on the active microbial diversity in the rearing water on D1 with the nauplii before the start of larval mortality. From this diagram, we created a core microbiome of the rearing water hosting the nauplii with a good survival rate. Next, several core microbiomes were constructed specific to the following conditions: corresponding to the water hosting the zoea with a good survival rate (Zoea Good), corresponding to the water with the zoea with a bad survival rate (Zoea Bad), corresponding to the water with the mysis with a good survival rate (Mysis Good), corresponding to the water with the mysis with a bad survival rate (Mysis Bad), and

corresponding to the rearing water with the mysis with a low survival rate (Mysis Worst), were constructed. These 6 core microbiomes were ultimately compared together to highlight a core microbiome of the rearing water present throughout the larval development and also specific microbiomes. These core and specific microbiomes of interest were then compared to the water storage microbiomes to decipher the role of the lagoon water on the rearing process.

The LEfSe (80) was used to identify characteristic biomarkers of a specific condition based on their relative abundances and was performed using the microbiomeMarker package (81) in R Studio. LEfSe was calculated using the OTUs common to all rearing water samples to identify biomarkers common to specific conditions. A threshold of 4 was used for the logarithmic LDA score for discriminative features and a *P* value of 0.05 was set for the Kruskal-Wallis tests between the conditions. Then, a correlogram was built between the families identified in the LEfSe, the hydrochemical parameters, and the growth and health status of the larvae present in the rearing water (Nauplii Good, Zoea Good, Zoea Bad, Mysis).

Data availability. The data sets generated and analyzed for this study can be found in the NCBI SRA repository under the BioProject ID [PRJNA736535](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA736535) (SRA accession no. [SRR1733342](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/SRR1733342) to [SRR1733348](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/SRR1733348)).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the SASV teams for their indubitable help during the experiment, especially their zootechnical and laboratory support. We especially thank Jean-Sébastien Lam for his precious help in the hatchery and Florence Antypas, Marie-Madeleine Le Gall and Mélanie Sérusier for their valuable contribution to the daily sample filtration, storage for further analyses, and CDOM measurement. We also thank Anthony Muselli for his help with figure shaping and editing.

This work was supported by the RESSAC project (LEAD-NC, Ifremer, New Caledonia) within the framework agreement with the New Caledonian Provinces and the Government.

We declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

N.C., V.B., N.W., and D.P. conceived and designed the experiment. N.C., V.B., M.B., D.A., B.V., J.-R.M., N.W., and D.P. performed the experiment and acquired the data. N.C., V.B., C.G., M.B., N.W., and D.P. analyzed the data. N.C. prepared the figures and drafted the manuscript. N.C., V.B., C.G., N.W., and D.P. reviewed the draft. All authors approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Pajares S, Ramos R. 2019. Processes and microorganisms involved in the marine nitrogen cycle: knowledge and gaps. *Front Mar Sci* 6:739. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00739>.
2. Jiao N, Herndl GJ, Hansell DA, Benner R, Kattner G, Wilhelm SW, Kirchman DL, Weinbauer MG, Luo T, Chen F, Azam F. 2010. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Microbiol* 8:593–599. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2386>.
3. Ying C, Chang MJ, Chang YT, Chao WL, Yeh SL, Hsu JT. 2020. Photosynthetic bacteria enhanced water quality and integrity of microbial community composition of integrated multitrophic aquaculture system of milkfish *Chanos chanos* coastal farming. *Fish Sci* 86:329–338. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01387-z>.
4. Ganguly S, Prasad A. 2012. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Rev Fish Biol Fisheries* 22:11–16. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9214-x>.
5. Goarant C, Reynaud Y, Ansqeur D, de Decker S, Saulnier D, Le Roux F. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst Appl Microbiol* 29:570–580. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.005>.
6. Carbone D, Faggio C. 2016. Importance of probiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol* 54:172–178. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.011>.
7. Wei H, Li X, Tang L, Yao H, Ren Z, Wang C, Mu C, Shi C, Wang H. 2020. 16S rRNA gene sequencing reveals the relationship between gut microbiota and ovarian development in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Chemosphere* 254:126891. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126891>.
8. Zheng Y, Yu M, Liu J, Qiao Y, Wang L, Li Z, Zhang XH, Yu M. 2017. Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Front Microbiol* 8:1362. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01362>.
9. Angthong P, Uengwetwanit T, Arayamethakorn S, Chaitongsakul P, Karoonuthaisiri N, Rungrasamee W. 2020. Bacterial analysis in the early developmental stages of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Sci Rep* 10:4896. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61559-1>.
10. Sun F, Wang Y, Wang C, Zhang L, Tu K, Zheng Z. 2019. Insights into the intestinal microbiota of several aquatic organisms and association with the surrounding environment. *Aquaculture* 507:196–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.026>.
11. Wang Y, Wang K, Huang L, Dong P, Wang S, Chen H, Lu Z, Hou D, Zhang D. 2020. Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome* 8:106. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00879-w>.
12. Bakke I, Coward E, Andersen T, Vadstein O. 2015. Selection in the host structures the microbiota associated with developing cod larvae (*Gadus morhua*). *Environ Microbiol* 17:3914–3924. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12888>.
13. Zhang Z, Li D, Xu W, Tang R, Li L. 2019. Microbiome of co-cultured fish exhibits host selection and niche differentiation at the organ scale. *Front Microbiol* 10:2576. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02576>.
14. Pratte ZA, Besson M, Hollman RD, Stewart FJ. 2018. The gills of reef fish support a distinct microbiome influenced by host-specific factors. *Appl Environ Microbiol* 84:e00063-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00063-18>.

Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs

15. Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, Heilig H, Benvenuti G, Verreth J, Verdegem M. 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci Rep* 5:18206–18215. <https://doi.org/10.1038/srep18206>.
16. Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Forberg T, Olsen Y, Verdegem M, Giatsis C, Skjermo J, Aasen IM, Gatesoupe FJ, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. 2018. Managing the microbial community of marine fish larvae: a holistic perspective for larviculture. *Front Microbiol* 9:1820. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01820>.
17. Giraud C, Callac N, Beauvais M, Mailliez J-R, Ansquer D, Selmaoui-Folcher N, Pham D, Wabete N, Boulo V. 2021. Potential lineage transmission within the active microbiota of the eggs and the nauplii of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: possible influence of the rearing water and more. *PeerJ* 9:e12241. <https://doi.org/10.7717/peerj.12241>.
18. Huang F, Pan L, Song M, Tian C, Gao S. 2018. Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 8585–8598. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9229-5>.
19. Bhute SS, Ghaskadbi SS, Shouche YS. 2017. Rare biosphere in human gut: a less explored component of human gut microbiota and its association with human health, p 133–142. *In* Mining of microbial wealth and Meta-Genomics. Springer Singapore, Gateway East, Singapore.
20. Ziegler M, Eguiluz VM, Duarte CM, Voolstra CR. 2018. Rare symbionts may contribute to the resilience of coral-algal assemblages. *ISME J* 12:161–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.151>.
21. Cheaib B, Seghouani H, Llewellyn M, Vandal-Lenghan K, Mercier P-L, Derome N. 2021. The yellow perch (*Perca flavescens*) microbiome revealed resistance to colonisation mostly associated with neutralism driven by rare taxa under cadmium disturbance. *Anim Microbiome* 3:3. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00063-3>.
22. Jousset A, Bienhold C, Chatzinotas A, Gallien L, Gobet A, Kurm V, Küsel K, Rillig MC, Rivett DW, Salles JF, Van Der Heijden MGA, Youssef NH, Zhang X, Wei Z, Hol GWH. 2017. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME J* 11:853–862. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.174>.
23. Pester M, Bittner N, Deevong P, Wagner M, Loy A. 2010. A 'rare biosphere' microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland. *ISME J* 4: 1591–1602. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.75>.
24. Pham D, Ansquer D, Chevalier A, Dauga C, Peyramale A, Wabete N, Labreuche Y. 2014. Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. *Aquaculture* 432:475–482. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.031>.
25. Beliaeff B, Chim L, Della Patrona L, Goyard E, Herlin J, Labreuche Y, Walling E, Ansquer D, Brun P, Castex M, Coatanea D, Courties C, De Lorgeril J, Dufour R, Frappier J, Goarant C, Huber M, Lemaire P, Lemonnier H, Le Roux F, Loubersac L, Lucas R, Patrois J, Peignon J-M, Pham D, Ramage Y, Soulard B, Vic M, Vourey E, Wabete N. 2009. DEDUCTION: a research project for shrimp farming sustainability in New Caledonia.
26. Holmström K, Gräslund S, Wahlström A, Pongshompoo S, Bengtsson BE, Kautsky N. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int J Food Sci Tech* 38: 255–266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x>.
27. Aftabuddin S, Kader A, Kamal AM, Zafar M. 2009. Present status on the use of antibiotics and grow-out ponds and their environmental implications in Bangladesh. *AAAL Bioflux* 2:369–380.
28. Griffith RS, Black HR. 1970. Erythromycin. *Med Clin North Am* 54:1199–1215. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)32587-1](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)32587-1).
29. Ma R, Wang Y, Zhao L, Zhou J, Zhao S, Li X, Dai X, Fang W. 2020. Exploration of the death causes in zoea stages of *Macrobrachium rosenbergii* based on microbial diversity analysis. *Aquaculture* 519:734710. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734710>.
30. Moskot M, Kottarska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Gabig-Cimińska M, Fari K, Węgrzyn G, Wróbel B. 2012. Metal and antibiotic resistance of bacteria isolated from the Baltic Sea. *Int Microbiol* 15:131–139. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.166>.
31. López-Pérez M, Rodríguez-Valera F. 2014. The family Alteromonadaceae, p 69–92. *In* Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (ed), *The prokaryotes: Gammaproteobacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Germany.
32. Maki T, Lee KC, Pointing SB, Watanabe K, Aoki K, Archer SDJ, Lacap-Bugler DC, Ishikawa A. 2021. Desert and anthropogenic mixing dust deposition influences microbial communities in surface waters of the western Pacific Ocean. *Sci Total Environ* 791:148026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148026>.
33. Gómez-Consarnau L, Needham DM, Weber PK, Fuhrman JA, Mayali X. 2019. Influence of light on particulate organic matter utilization by attached and free-living marine bacteria. *Front Microbiol* 10:1204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01204>.
34. Pedler BE, Aluwihare LI, Azam F. 2014. Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:7202–7207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401887111>.
35. McCarren J, Becker JW, Repeta DJ, Shi Y, Young CR, Malmstrom RR, Chisholm SW, DeLong EF. 2010. Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16420–16427. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010732107>.
36. Bowman JP, McMeekin TA. 2015. *Alteromonadaceae*. *In* Trujillo ME, Dedysh S, DeVos P, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey FA, Whitman WB (ed), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY.
37. Banerjee S, Schlaeppi K, van der Heijden MGA. 2018. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nat Rev Microbiol* 16: 567–576. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>.
38. Varela MM, Rodríguez-Ramos T, Guerrero-Feijóo E, Nieto-Cid M. 2020. Changes in activity and community composition shape bacterial responses to size-fractionated marine DOM. *Front Microbiol* 11:586148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586148>.
39. Stephens BM, Opalk K, Petras D, Liu S, Comstock J, Aluwihare LI, Hansell DA, Carlson CA. 2020. Organic matter composition at ocean station papa affects its bioavailability, bacterioplankton growth efficiency and the responding taxa. *Front Mar Sci* 7:10.3389/fmars.2020.590273. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.590273>.
40. McLroy SJ, Nielsen PH. 2014. The family *Saprosiraceae*, p 863–889. *In* *The prokaryotes: other major lineages of bacteria and the archaea*. Springer Science and Business Media, Berlin, Germany.
41. Zhao B, Wang H, Li R, Mao X. 2010. *Thalassospira xianhensis* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1125–1129. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013201-0>.
42. Nogi Y, Yoshizumi M, Miyazaki M. 2014. *Thalassospira povallyitica* sp. nov., a polyvinyl-alcohol-degrading marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1149–1153. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058321-0>.
43. Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. 2013. *The prokaryotes: Gammaproteobacteria*. Springer Publishing, New York, NY.
44. Henriksen NNSE, Lindqvist LL, Wibowo M, Sonnenschein EC, Bentzon-Tilia M, Gram L. 2022. Role is in the eye of the beholder: the multiple functions of the antibacterial compound tropodithetic acid produced by marine *Rhodobacteraceae*. *FEMS Microbiol Rev* 46:fuac007. <https://doi.org/10.1093/femsrev/fuac007>.
45. Khurana H, Sharma M, Bharti M, Singh DN, Negi RK. 2021. Gut milieu shapes the bacterial communities of invasive silver carp. *Genomics* 113:815–826. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.013>.
46. Li A-Z, Han X-B, Zhang M-X, Zhou Y, Chen M, Yao Q, Zhu H-H. 2019. Culture-dependent and -independent analyses reveal the diversity, structure, and assembly mechanism of benthic bacterial community in the Ross Sea, Antarctica. *Front Microbiol* 10:2523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02523>.
47. Nowinski B, Smith CB, Thomas CM, Esson K, Marin R, Preston CM, Birch JM, Scholin CA, Huntemann M, Clum A, Foster B, Foster B, Roux S, Palaniappan K, Varghese N, Mukherjee S, Reddy TBK, Daum C, Copeland A, Chen I-MA, Ivanova NN, Kyrpides NC, Glavina del Rio T, Whitman WB, Kiene RP, Eløe-Fadros EA, Moran MA. 2019. Microbial metagenomes and metatranscriptomes during a coastal phytoplankton bloom. *Sci Data* 6: 129. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0132-4>.
48. Francis B, Ulrich T, Mikolasch A, Teeling H, Amann R. 2021. North Sea spring bloom-associated *Gammaproteobacteria* fill diverse heterotrophic niches. *Environ Microbiome* 16:15. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00385-y>.
49. Chistoserdova L. 2011. Modularity of methylotrophy, revisited. *Environ Microbiol* 13:2603–2622. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02464.x>.
50. Sun Y, Rabbi MH, Ma S, Wen Z, Li X, Mi R, Meng N, Li Y, Wang Q, Du X, Ren T. 2021. Effect of dietary *Cordyceps* polysaccharide supplementation on intestinal microflora and immune response of *Apostichopus japonicus*. *Aquac Res* 52:5198–5212. <https://doi.org/10.1111/are.15389>.
51. Vandenbergh J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivero G, Bolland A, Balladares M, Gomez-Gil B, Calderon J, Sorgeloos P, Swings J. 1999. *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol* 65:2592–2597. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2592-2597.1999>.

52. Kumar R, Ng TH, Wang H. 2020. Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Rev Aquacult* 12:1867–1880. <https://doi.org/10.1111/raq.12414>.
53. Zhang X-H, He X, Austin B. 2020. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Mar Life Sci Technol* 2:231–245. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>.
54. Goarant C, Merien F. 2006. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. *J Microbiol Methods* 67:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.013>.
55. Goarant C, Régnier F, Brizard R, Marteau A-L. 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* 169:291–296. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00380-9).
56. Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Olsen Y. 2018. K-selection as microbial community management strategy: a method for improved viability of larvae in aquaculture. *Front Microbiol* 9:2730. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02730>.
57. Sorieul L, Rückert C, Al-Dilaimi A, Winkler A, Kalinowski J, Pham D, Wabete N, Boulo V. 2019. Whole-genome sequence of *Pseudoalteromonas* sp. NC201, a probiotic strain for *Litopenaeus stylirostris* hatcheries in New Caledonia. *Microbiol Resour Announc* 8:e00477-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00477-19>.
58. Xiong J, Dai W, Qiu Q, Zhu J, Yang W, Li C. 2018. Response of host-bacterial colonization in shrimp to developmental stage, environment and disease. *Mol Ecol* 27:3686–3699. <https://doi.org/10.1111/mec.14822>.
59. Huang L, Guo H, Chen C, Huang X, Chen W, Bao F, Liu W, Wang S, Zhang D. 2020. The bacteria from large-sized bioflocs are more associated with the shrimp gut microbiota in culture system. *Aquaculture* 523:735159. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735159>.
60. Tamburini C, Garel M, Barani A, Boeuf D, Bonin P, Bhairy N, Guasco S, Jacquet S, Le Moigne FAC, Panagiotopoulos C, Riou V, Veloso S, Santinelli C, Armougom F. 2021. Increasing hydrostatic pressure impacts the prokaryotic diversity during *Emiliana huxleyi* aggregates degradation. *Water (Switzerland)* 13:2616. <https://doi.org/10.3390/w13192616>.
61. Lydon KA, Lipp EK. 2018. Taxonomic annotation errors incorrectly assign the family *Pseudoalteromonadaceae* to the order *Vibrionales* in GreenGenes: implications for microbial community assessments. *PeerJ* 6:5248. <https://doi.org/10.7717/peerj.5248>.
62. Rurangwa E, Verdegem MCJ. 2015. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Rev Aquacult* 7:117–130. <https://doi.org/10.1111/raq.12057>.
63. Pham D, Charmantier G, Wabete N, Boulo V, Broutoi F, Mailliez JR, Peignon JM, Charmantier-Daures M. 2012. Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture* 362–363:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.026>.
64. Maddox MB, Manzi JJ. 2009. The effects of algal supplements on static system culture of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) larvae 1, 2. *World Aquaculture Soc J* 7:677–698. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1976.tb00096.x>.
65. Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K. 2009. Erratum: absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter (*Limnology and Oceanography* 53 955–969). *Limnol Oceanogr* 54:1023. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.3.1023>.
66. Sadeghi-Nassaj SM, Catalá TS, Álvarez PA, Reche I. 2018. Sea cucumbers reduce chromophoric dissolved organic matter in aquaculture tanks. *PeerJ* 6:e4344. <https://doi.org/10.7717/peerj.4344>.
67. Holmes RM, Aminot A, Kérouel R, Hooker BA, Peterson BJ. 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Can J Fish Aquat Sci* 56:1801–1808. <https://doi.org/10.1139/f99-128>.
68. Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).
69. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000801107>.
70. Hugerth LW, Wefer HA, Lundin S, Jakobsson HE, Lindberg M, Rodin S, Engstrand L, Andersson AF. 2014. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 80:5116–5123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>.
71. Escudé F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.
72. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 10:57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>.
73. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
74. Ward JHJ. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Am Stat Assoc* 58:236–244. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>.
75. Oksanen J. 2022. Package “vegan” Title Community Ecology Package.
76. McMurdie PJ, Holmes S. 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8: e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
77. Wickham H, Chang W. 2016. Package ggplot2: an implementation of the grammar of graphics.
78. Shade A, Handelsman J. 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* 14:4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>.
79. Bardou P, Mariette J, Escudé F, Djemiel C, Klopp C. 2014. SOFTWARE Open Access jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15: 293. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>.
80. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12: R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
81. Cao Y. Tools for microbiome marker identification. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3749415>.

VI.3- Article 5 – Microbial biomarker detection in shrimp larvae rearing water as putative biosurveillance proxies in shrimp aquaculture

PeerJ

Manuscript to be reviewed

1 **Microbial biomarker detection in shrimp larvae rearing water as putative bio-**
2 **surveillance proxies in shrimp aquaculture**

3

4 Nolwenn Callac¹, Carolane Giraud^{1,2}, Viviane Boulo^{1,3}, Nelly Wabete¹, Dominique Pham¹

5

6 ¹Ifremer, IRD, Université de la Nouvelle-Calédonie, Université de La Réunion, CNRS, UMR
7 9220 ENTROPIE, 101 Promenade Roger Laroque, 98897, Nouméa, New Caledonia.

8 ²University of New Caledonia, Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA), Nouméa,
9 New Caledonia.

10 ³Present address: IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan via
11 Domitia, Montpellier, France.

12

13 Corresponding Author:

14 Nolwenn Callac

15 Station Aquacole de Saint Vincent

16 98812 Boulouparis

17 New-Caledonia

18 Email address: nolwenn.callac@ifremer.fr

19

20

21 **Abstract**

22 **Background:** Aquacultured animals are reared in water hosting various microorganisms with
23 which they are in close relationships during their whole lifecycle as some of these
24 microorganisms can be involved in their host's health or physiology. In aquaculture hatcheries,
25 understanding the interactions existing between the natural seawater microbiota, the rearing
26 water microbiota, the larval stage and the larval health status, may allow the establishment of
27 microbial proxies to monitor the rearing ecosystems. Indeed, these proxies could help to define
28 the optimal microbiota for shrimp larval development and could ultimately help microbial
29 management.

30 **Methods:** In this context, we monitored the daily composition of the active microbiota of the
31 rearing water in a hatchery of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris*. Two distinct rearing
32 conditions were analyzed; one with antibiotics added to the rearing water and one without
33 antibiotics. During this rearing, healthy larvae with a high survival rate and unhealthy larvae with
34 a high mortality rate were observed. Using HiSeq sequencing of the V4 region of the 16S rRNA

35 gene of the water microbiota, coupled with zootechnical and statistical analysis, we aimed to
36 distinguish the microbial taxa related to high mortality rates at a given larval stage.
37 **Results:** We highlight that the active microbiota of the rearing water is highly dynamic whatever
38 the larval survival rate. A clear distinction of the microbial composition is shown between the
39 water harboring healthy larvae reared with antibiotics *versus* the unhealthy larvae reared without
40 antibiotics. However, it is hard to untangle the effects of the antibiotic addition and of the larval
41 death on the active microbiota of the rearing water. Various active taxa of the rearing water are
42 specific to a given larval stage and survival rate except for the zoea with a good survival rate.
43 Comparing these communities to those of the lagoon, it appears that many taxa were originally
44 detected in the natural seawater. This highlights the great importance of the microbial
45 composition of the lagoon on the rearing water microbiota. Considering the larval stage and
46 larval survival we highlight that several genera: *Nautella*, *Leisingera*, *Ruegeria*, *Alconivorax*,
47 *Marinobacter* and *Tenacibaculum*, could be beneficial for the larval survival and may, in the
48 rearing water, overcome the r-strategist microorganisms and/or putative pathogens. Members of
49 these genera might also act as probiotics for the larvae. While *Marivita*, *Aestuariicoccus*,
50 HIMB11 and *Nioella*, appeared to be unfavorable for the larval survival and could be associated
51 with upcoming and occurring larval mortalities. All these specific biomarkers of healthy or
52 unhealthy larvae, could be used as early routine detection proxies in the natural seawater and
53 then during the first days of larval rearing, and might help to manage the rearing water
54 microbiota and to select beneficial microorganisms for the larvae.

55

56 **Introduction**

57 In New-Caledonia, hatcheries of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* face high larval
58 mortality rates (Beliaeff et al., 2009; Pham et al., 2012). The causes of such mortalities are not
59 yet understood and multi-factorial reasons seem to trigger larval death. For example, only 128
60 million post larvae were produced in 2019; while the production had reached up to 167 million
61 post larvae in 2005 ([https://www.isee.nc/economie-entreprises/entreprises-secteurs-d-](https://www.isee.nc/economie-entreprises/entreprises-secteurs-d-activites/agriculture-peche-aquaculture)
62 [activites/agriculture-peche-aquaculture](https://www.isee.nc/economie-entreprises/entreprises-secteurs-d-activites/agriculture-peche-aquaculture), section *Les structures aquacoles et maritimes*). These larval
63 mortalities create many issues, as not enough post larvae are available to be spread among the
64 earthen ponds of the 18 farms of the territory, where they grow until they reach a certain weight
65 to be sold. This induces a commercial deficit and an economical loss for the farmers, the workers

66 and the territory. Several factors, such as water quality or bacterial infections, could play a role
67 in the larval mortalities but these hypotheses have been denied. Indeed, no known pathogen was
68 found, and various larval survival rates can be observed among larvae reared under the same
69 conditions in the same rearing water. However, we think that dysbiosis of the rearing water
70 microbiota could hamper the larval survival. Indeed, aquacultured animals are reared in water
71 hosting various microorganisms with which they are in close relationships during their whole
72 lifecycle as some of these microorganisms can be involved in their host's health, physiology and
73 fitness (Goarant et al., 2006; Ganguly & Prasad, 2012; Carbone & Faggio, 2016; Zheng et al.,
74 2017; Sun et al., 2019; Wei et al., 2020; Wang et al., 2020b; Angthong et al., 2020). It has been
75 shown that the rearing water microbiota could influence pre-feeding fish larvae (Bledsoe et al.,
76 2016; Wilkes Walburn et al., 2019) and may contribute to larval health in cod larvae (Lauzon et
77 al., 2010). Regarding shrimps, it has been proved that the rearing water microbiota can interact
78 with the shrimps and that some microbial taxa originating from the water can be transmitted to
79 the host microbiota at various lifecycle stages (Huang et al., 2018; Giraud et al., 2021). Thus, in
80 order to establish microbial proxies to monitor the rearing ecosystems in shrimp hatcheries, it
81 seems necessary to uncover the interactions existing between the natural seawater microbiota,
82 the rearing water microbiota, the larval stage and the larval health status. To date, a few studies
83 have been conducted on both diseased and healthy *Penaeus vannamei* shrimps at various
84 lifecycle stages. In these studies, the authors managed to establish links between the microbial
85 communities and the health status of the shrimp, and also identified bacterial indicators of
86 diseased shrimps (Xiong, Zhu & Zhang, 2014; Zheng et al., 2017). However rearing methods of
87 *P. vannamei* and *P. stylirostris* larvae slightly differ. Indeed, *P. vannamei* larvae are reared in
88 oceanic water using both probiotics and antibiotics while, in New-Caledonia, larval rearing is
89 performed using lagoon seawater and antibiotics are often only added until post-larval stage
90 (Pham et al., 2012; Zheng et al., 2017). Thus, in order to overcome the larval deficit in New-
91 Caledonia, it is imperative to establish microbial proxies to monitor the rearing ecosystems and
92 to distinguish taxa that seem beneficial to larval health. Such data will ultimately help microbial
93 management in shrimp hatcheries.

94 To this aim, we have monitored daily the microbial composition of the rearing water, containing
95 larvae raised with or without antibiotics, to investigate if any microbial families were associated
96 with a certain mortality rate at a given larval stage. We also investigated if the antibiotic addition

97 and the natural seawater microbiota influenced the active microbial communities inhabiting the
98 rearing water.

99 In the context of this study, we identified several specific biomarkers of a given larval stage and
100 health, that might be used as early routine detection proxies in the natural seawater and then
101 during the first days of larval rearing.

102

103 **Materials & Methods**

104 **Study design, water collection and storage**

105 The study was conducted in an experimental shrimp hatchery hosted in a shrimp farming
106 research facility at the Station Aquacole de Saint Vincent (Boulouparis, New-Caledonia). The
107 experiment was carried out in February 2019, where seawater from the water storages, the larval
108 rearing tanks and the control tank were collected during the same larval rearing cycle. Tanks in
109 the hatchery were filled with natural seawater collected from the Saint Vincent Bay. Natural
110 seawater was pumped through a 1cm pore size device into a primary reservoir (ResI). Seawater
111 was then filtered through a 10µm filter prior to storage into a 2m³ storage container implemented
112 with intensive bubbling (ResII). In New Caledonia, the reproduction of *Penaeus stylirostris* is
113 conducted by artificially inseminating mature females, as described by Pham et al. (2012). The
114 day these inseminations were performed, the hatchery tanks were filled with storage seawater in
115 which 5 g.m⁻³ of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) were added and intensive bubbling
116 was implemented in all the tanks including the control tank that contained no larvae, antibiotics
117 nor food addition. Each tested condition was carried out in triplicates except for the control. One
118 control tank, three larval tanks without antibiotics addition and three larval tanks with
119 erythromycin (antibiotic) addition were considered. In the latter, 2 ppm of erythromycin were
120 added on Day 0 (D0) after EDTA addition and then on days 3, 5, 7 and 9. The larval feeding
121 protocol was as follow: from zoea 1 to zoea 2, microparticles were added five times per day and
122 frozen *Tetraselmis* sp. were given once a day; from zoea 3 to post larvae, microparticles were
123 added twice a day and living *Artemia* sp. nauplii (between 20 to 40 nauplii/larvae/day) twice a
124 day. No water exchange was applied during the first 10 days of the larval rearing.
125 Natural seawater from the primary reservoir was sampled before the insemination and seawater
126 from the storage container was sampled on the insemination day; while samples from the rearing
127 tanks were collected daily during 9 days, before the first feeding of the day. All the water

128 samples were collected using a 100µm mesh to avoid any larvae on the filter used for the RNAs
129 extractions. For each sample, 1L of water was filtered on 0.2µm sterile membrane filters (S-Pak,
130 Millipore). All filters were stored at -80°C until RNA extractions.

131

132 **Daily determination of the zootechnical parameters**

133 Daily larval survival rates were estimated by counting the number of larvae contained in three
134 distinct sub-samples of 100 mL per tank. The larval stages were determined by the observation
135 of 30 larvae per tank using a binocular magnifying glass. This allowed the calculation of the
136 Larval Stage Index (LSI), using the modified equation of Maddox and Manzi (Maddox & Manzi,
137 1976):

$$138 \text{ LSI} = (0 \times \text{Nii} + 1 \times \text{Z1} + 2 \times \text{Z2} + 3 \times \text{Z3} + 4 \times \text{M1} + 5 \times \text{M2} + 6 \times \text{M3} + 7 \times \text{XPL}) / \text{N}$$

139 where Nii is the number of larvae observed in the nauplius stage, Z1 in the zoea 1 stage, Z2 in
140 zoea 2, Z3 in zoea 3, M1 in mysis 1, M2 in mysis M2, M3 mysis M3, PL in post larvae 1; and N
141 corresponds to the total number of observed larvae. The Larval Survival Rate (LSR) was defined
142 by averaging 3 direct counts of the living and dead larvae in 1L of rearing water per tank and per
143 day. The LSR was determined as follow LSR: $100 \times (\text{counted living larvae} / \text{initial number of}$
144 $\text{nauplii})$.

145

146 **RNA extractions, reverse transcriptions, sequencing and sequence processing**

147 RNA extractions were performed using the RNAeasy Powerwater kit (Qiagen) following the
148 manufacturer's information. RNA purity and concentration were checked with NanoDrop™
149 measurements. Then, the total RNAs were reverse transcribed into complementary DNA
150 (cDNAs) using 10 µL of RNA (200 ng/µl), 1 µl of the reverse transcriptase M-MLV at 200 u/µl
151 (PROMEGA), 2 µl random hexamers 50 µM, 4 µl of Buffer 5X, 2 µl of a mix of dNTP a 10 mM
152 each and 1 µl of Rnase/Dnase free water. All the reverse-transcriptions were carried out in a
153 Veriti™ instrument (Applied Biosystems), using the program: 10 min at 25°C, 2 h at 42°C and 5
154 min at 85°C. The cDNAs were stored at -80°C until shipping to MrDNA (Molecular Research
155 LP, Shallowater, Texas, United States) where the PCR, barcode indexing and sequencing of the
156 V4 hypervariable region of the 16S rRNA molecule were conducted using the universal primer
157 combination 515f-806R (Caporaso et al., 2011; Hugerth et al., 2014). An Illumina HiSeq
158 sequencing was performed using MrDNA protocols with a 2 x 150 bp paired-end run and an

159 average sequencing depth of 20k raw reads per sample. As described in Giraud et al, 2021, the
160 raw data were first demultiplexed using the fastqSplitter available on the MrDNA website
161 (<https://www.Mrdnlab.com/mrdnafreesoftware/fastq-splitter.html>) (Giraud et al., 2021). Then,
162 the reads were treated using the DADA2 (Callahan et al., 2016) package available in the Rstudio
163 software. We kept all the reads with a quality score above 30. The sequences were filtered using
164 a maximum expected error (maxEE) set at 2, a maximum N (maxN) set at 0, and a truncation
165 based on quality scores (truncQ) set at 2. The sample inference was done by setting the “pool”
166 argument to true. The chimeras were removed using the consensus method. The taxonomy was
167 assigned using the Silva 138 SSU Ref NR99 database (Quast et al., 2013). Once the ASV table
168 was obtained, sequences with no affiliation or affiliated to the Eukaryota, Mitochondria or
169 Chloroplasts were removed before further analysis. All the 16S rRNA data are available in the
170 NCBI SRA repository (BioProject ID PRJNA736535, SRP324193 for all the sample except ResI
171 sample available in SRP14825206).

172

173 **Downstream microbial analysis**

174 The alpha diversity was estimated with the Chao 1, Shannon and Inverse Simpson (InvSimpson)
175 indexes using the phyloseq package in RStudio (McMurdie & Holmes, 2013), while the Good's
176 coverage was estimated using RStudio. The rarefaction curves were built using the Vegan
177 package in Rstudio (Jari Oksanen, 2022).

178 Before further microbial analysis, the ASV table was normalized with the Count Per Million
179 (CPM) method using the edgeR package under the RStudio software. The beta diversity was
180 determined by constructing a PCoA based on a Bray-Curtis dissimilarity matrix and the Ward
181 method using phyloseq packages (McMurdie & Holmes, 2013) in Rstudio. Clusters were
182 determined by the construction of ellipses using a confidence level for a multivariate t-
183 distribution set at 80%.

184 Prior to Venn diagram constructions, we established 5 groups of rearing water samples based on
185 the larval stage: nauplii, zoea or mysis; and on the larval survival rate: good or bad. We
186 considered a good larval survival rate when the daily larval counting was above, equal or slightly
187 below the reference (less than 5% in order to mitigate putative counting errors) (the reference is
188 an average of survival rates calculated for each rearing day using data of 10 years of successful
189 data; Ifremer data, Pham comm. pers.). The 5 final defined groups were the nauplii (Nauplii), the

190 zoea with a good survival rate (later named Zoea Good), the zoea with a bad survival rate (Zoea
191 Bad), the mysis with a good survival rate (Mysis Good) and the mysis with a bad survival rate
192 (Mysis Bad). Venn diagrams were then constructed using the Jvenn web application (Bardou et
193 al., 2014) (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/example.html>). In order to identify microbial
194 biomarkers, Linear Discriminant Analysis (LDA) effect size (LEfSe) (Segata et al., 2011) were
195 performed with a threshold set at 4 using the microbiomeMarker package (Cao et al., 2022) in
196 RStudio.

197

198 **Results**

199 **Zootechnical parameters**

200 Contrasting survival rates were observed between the two treatments after D1 (Fig. 1). Larvae
201 reared with antibiotics showed the best survival rates on D9 with more than 70% of surviving
202 larvae, which is similar to the reference value on this rearing day. Inversely, larvae raised
203 without antibiotics did not manage to reach the 9th day of rearing as mortalities started to occur
204 on D2 in tanks A and B. In these tanks, larval survival rates only reached 75% on D4 against
205 85% for the reference. On D5 the larval survival rates in the three replicates without antibiotics
206 were all dramatically below the reference value.

207 Regarding the larval stage, none of the tanks, with or without antibiotics addition, reached the
208 post larvae stage on D9 but on D10 for all the tanks (except With-C, Table 1). All larvae
209 metamorphosed in mysis on D7, one day later compared to the reference. Except for the tanks B
210 and C reared without antibiotics (Without-B and Without-C in Table 1); all larvae stayed 2 days
211 in the zoea 3 stage (D3 and D4) while it usually only takes 1 day. Globally, compared to the
212 reference, regardless of the rearing condition, larvae had a delay in their metamorphosis. Indeed,
213 at D6 all larvae should have been in Mysis 1 stage while they were still in Zoea 3 stage.

214

215 **Time series of the active microbiota in the water**

216 After Eukaryota, Mitochondria, Chloroplasts and unassigned sequences were removed, a total of
217 21,749,911 reads, spread into 6707 ASVs were obtained from the HiSeq Illumina sequencing of
218 all the samples. The smallest and the largest libraries-were respectively composed of 207,221 and
219 650,143 reads and corresponded to the Control D3 and Control D6 samples (water without
220 larvae, antibiotics nor food).

221 Overall, the alpha diversity indexes (Table S1) were generally higher in the rearing water without
222 antibiotics than in the rearing water with antibiotics and the control water. Also, the alpha
223 diversity indexes of the control water were higher than the rearing water with antibiotics. The
224 storage water samples (primary reservoir and container storage) were those exhibiting the higher
225 alpha diversity indexes. Despite the rarefaction curves did not reach the plateau for all the
226 samples (Fig. S1), the Good's coverage revealed an overall average above 99.8% of the total
227 ASV table (Table S1), signifying that the sequencing depth was sufficient.

228 Using the whole microbial beta diversity, we visualized how the samples clustered together (Fig
229 2). The PCoA displayed 7 clusters (ellipses on Fig. 2), that were built using a confidence level
230 for a multivariate t-distribution set at 80%. The first cluster grouped the control water samples
231 along with the secondary reservoir (ResII). The second group gathered all the rearing water
232 hosting the nauplii. The third cluster encompassed the rearing water samples without antibiotics
233 collected on D2 and D3 and hosting the zoea with a good survival rate; while cluster 4 grouped
234 the rearing water samples without antibiotics collected from D4 to D6 (excepted one sample
235 collected on D4) and hosting the zoea with a bad survival rate. The rearing water samples
236 without antibiotics collected on D7 and D8, and hosting the mysis with a bad survival rate, were
237 all grouped in the cluster 5. The rearing water with antibiotics collected on D2 and hosting the
238 zoea with a good survival rate were apart from the cluster 6 that encompassed all the samples
239 collected in the rearing water with antibiotics and hosting the zoea with a good survival rate (D3
240 to D6). The last cluster grouped all the rearing water samples with antibiotics that hosted the
241 mysis with a good survival rate and corresponded to the samples collected from D7 to D9. The
242 primary reservoir that encompassed the lagoon seawater was aside all clusters (Fig. 2). In order
243 to confirm the PCoA and the clusters, a PERMANOVA along with a pairwise comparison were
244 done to evaluate the water treatment effect on the samples. The PERMANOVA displayed that
245 the sampling day, the treatment (control, antibiotics or not), the larval survival rate, the larval
246 stage, the larval stage and health as well as the day and the treatment together, explained the
247 variability among the samples (Table 2). Only 8.3% of the variability among the samples was not
248 explained by the tested factors. The main factors describing the variability were the sampling day
249 and the water treatment that respectively explained 36% and 25.4% of the variability. The water
250 treatment effect on the microbial diversity, was analyzed with a pairwise comparison using

251 Kruskal-Wallis tests which exhibited that all the treatments: control, antibiotics and not
252 antibiotics, were significantly different (p-value < 0.001).
253 The active microbiota of the primary reservoir (ResI), that contained lagoon seawater, was
254 highly different from all the other samples, as most of its lineages belonged to families that were
255 not represented by more than 1% of the total abundance in the other samples (Fig. 3). On D0, the
256 microbial composition of the control water, which contained no larvae, antibiotics nor food, was
257 identical to those of the storage container ResII and of the rearing waters with and without
258 antibiotics collected on D1. The *Alteromonadaceae* and the *Rhodobacteraceae* were dominant in
259 all these samples. Their abundances remained high during the other nine days of rearing with,
260 however, an increased proportion of *Pseudohongiellaceae* and *Bdellovibrionaceae* (Fig. 3). The
261 active microbial compositions of the 3 replicate samples for each condition displayed
262 homogenous profiles through the whole rearing excepted on D8 for the samples collected in the
263 rearing water without antibiotics (Fig. 3). The active microbiota of the water samples exhibited
264 different compositions and dynamics according to the rearing day, as microbial shifts occurred
265 daily and according to the addition of antibiotics. However, from D2 to the end of the rearing, in
266 the presence or not of antibiotics, the *Rhodobacteraceae* had high abundances (Fig. 3). The
267 active microbial composition of the rearing water without antibiotics encompassed mostly
268 members of the *Rhodobacteraceae*, the *Alteromonadaceae*, the *Saprospiraceae* and the
269 *Litoricolaceae* on D1 and on D2 (Fig. 3). On D3, a shift occurred with decreasing proportions of
270 *Alteromonadaceae* accompanied with increasing proportions of *Saprospiraceae*. Until D5, the
271 most abundant families were the *Rhodobacteraceae*, the *Alteromonadaceae* and the
272 *Saprospiraceae*. From D6 to D8, *Alteromonadaceae* and *Saprospiraceae* decreased drastically.
273 On D7 the main families were the *Rhodobacteraceae* and an unknown family related to the
274 ASV19 affiliated to the *Gammaproteobacteria*. On D8, the dominant families varied among the
275 3 tanks, where in addition to the *Rhodobacteraceae*, the proportion of *Flavobacteriaceae*,
276 *Vibrionaceae* and/or *Pseudoalteromonadaceae* increased. In the rearing water with antibiotics,
277 on D1, the taxa affiliated to the *Rhodobacteraceae*, the *Alteromonadaceae* and the *Litoricolaceae*
278 were the most abundant; while on D2, the main families were the *Rhodobacteraceae*, the
279 *Alteromonadaceae* and the NS11-12 marine group (Fig. 3). On D3, a shift occurred with an
280 increased proportion of *Pseudoalteromonadaceae* and *Cryomorphaceae*, associated with a drop
281 of the *Alteromonadaceae*. On D4, the *Pseudoalteromonadaceae* decreased whereas the unknown

282 family UBA12409 increased. On D5, the microbiota was dominated by members of the
283 *Rhodobacteraceae* and the *Saprospiraceae*. On D6, *Rhodobacteraceae* and *Cryomorphaceae*
284 greatly composed the microbiota. A prevalence of members of the *Rhodobacteraceae* and the
285 *Flavobacteraceae* was noticed on D7; while from D8 to D9, the main families of the rearing
286 water microbiota with antibiotics were the *Rhodobacteraceae*, the *Cryomorphaceae* and the
287 *Flavobacteraceae*.

288

289 **Specific, shared and core microbiomes among the water samples, larval stages, and health** 290 **status**

291 In order to determine specific ASVs of a given rearing condition, specific to a larval stage and
292 survival rate, as well as common microbiomes, several Venn diagrams were constructed.
293 A first Venn diagram was built to compare the rearing water of all larval groups (Fig. 4). As the
294 larval mortalities mainly occurred in the rearing water without antibiotics after D4, the nauplii
295 group was composed by water hosting the nauplii from the 2 rearing conditions. In the same
296 way, the group Zoea Good encompassed all the samples collected in the rearing water with
297 antibiotics from D2 to D6 and samples collected on D2 and on D3 in the rearing water without
298 antibiotics. Thus, the nauplii-specific microbiome contained 658 ASVs. The diagram showed
299 that no ASV was specific to the Zoea Good, while the Zoea Bad gathered 95 ASVs. The Mysis
300 Good condition exhibited 79 common ASVs and the Mysis Bad had 141 specific ASVs. The
301 diagram also displayed a core microbiota composed by 137 ASVs. Specific microbiotas of a
302 given condition as well as a core microbiome were pointed out through the Venn diagram
303 comparisons. The natural lagoon seawater stocked in the primary reservoir and in the storage
304 container, was used for the rearing. These two water storages as well as the evidenced specific
305 microbiotas and the core microbiome were therefore compared. Consequently, the specific
306 microbiota of the rearing water hosting the nauplii had 85 unique ASVs, while 573 ASVs were
307 already present in the natural seawater (Fig. 4B). The comparison between the specific
308 microbiota of the Zoea Bad and the natural seawater highlighted that 58 ASVs were previously
309 not in the natural seawater whereas 37 ASVs from the natural seawater were only detected in this
310 condition (Fig. 4C). The Mysis Good condition had 48 specific ASVs and shared 31 ASVs with
311 the natural seawater (Fig. 4D). The Mysis Bad condition exhibited 79 specific ASVs and co-
312 owned 62 ASVs with the natural seawater (Fig. 4E). The comparison between the rearing water

313 core microbiome and the natural seawater displayed that only 1 ASV was specific to the rearing
314 water core microbiome while the 136 other ASVs were shared with the natural seawater (Fig.
315 4F). Together, these comparisons exhibited the great role of the natural seawater on the rearing
316 water microbiota, as several ASVs detected in the lagoon seawater were also detected at several
317 times of the rearing according to the larval stage and the larval health status. As we observed a
318 microbial partitioning (Fig. 2) with specific microbiotas associated with a given larval stage and
319 survival rate in the rearing water (Fig. 4), we constructed an LefSe to investigate how the larval
320 stage, the larval health or both interacted with the active rearing water microbiota at the family
321 level.

322

323 **Biomarkers at the genus level according to the larval stages and health status**

324 Two LefSe analysis were conducted to investigate the differentially abundant genus in the
325 rearing water according to the larval stage (Zoea or Mysis) and the larval health status (Good or
326 Bad survival) (Figs. 5A and B). A first LefSe was constructed by analyzing 3 groups: the zoea
327 that were always healthy during the zoea stage (NTA0 Zoea Good in the Fig. 5A), the zoea that
328 were healthy only at the beginning of the zoea stage (NTSA Zoea Good, Fig. 5A); and the zoea
329 that were unhealthy at the end of the zoea stage (NTSA Zoea Bad, Fig. 5A). The second LefSe
330 compared the rearing water samples hosting the mysis with a good survival rate (Mysis Good)
331 and the rearing water hosting the mysis with a bad survival rate (Mysis Bad). They both
332 permitted to distinguish biomarkers of each condition (Figs 5A and 5B). Thus, 11 biomarkers
333 were specific of the rearing water hosting zoea good, 7 biomarkers of the healthy zoea that
334 became unhealthy, 9 biomarkers of the unhealthy zoea, 8 of the rearing water hosting mysis with
335 a good survival rate; and 12 of the water hosting mysis with a bad survival rate. Three
336 biomarkers of the zoea that were healthy during the zoea stage (NTA0 Zoea Good) were also
337 statistically enriched in the mysis good condition: *Nautella* and *Lesingera* genera as well as an
338 unknown genus of the *Cryomorphaceae* (ASV12). The genus *Fabibacter* was a biomarker of the
339 healthy zoea (NTA0 Zoea Good), and was later found as a biomarker of the rearing water
340 hosting mysis with a bad survival rate. The HIMB11 group was statistically enriched in the water
341 with the zoea that were only healthy at the beginning of the zoea stage (NTSA Zoea Good), and
342 was also a biomarker of rearing water with unhealthy mysis. Two lineages, *Phaeodactylibacter*
343 and an unknown genus of the *Rhodobacteraceae* (ASV6), were specifically abundant in the

344 rearing water of unhealthy zoea (NTSA Zoea Bad); while they were biomarkers of the rearing
345 water with healthy mysis. Four taxa enriched in the rearing water of the unhealthy zoea at the
346 end of the zoea stage, were also enriched in the rearing water hosting the mysis with a bad
347 survival rate: *Aestuariicoccus* and *Marivita* genera, an unknown genus of the NRL2 (ASV44)
348 and an unknown genus of the *Gammaproteobacteria* (ASV19).

349

350 Discussion

351 In this study, we aimed to distinguish, in the rearing water, active biomarkers that were specific
352 of a given larval stage and health condition. In order to assess the metabolically active
353 biomarkers, we extracted the total RNAs from the samples. Using RNA instead of DNA allows
354 to detect recent populations and living assemblages in an ecosystem (Cristescu, 2019), as RNA
355 persistence in environment is estimated between 13 to 24h against months or years for DNA
356 (Willerslev et al., 2007; Marshall, Vanderploeg & Chaganti, 2021), although ancient RNA has
357 been found in fossils or in sediments (Orsi, Biddle & Edgcomb, 2013; Cristescu, 2019). Also,
358 several publications using cDNA metabarcoding proved that RNA seemed to be a useful tool to
359 identify living organisms as well as to perform survey and biological monitoring (Laroche et al.,
360 2018; Amarasiri et al., 2021; Miyata et al., 2021, 2022; Veilleux, Misutka & Glover, 2021). For
361 these reasons, we performed RNA extractions coupled with reverse-transcription into cDNA, to
362 detect living microbial populations inhabiting the rearing water, as these communities may
363 interact with the composition of the rearing water and with the larvae. In our study, a unique
364 protocol regarding RNA extraction, cDNA retro-transcription, sequencing and sequencing
365 analysis was applied. This is crucial as it allows to perform comparisons and to decrease bias.
366 Indeed, regarding the extraction method used, the quantity, purity and yield of RNA can differ as
367 well as the microbial diversity (Shu et al., 2014; Muto et al., 2017). The V4 hypervariable region
368 of the 16S rRNA gene has been selected for sequencing because its size, around 254 bp, is quite
369 stable among the prokaryotes and allows HiSeq sequencing (2x150 pb). Also, this region
370 produces optimal prokaryote community clustering along with a suitable resolution (Caporaso et
371 al., 2011). Besides, the V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene is often used to describe
372 the microbial diversity in shrimp related studies (for example:(Zheng et al., 2016; Hou et al.,
373 2018; Xue et al., 2018; Wang et al., 2020a; Giraud et al., 2021, 2022; Callac et al., 2022)).

374

375 * **Main families of the rearing water microbiota**

376 A noticeable dynamic of the active rearing water microbiota was pointed out either in the
377 presence or not of antibiotics (Figs 2 and 3), through the rearing. As the PCoA displayed
378 sampling day separated clusters (Fig. 2), it was not surprising that the PERMANOVA indicated
379 that the sampling day influenced up to 36% of the variability among the samples. Despite a clear
380 distinction of the rearing water microbiota between the water with antibiotics harboring healthy
381 larvae and the water without antibiotics presenting unhealthy larvae, several main families were
382 common between the 2 rearing conditions. The presence of main common families in the rearing
383 water where antibiotic or not was added, was similar to what was shown in the rearing water of
384 *Penaeus stylirostris* reared using water filtered on 5µm and 1µm and passed through a UV
385 chamber before filling the tanks (Callac et al., 2022). The dominant families were the
386 *Rhodobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*), the *Alteromonadaceae* (*Gammaproteobacteria*), the
387 *Saprospiraceae* (*Bacteroidia*) and in less extent the *Litoricolaceae* (*Gammaproteobacteria*), the
388 *Cryomorphaceae* (*Bacteroidia*) and the *Flavobacteriaceae* (*Bacteroidia*) (Fig. 3). Overall, during
389 the rearing, the proportion of *Bacteroidia* increased while the part of the *Alpha*- and *Gamma*-
390 *proteobacteria* decreased, which was similarly highlighted in the rearing water of *Penaeus*
391 *stylirostris* reared using filtered and UV treated water before filling the tanks (Callac et al.,
392 2022); but also, in the rearing water of *Penaeus vannamei* (Zheng et al., 2017) and *Penaeus*
393 *monodon* (Anghthong et al., 2020). *Rhodobacteraceae* are often detected in the rearing water of
394 marine shrimp larvae such as *P. vannamei* (Zheng et al., 2017; Heyse et al., 2021), and *P.*
395 *stylirostris* (Giraud et al., 2021, 2022); as well as in the control tank containing only the rearing
396 water used to rear *P. stylirostris* larvae (Callac et al., 2022). *Alteromonadaceae* have been
397 previously detected in the rearing water of *P. stylirostris* (Giraud et al., 2022) and in the rearing
398 water of *P. vannamei* larvae, until stage Mysis 1 (Zheng et al., 2017).

399 When comparing the microbial diversity of the control tank with the rearing water, through the
400 entire rearing, the microbiota dynamic was different, mostly due to the absence of larvae, food
401 and treatment (PERMANOVA and pairwise comparisons). The same trend was observed in a
402 previous study regarding the rearing water of *P. stylirostris* and its control (Callac et al., 2022).
403 The eutrophication of the rearing water with the larvae, contrary to the control water, which
404 stayed oligotrophic during the rearing, could influence the dynamic of the families presents in all
405 the conditions. Thus, the detection of the *Cryomorphaceae* and their increasing abundance at the

406 end of the rearing, especially in the rearing water with antibiotics (Fig. 3); is in accordance with
407 their features as they are often found in organic rich oceanic water (Bowman & McMeekin,
408 2015). In the same way, that might explain the prevalence of the *Litoricolaceae* in the control
409 water and in the first days of the larval rearing, as members of this family are known to grow on
410 oligotrophic medium (Rosenberg et al., 2013). Another family affiliated to the
411 *Flavobacteriaceae*, appeared in the rearing water with larvae and became among the most
412 abundant at the end of the experiment in the rearing water with antibiotics hosting the mysis with
413 a good survival rate. This trend differed from the other study done in the rearing water of *P.*
414 *stylirostris* larvae in which important larval mortalities were observed in the rearing water with
415 antibiotics or without antibiotics (Callac et al., 2022). That also differs from the study made by
416 Zheng et al. 2017 where the *Flavobacteriaceae* were present in high abundance in the rearing
417 water of *P. vannamei* larvae at the zoea stage (Zheng et al., 2017). Thus, the dynamics of the
418 bacterial families in the rearing water appeared to be related to the sampling day, the rearing
419 water quality and to the addition of antibiotics.

420

421 * **Antibiotics and larval health as drivers of the rearing water microbiota?**

422 Despite the dominance of several main families, the PCoA (Fig. 2) and the statistical analysis
423 (PERMANOVA and pairwise comparison) exhibited that the treatment (control *versus* rearing
424 water with antibiotics *versus* rearing water without antibiotics) influenced the active microbial
425 diversity of the rearing water and influenced up to 25.4% of the variability among the samples
426 while the survival rate accounted only for 6.5%. Even if the statistical analysis shows a bigger
427 effect of the treatment on the active microbial diversity, it is hard to untangle the effects of the
428 antibiotics addition and of the larval death rate on the rearing water microbiota. Indeed, it is
429 complex to discriminate which community was impacted by the treatment rather than by the
430 larval survival. However, it seemed that the antibiotic addition highly influenced the larval
431 survival rate (Figs 2 and 3). Antibiotics use is a worldwide habit in shrimp hatcheries as they are
432 used either to avoid larval mortalities caused by pathogenic *Vibrio* species (Holmström et al.,
433 2003; Aftabuddin et al., 2009) or for prophylactic reasons under veterinary instructions. The
434 effect of the antibiotics on the microbiota of the rearing water of aquacultured animal is poorly
435 documented, while several studies have investigated its effect on animal health, physiology or
436 microbiota (Kim et al., 2019; Zeng et al., 2019; Holt et al., 2020; Yukgehnaish et al., 2020). To

437 this day, only one study has dealt with antibiotic effects on the rearing water microbiota of the
438 Penaeids (Callac et al., 2022). The authors showed that the antibiotic addition had a significant
439 effect on the microbial diversity of the rearing water on D1 before the larval mortalities occurred.
440 Antibiotic addition at zoea stage during the rearing of the freshwater shrimp *Macrobrachium*
441 *rosenbergii*, also induced discrepancy among the abundance of the main microbial genera in
442 comparison with a rearing without antibiotics (Ma et al., 2020).
443 Besides the influence of the antibiotic addition on the active microbial diversity of the rearing
444 water, larval mortalities might also affect the composition of the rearing water microbiota. This
445 might especially happen, like in our study, when massive mortalities occur (Fig. 1) and no dead
446 larvae removal or water renewal are applied. Previous studies have proved that animal death (or
447 death of any living organism) implied changes of their microbiota (Preiswerk, Walser & Ebert,
448 2018; Benbow et al., 2019). Indeed, the microbiome associated with the living host changes after
449 death and let's place to the necrobiome, which influences its closest environment, by
450 decomposing the host-derived organic matter (Cobaugh, Schaeffer & DeBruyn, 2015; Benbow et
451 al., 2019). Therefore, in turn, the microbiota of the closest surrounding of the dead organisms
452 also changes (Cobaugh, Schaeffer & DeBruyn, 2015; Finley et al., 2016; Lobb et al., 2020). In
453 our case, in the rearing water exhibiting high mortality, we can assume that the decaying of the
454 dead larvae can modify the rearing water composition, as well as the water microbiota with the
455 release of the necrobiome in the rearing water. Such process could have started since D2 with the
456 beginning of the mortalities, and continued until D9 when no living larvae remained in the tanks
457 (tanks without antibiotic, Table 1). We can also hypothesize that among the biomarkers or ASVs
458 specific of the unhealthy conditions, some of them were related to the necrobiome. In our study,
459 the use of antibiotics seemed to prevent the larval mortality (Fig.1), and also appeared to
460 influence the rearing water microbiota (Table 2) along with the larval survival rate, larval stage
461 and possibly the necrobiome.

462

463 * **Interactions between the natural seawater, the rearing water and the larval stage and**
464 **health**

465 In the light of our data, we established that various taxa of the rearing water were specific to a
466 larval stage and of a larval health; except for the zoea with a good survival rate for which no
467 specific ASVs were found (Fig. 4). This also exhibited a microbiota partitioning, as also shown

468 in the rearing water of *P. stylirostris* larvae (Callac et al., 2022) and *P. vannamei* larvae (Zheng
469 et al., 2017), revealing the great importance of the larval stage and of the larval health on the
470 rearing water microbiota. In addition, Giraud et al. (Giraud et al., 2021, 2022) have shown that a
471 horizontal transmission occurs between the shrimp larvae and their surrounding rearing water,
472 suggesting a putative dynamic between the larval microbiota and the rearing water microbiota.
473 According to the specific microbiota of a given larval stage and survival rate, many of the
474 specific evidenced ASVs were previously detected in the natural seawater and in the reservoir
475 (Fig. 4), suggesting the high importance of the lagoon and of the storage waters on the rearing
476 water microbiota, as already shown in Callac et al. 2022. In addition, several studies have
477 showed that multiple lineages were shared between the shrimp early life stages and the water
478 reservoirs (Zheng et al., 2017; Wang et al., 2020b; Giraud et al., 2021, 2022), suggesting that
479 microbial exchanges occurred between the rearing water and the larvae (Giraud et al., 2021,
480 2022). Such exchanges and interactions, might also occur with the necrobiome in the rearing
481 tanks which exhibited unusual larval death. The rearing water is thus a complex ecosystem
482 where various interactions take place among the water and also between the water and the larvae
483 according to their stage and health status. Seeking for significant and reliable microbial
484 biomarkers might help to monitor and to predict the fate of upcoming rearing.

485

486 *** Proxy uncovering: specific biomarker identification of a given rearing condition**

487 Our main objective was to unveil biomarkers at the genus level specific to a larval stage and
488 health status, to later use them to monitor larval health and manage the rearing water.
489 In our study, we have highlighted that the use of antibiotics seemed to prevent the larval
490 mortality (Fig. 1), and to influence the rearing water microbiota (Table 2) along with the larval
491 survival rate and the larval stage. Together, by comparing the active microbiota of the rearing
492 water hosting zoea or mysis with various survival rates with LEfSe analysis, we unveil specific
493 biomarkers of a given larval stage and health (Fig 5).
494 The *Nautella* and the *Leisingera* genera were both detected as biomarkers of the healthy zoea
495 and mysis (Fig 5). Interestingly, the genus *Nautella* has been identified as biomarker of diseased
496 *P. vannamei* larvae and their rearing water (Zheng et al., 2016, 2017); while other studies rather
497 exhibited this genus as a biomarker of healthy larvae and shrimps (Wang et al., 2020a; Restrepo
498 et al., 2021). The high abundance of this controversial genus in the rearing water seemed to be in

499 our case a biomarker of healthy larvae. The genus *Leisingera*, biomarker of the rearing water
500 with healthy zoea and mysis larvae, is known to produce secondary metabolites with
501 antimicrobial activity against several *Vibrio* species (Gromek et al., 2016) and has been detected
502 in the gut of the shrimp *P. vannamei*, in the eggs of the hawaiian bobtail squid and in Pacific
503 oyster larvae (Gromek et al., 2016; Duan et al., 2021; Fallet et al., 2022). Beside *Leisingera*,
504 others genera, such as *Ruegerira*, *Alconivorax* and *Marinobacter* might have a probiotic activity
505 in the rearing water hosting the healthy zoea. Indeed, *Ruegerira* exhibited antagonist effects
506 against fish vibrio such as *Vibrio anguillarum* and other bacteria isolated in a fish farm (Porsby,
507 Nielsen & Gram, 2008; Sonnenschein et al., 2017). It has been shown that the larvae of the
508 shrimp *P. indicus* had a better growth, metamorphosis rate and survival rate when fed with
509 microalgae associated with bacteria affiliated to *Alteromonas* and *Marinobacter* genera
510 (Sandhya, Sandeep & Vijayan, 2020). The addition of *Alteromonas macleolii* 0444 during the
511 rearing of oyster and scallop larvae showed a protection of the larvae during *Vibrio* challenges
512 (Kesarcodi-Watson et al., 2012). *Tenacibaculum* was significantly enriched in the rearing water
513 hosting the healthy mysis (Fig. 5). In a similar way as the *Nautella*, the genus *Tenacibaculum* has
514 been shown to be a biomarker of diseased *P. vannamei* affected by the “cotton shrimp-like”
515 disease (Zhou et al., 2019). However, *Tenacibaculum* was amongst the 6 most abundant genera
516 detected in both the healthy *P. vannamei* larvae and their rearing water (Zheng et al., 2016). As
517 for the *Nautella*, the high prevalence of *Tenacibaculum* in the rearing water with healthy mysis
518 suggests them to be a biomarker of healthy mysis. We can hypothesis the same about the
519 unknown genus related to the ASV12 and affiliated to the *Cryomorphaceae* for which no
520 metabolic or ecologic function can be inferred except a potential beneficial role for larval
521 survival. Together, these taxa: *Nautella*, *Leisingera*, unknown genera related to ASV12,
522 *Ruegerira*, *Alconivorax*, *Marinobacter* and *Tenacibaculum* seemed to be beneficial for the larval
523 survival and maybe for their physiology (enhance immunity, metamorphosis); and might, in the
524 rearing water, outcompete the r-strategist microorganisms and/or putative opportunistic
525 pathogens.
526 Several biomarkers were detected in the rearing water of unhealthy larvae, and some were
527 present in both the rearing water with unhealthy zoea and unhealthy mysis. This is the case for
528 *Marivita* and *Aestuariicoccus* (Fig. 5). While the last genus was so far never found in shrimp
529 rearing water or shrimp microbiota, the *Marivita* were found in high abundance in ponds where

530 *Penaeus vannamei* adults and larvae were reared (Lin et al., 2017; Yang et al., 2018; Wang et al.,
531 2020a). Even if the ecological role of *Marivita* in aquaculture ecosystem remains unknown (Lin
532 et al., 2017), it seemed that the presence of these bacteria was related to larvae mortalities in our
533 study. The same conclusion can be made for the unknown genus related to the ASV19
534 (*Gammaproteobacteria*) and for the unknown genus related to the ASV44 (NRL2), distinguished
535 as biomarkers in the rearing water hosting the zoea and the mysis with bad survival rate (Fig. 5).
536 The HIMB11 was a biomarker of the healthy zoea that later became unhealthy and of the mysis
537 with a bad survival rate (Fig. 5); this biomarker might be related to upcoming and occurring
538 larval mortalities. *Nioella*, one of the biomarkers of the mysis with a low survival rate in the
539 rearing water, is a genus that has been detected in the gut microbiota of *P. vannamei* affected by
540 the white feces syndrome (Lu et al., 2020). This disease is due to a polymicrobial pathogens
541 infection and *Nioella* seemed to be in diseased-specific associations with species related to
542 *Vibrio tubiashii* and *V. coralliilyticus* (Lu et al., 2020). Interestingly, the *Fabibacter* genus was
543 enriched in rearing water with healthy zoea and in the rearing water hosting mysis with a bad
544 survival rate (Fig. 5). Similarly, the *Phaeocystidibacter* and an unknown genus related to the
545 ASV6 (*Rhodobacteraceae*), were found as biomarker of the zoea with a bad survival and of the
546 healthy mysis in the rearing water (Fig. 5). These contrasted behaviors suggest that either these
547 biomarkers had to be used only at these specific moments of the rearing (with the specific larval
548 health and stage of the detected biomarkers: *Phaeocystidibacter* and an unknown genus related
549 to the ASV6) or are not reliable biomarkers of larval health.

550 One can argue that biomarkers might also reflect the observed one day larval metamorphose
551 occurring during mysis and post-larvae transformations (D6 and D9). However, it is quite
552 common to observe a transition phase from zoea to mysis on Day 6; and from mysis to post-
553 larvae on Day 9 (reference Table 1). As our larval observations took place in the morning, we
554 probably missed the metamorphosis peak occurring at D6 and D9. Indeed, as shown in the Table
555 1, all the larvae reached the mysis 1 stage at D7 and all the larvae from the tanks reared with
556 antibiotics reached the post larvae stage on Day 10 (except tank C which was still transitioning
557 mysis 3 - post larvae) (Table 1). Therefore, we can argue that the detected biomarkers were
558 specific of a given larval stage and survival rate.

559 At the writing time, larval mortalities are still occurring in the territory's hatcheries highlighting
560 the great importance of defining reliable proxies that can be used as early surveillance of the

561 rearing water or prior to the rearing by monitoring the lagoon seawater. Thus, these biomarkers
562 aim to help microbial management of the rearing waters by suggesting new probiotic populations
563 or beneficial taxa to improve water quality or larval health.

564 Further studies in metatranscriptomic should be done on the rearing water microbiota and on
565 both larvae and their microbiota, in order to highlight the genes that are specifically enriched
566 according to each rearing condition. Such data will allow to investigate which pathways are
567 differentially expressed according to the larval stage and health when contrasted survival rate are
568 observed.

569

570 **Conclusions**

571 Our findings exhibited that shrimp larval rearing water is a complex and dynamic ecosystem,
572 driven by several parameters: the original natural seawater, the presence or not of antibiotics, the
573 larval stage, the larval health status and maybe by the necrobiome. We also highlighted that it is
574 hard to untangle the effects of the antibiotic addition and of the larval mortalities on the rearing
575 water microbiota, especially in the case of mass mortalities occurring in the rearing water
576 without antibiotics in comparison with great survivals in the rearing condition with antibiotics. In
577 addition, our results revealed that, given a larval stage and survival rate, several active taxa were
578 specific to these considered parameters (except for the zoea with a good survival rate). Among
579 these lineages, many of them were originally detected in the natural seawater. That outcome
580 disclosed the great importance of the natural seawater microbiota on the rearing water
581 microbiota. We also showed that the necrobiome associated with dead larvae might potentially
582 impact the structure of the rearing water microbiota. The biomarker investigation allowed to
583 highlight that several genera: *Nautella*, *Leisingera*, unknown genera related to ASV12
584 (*Cryomorphaceae*), *Ruegerira*, *Alconivorax*, *Marinobacter* and *Tenacibaculum*, could potentially
585 be beneficial for the larval survival and physiology; and may, in the rearing water, overcome the
586 r-strategist microorganisms and/or putative opportunistic pathogens. Members of these genera
587 might also act as probiotics for the larvae. On the contrary, *Marivita*, *Aestuariicoccus*, an
588 unknown genus related to the ASV19 (*Gammaproteobacteria*), an unknown genus related to the
589 ASV44 (NRL2), HIMB11 and *Nioella*, appeared to be unfavorable for the larval survival and
590 could be associated with upcoming and occurring larval mortalities. To further understand the
591 role of these specific genera in the rearing water or on the larvae, several studies such as

592 metatranscriptomic analysis are needed, in particular to uncover their activities and ecological
593 role. Other analysis might be done on the detected beneficial biomarkers to test their putative
594 probiotic activities. Despite the unknown role of these specific genera during the rearing, these
595 biomarkers could be used to design specific qPCR primers and thus, be routine proxies to
596 forecast the larval health. They could be used at the beginning of the rearing and even before, in
597 the natural seawater, as an early warning investigation. Ultimately, the same proxies could also
598 help to monitor and to estimate the evolution of the larval rearing; and to further manage the
599 rearing water microbiota and select beneficial microorganisms for the larvae.

600

601 **Acknowledgements**

602 We sincerely acknowledge all the members of the Station Aquacole de Saint Vincent for their
603 great help before and during the experiment; and for the zootechnical, technical and analytical
604 support. Special thanks to Maxime Beauvais for his indubitably help for the sampling and
605 sample processing. We particularly thank Jean-René Maillez, Jean-Sébastien Lam and Julien Le
606 Rohellec for their precious help in the hatchery. We deeply thank Dominique Ansquer, Valentine
607 Ballan and Gwenola Plougoulen for their valuable biomolecular work. We also greatly
608 acknowledge Valérie Pérez for her valuable bioinformatic help.

609

610 **References**

611 Aftabuddin S, Kader A, Kamal AM, Zafar M. 2009. Present status on the use of antibiotics and.
612 *AACL Bioflux* 2:369–380.

613 Amarasiri M, Furukawa T, Nakajima F, Sei K. 2021. Pathogens and disease vectors/hosts
614 monitoring in aquatic environments: Potential of using eDNA/eRNA based approach.
615 *Science of the Total Environment* 796:148810. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148810.

616 Anghong P, Uengwetwanit T, Arayamethakorn S, Chaitongsakul P, Karoonuthaisiri N,
617 Rungrassamee W. 2020. Bacterial analysis in the early developmental stages of the black
618 tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Scientific Reports* 10. DOI: 10.1038/s41598-020-61559-
619 1.

620 Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C, Klopp C. 2014. SOFTWARE Open Access jvenn:
621 an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15:1–7.

622 Beliaeff B, Chim L, Della Patrona L, Goyard E, Herlin J, Labreache Y, Walling E, Ansquer D,

- 623 Brun P, Castex M, Coatanea D, Courties C, De Lorgeril J, Dufour R, Frappier J, Goarant C,
624 Huber M, Lemaire P, Lemonnier H, Le Roux F, Loubersac L, Lucas R, Patrois J, Peignon J-
625 M, Pham D, Ramage Y, Soulard B, Vic M, Vourey E, Wabete N. 2009. DEDUCTION: A
626 Research Project for Shrimp Farming Sustainability in New Caledonia.
- 627 Benbow ME, Barton PS, Ulyshen MD, Beasley JC, DeVault TL, Strickland MS, Tomberlin JK,
628 Jordan HR, Pechal JL. 2019. Necrobiome framework for bridging decomposition ecology of
629 autotrophically and heterotrophically derived organic matter. *Ecological Monographs* 89:1–
630 29. DOI: 10.1002/ecm.1331.
- 631 Bledsoe JW, Peterson BC, Swanson KS, Small BC. 2016. Ontogenetic characterization of the
632 intestinal microbiota of channel catfish through 16S rRNA gene sequencing reveals insights
633 on temporal shifts and the influence of environmental microbes. *PLoS ONE* 11:1–22. DOI:
634 10.1371/journal.pone.0166379.
- 635 Bowman JP, McMeekin TA. 2015. *Alteromonadaceae*. *Bergey's Manual of Systematics of*
636 *Archaea and Bacteria*:1–2. DOI: 10.1002/9781118960608.fbm00217.
- 637 Callac N, Boulo V, Giraud C, Beauvais M, Ansqer D, Ballan V. 2022. Microbiota of the
638 Rearing Water of *Penaeus stylirostris* Larvae Influenced by Lagoon Seawater and Specific
639 Key Microbial Lineages of Larval Stage and Survival.
- 640 Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2:
641 High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 13:581–
642 583. DOI: 10.1038/nmeth.3869.
- 643 Cao Y, Dong Q, Wang D, Zhang P, Liu Y, Niu C. 2022. microbiomeMarker: an R/Bioconductor
644 package for microbiome marker identification and visualization. *Bioinformatics (Oxford,*
645 *England)* 38:4027–4029. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac438.
- 646 Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N,
647 Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences
648 per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
649 *America* 108:4516–4522. DOI: 10.1073/pnas.1000080107.
- 650 Carbone D, Faggio C. 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants.
651 Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish*
652 *Immunology* 54:172–178.
- 653 Cobaugh KL, Schaeffer SM, DeBruyn JM. 2015. Functional and structural succession of soil

- 654 microbial communities below decomposing human cadavers. *PLoS ONE* 10:1–20. DOI:
655 10.1371/journal.pone.0130201.
- 656 Cristescu ME. 2019. Can Environmental RNA Revolutionize Biodiversity Science? *Trends in*
657 *Ecology and Evolution* 34:694–697. DOI: 10.1016/j.tree.2019.05.003.
- 658 Duan Y, Wang Y, Huang J, Li H, Dong H, Zhang J. 2021. Toxic effects of cadmium and lead
659 exposure on intestinal histology, oxidative stress response, and microbial community of
660 Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine Pollution Bulletin* 167:112220. DOI:
661 10.1016/j.marpolbul.2021.112220.
- 662 Fallet M, Montagnani C, Petton B, Dantan L, de Lorgeril J, Comarmond S, Chaparro C, Toulza
663 E, Boitard S, Escoubas JM, Vergnes A, Le Grand J, Bulla I, Gueguen Y, Vidal-Dupiol J,
664 Grunau C, Mitta G, Cosseau C. 2022. Early life microbial exposures shape the *Crassostrea*
665 *gigas* immune system for lifelong and intergenerational disease protection. *Microbiome*
666 10:1–21. DOI: 10.1186/s40168-022-01280-5.
- 667 Finley SJ, Pechal JL, Benbow ME, Robertson BK, Javan GT. 2016. Microbial Signatures of
668 Cadaver Gravesoil During Decomposition. *Microbial Ecology* 71:524–529. DOI:
669 10.1007/s00248-015-0725-1.
- 670 Ganguly S, Prasad A. 2012. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion
671 and metabolism. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22:11–16. DOI: 10.1007/s11160-
672 011-9214-x.
- 673 Giraud C, Callac N, Beauvais M, Mailliez J-R, Ansquer D, Selmaoui-Folcher N, Pham D,
674 Wabete N, Boulo V. 2021. Potential lineage transmission within the active microbiota of the
675 eggs and the nauplii of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* : possible influence of the rearing
676 water and more. *PeerJ* 9:e12241. DOI: 10.7717/peerj.12241.
- 677 Giraud C, Callac N, Boulo V, Pham D, Selmaoui-folcher N, Wabete N. 2022. The Active
678 Microbiota of the Eggs and the Nauplii of the Pacific Blue Shrimp *Litopenaeus stylirostris*
679 Partially Shaped by a Potential Vertical Transmission. 13. DOI:
680 10.3389/fmicb.2022.886752.
- 681 Goarant C, Reynaud Y, Ansquer D, Decker S de, Saulnier D, Roux F le. 2006. Molecular
682 epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (
683 *Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology* 29:570–
684 580. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.005>.

- 685 Gromek SM, Suria AM, Fullmer MS, Garcia JL, Gogarten JP, Nyholm S V., Balunas MJ. 2016.
686 *Leisingera* sp. JC1, a bacterial isolate from hawaiian bobtail squid eggs, produces
687 indigoidine and differentially inhibits vibrios. *Frontiers in Microbiology* 7:1–16. DOI:
688 10.3389/fmicb.2016.01342.
- 689 Heyse J, Props R, Kongnuan P, De Schryver P, Rombaut G, Defoirdt T, Boon N. 2021. Rearing
690 water microbiomes in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larviculture assemble
691 stochastically and are influenced by the microbiomes of live feed products. *Environmental*
692 *Microbiology* 23:281–298. DOI: 10.1111/1462-2920.15310.
- 693 Holmström K, Gräslund S, Wahlström A, Pongshompoo S, Bengtsson BE, Kautsky N. 2003.
694 Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human
695 health. *International Journal of Food Science and Technology* 38:255–266. DOI:
696 10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x.
- 697 Holt CC, Bass D, Stentiford GD, van der Giezen M. 2020. Understanding the role of the shrimp
698 gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*:107387. DOI:
699 10.1016/j.jip.2020.107387.
- 700 Hou D, Huang Z, Zeng S, Liu J, Weng S, He J. 2018. Comparative analysis of the bacterial
701 community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment. *Journal*
702 *of Applied Microbiology* 125:792–799. DOI: 10.1111/jam.13919.
- 703 Huang F, Pan L, Song M, Tian C, Gao S. 2018. Microbiota assemblages of water, sediment, and
704 intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health.
705 *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:8585–8598. DOI: 10.1007/s00253-018-9229-
706 5.
- 707 Hugerth LW, Wefer HA, Lundin S, Jakobsson HE, Lindberg M, Rodin S, Engstrand L,
708 Andersson AF. 2014. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-
709 taxonomic-range PCR in microbial ecology studies. *Applied and Environmental*
710 *Microbiology* 80:5116–5123. DOI: 10.1128/AEM.01403-14.
- 711 Jari Oksanen. 2022. Package “vegan” Title Community Ecology Package.
- 712 Kesarcodi-Watson A, Miner P, Nicolas JL, Robert R. 2012. Protective effect of four potential
713 probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster
714 (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture*
715 344–349:29–34. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.02.029.

- 716 Kim A, Kim N, Roh HJ, Chun WK, Ho DT, Lee Y, Kim DH. 2019. Administration of antibiotics
717 can cause dysbiosis in fish gut. *Aquaculture* 512:734330. DOI:
718 10.1016/j.aquaculture.2019.734330.
- 719 Laroche O, Wood SA, Tremblay LA, Ellis JI, Lear G, Pochon X. 2018. A cross-taxa study using
720 environmental DNA/RNA metabarcoding to measure biological impacts of offshore oil and
721 gas drilling and production operations. *Marine Pollution Bulletin* 127:97–107. DOI:
722 10.1016/j.marpolbul.2017.11.042.
- 723 Lauzon HL, Gudmundsdottir S, Petursdottir SK, Reynisson E, Steinarsson A, Oddgeirsson M,
724 Bjornsdottir R, Gudmundsdottir BK. 2010. Microbiota of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)
725 rearing systems at pre- and posthatch stages and the effect of different treatments. *Journal*
726 *of Applied Microbiology* 109:1775–1789. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04806.x.
- 727 Lin G, Sun F, Wang C, Zhang L, Zhang X. 2017. Assessment of the effect of *Enteromorpha*
728 *prolifera* on bacterial community structures in aquaculture environment. *PLoS ONE* 12:1–
729 15. DOI: 10.1371/journal.pone.0179792.
- 730 Lobb B, Hodgson R, Lynch MDJ, Mansfield MJ, Cheng J, Charles TC, Neufeld JD, Craig PM,
731 Doxey AC. 2020. Time Series Resolution of the Fish Necrobiome Reveals a Decomposer
732 Succession Involving Toxicogenic Bacterial Pathogens. *mSystems* 5. DOI:
733 10.1128/msystems.00145-20.
- 734 Lu J, Zhang X, Qiu Q, Chen J, Xiong J. 2020. Identifying Potential Polymicrobial Pathogens:
735 Moving Beyond Differential Abundance to Driver Taxa. *Microbial Ecology* 80:447–458.
736 DOI: 10.1007/s00248-020-01511-y.
- 737 Ma R, Wang Y, Zhao L, Zhou J, Zhao S, Li X, Dai X, Fang W. 2020. Exploration of the death
738 causes in zoea stages of *Macrobrachium rosenbergii* based on microbial diversity analysis.
739 *Aquaculture* 519:734710. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734710.
- 740 Maddox MB, Manzi JJ. 1976. The Effects Of Algal Supplements On Static System Culture Of
741 *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) Larvae 1, 2. *Proceedings of the annual meeting -*
742 *World Mariculture Society* 7:677–698. DOI: [https://doi.org/10.1111/j.1749-](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1976.tb00096.x)
743 [7345.1976.tb00096.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1976.tb00096.x).
- 744 Marshall NT, Vanderploeg HA, Chaganti SR. 2021. Environmental (e)RNA advances the
745 reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific Reports* 11:1–11. DOI: 10.1038/s41598-
746 021-82205-4.

- 747 McMurdie PJ, Holmes S. 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis
748 and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8. DOI:
749 10.1371/journal.pone.0061217.
- 750 Miyata K, Inoue Y, Amano Y, Nishioka T, Nagaike T, Kawaguchi T, Morita O, Yamane M,
751 Honda H. 2022. Comparative environmental RNA and DNA metabarcoding analysis for
752 ecological surveys of river algae and arthropods. *Research Square* 2022:1–16. DOI:
753 10.1038/s41598-022-23888-1.
- 754 Miyata K, Inoue Y, Amano Y, Nishioka T, Yamane M, Kawaguchi T, Morita O, Honda H. 2021.
755 Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity.
756 *Ecological Indicators* 128:107796. DOI: 10.1016/j.ecolind.2021.107796.
- 757 Muto H, Takaki Y, Hirai M, Mino S, Sawayama S, Takai K, Nakagawa S. 2017. A simple and
758 efficient RNA extraction method from deep-sea hydrothermal vent chimney structures.
759 *Microbes and Environments* 32:330–335. DOI: 10.1264/jsme2.ME17048.
- 760 Orsi W, Biddle JF, Edgcomb V. 2013. Deep Sequencing of Subseafloor Eukaryotic rRNA
761 Reveals Active Fungi across Marine Subsurface Provinces. *PLoS ONE* 8. DOI:
762 10.1371/journal.pone.0056335.
- 763 Pham D, Charmantier G, Wabete N, Boulo V, Broutoi F, Mailliez JR, Peignon JM, Charmantier-
764 Daures M. 2012. Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical
765 improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris*
766 (*Decapoda, Penaeidae*). *Aquaculture* 362–363:10–17. DOI:
767 10.1016/j.aquaculture.2012.07.026.
- 768 Porsby CH, Nielsen KF, Gram L. 2008. Phaeobacter and Ruegeria species of the Roseobacter
769 clade colonize separate niches in a Danish turbot (*Scophthalmus maximus*)-rearing farm
770 and antagonize *Vibrio anguillarum* under different growth conditions. *Applied and*
771 *Environmental Microbiology* 74:7356–7364. DOI: 10.1128/AEM.01738-08.
- 772 Preiswerk D, Walser JC, Ebert D. 2018. Temporal dynamics of microbiota before and after host
773 death. *ISME Journal* 12:2076–2085. DOI: 10.1038/s41396-018-0157-2.
- 774 Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The
775 SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based
776 tools. *Nucleic Acids Research* 41:590–596. DOI: 10.1093/nar/gks1219.
- 777 Restrepo L, Domínguez-Borbor C, Bajaña L, Betancourt I, Rodríguez J, Bayot B, Reyes A.

- 778 2021. Microbial community characterization of shrimp survivors to AHPND challenge test
779 treated with an effective shrimp probiotic (*Vibrio diabolicus*). *Microbiome* 9:1–20. DOI:
780 10.1186/s40168-021-01043-8.
- 781 Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. 2013. The prokaryotes:
782 *Gammaproteobacteria*. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*:1–768. DOI: 10.1007/978-
783 3-642-38922-1.
- 784 Sandhya S V., Sandeep KP, Vijayan KK. 2020. In vivo evaluation of microbial cocktail of
785 microalgae-associated bacteria in larval rearing from zoea I to mysis I of the Indian white
786 shrimp, *Penaeus indicus*. *Journal of Applied Phycology* 32:3949–3954. DOI:
787 10.1007/s10811-020-02230-0.
- 788 Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011.
789 Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology* 12:R60. DOI:
790 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- 791 Shu C, Sun S, Chen J, Chen J, Zhou E. 2014. Comparison of different methods for total RNA
792 extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani*. *Electronic Journal of Biotechnology* 17:50–
793 54. DOI: 10.1016/j.ejbt.2013.12.009.
- 794 Sonnenschein EC, Nielsen KF, D'Alvise P, Porsby CH, Melchiorson J, Heilmann J, Kalatzis PG,
795 López-Pérez M, Bunk B, Spröer C, Middelboe M, Gram L. 2017. Global occurrence and
796 heterogeneity of the Roseobacter-clade species *Ruegeria mobilis*. *ISME Journal* 11:569–
797 583. DOI: 10.1038/ismej.2016.111.
- 798 Sun F, Wang Y, Wang C, Zhang L, Tu K, Zheng Z. 2019. Insights into the intestinal microbiota
799 of several aquatic organisms and association with the surrounding environment.
800 *Aquaculture* 507:196–202. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.04.026.
- 801 Veilleux HD, Misutka MD, Glover CN. 2021. Environmental DNA and environmental RNA:
802 Current and prospective applications for biological monitoring. *Science of the Total*
803 *Environment* 782:146891. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146891.
- 804 Wang H, Huang J, Wang P, Li T. 2020a. Insights into the microbiota of larval and postlarval
805 Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) along early developmental stages: a case in pond
806 level. *Molecular Genetics and Genomics* 295:1517–1528. DOI: 10.1007/s00438-020-
807 01717-2.
- 808 Wang Y, Wang K, Huang L, Dong P, Wang S, Chen H, Lu Z, Hou D, Zhang D. 2020b. Fine-

- 809 scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus*
810 *vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome* 8. DOI: 10.1186/s40168-020-
811 00879-w.
- 812 Wei H, Li X, Tang L, Yao H, Ren Z, Wang C, Mu C, Shi C, Wang H. 2020. 16S rRNA gene
813 sequencing reveals the relationship between gut microbiota and ovarian development in the
814 swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Chemosphere* 254:126891. DOI:
815 10.1016/j.chemosphere.2020.126891.
- 816 Wilkes Walburn J, Wemheuer B, Thomas T, Copeland E, O'Connor W, Booth M, Fielder S,
817 Egan S. 2019. Diet and diet-associated bacteria shape early microbiome development in
818 Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *Microbial Biotechnology* 12:275–288. DOI:
819 10.1111/1751-7915.13323.
- 820 Willerslev E, Cappellini E, Boomsma W, Nielsen R, Hebsgaard MB, Brand TB, Hofreiter M,
821 Bunce M, Poinar HN, Dahl-Jensen D, Johnsen S, Steffensen JP, Bennike O, Schwenninger
822 JL, Nathan R, Armitage S, De Hoog CJ, Alfimov V, Christl M, Beer J, Muscheler R, Barker
823 J, Sharp M, Penkman KEH, Haile J, Taberlet P, Gilbert MTP, Casoli A, Campani E, Collins
824 MJ. 2007. Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland.
825 *Science* 317:111–114. DOI: 10.1126/science.1141758.
- 826 Xiong J, Zhu J, Zhang D. 2014. The application of bacterial indicator phylotypes to predict
827 shrimp health status. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:8291–8299. DOI:
828 10.1007/s00253-014-5941-y.
- 829 Xue M, Wu L, He Y, Liang H, Wen C. 2018. Biases during DNA extraction affect
830 characterization of the microbiota associated with larvae of the Pacific white shrimp,
831 *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ* 2018. DOI: 10.7717/peerj.5257.
- 832 Yang W, Zhu J, Zheng C, Qiu H, Zheng Z, Lu K. 2018. Succession of bacterioplankton
833 community in intensive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) aquaculture systems. *Aquaculture*
834 497:200–213. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.053.
- 835 Yukgehnaish K, Kumar P, Sivachandran P, Marimuthu K, Arshad A, Paray BA, Arockiaraj J.
836 2020. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and
837 its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture* 12:1903–1927. DOI:
838 10.1111/raq.12416.
- 839 Zeng S, Hou D, Liu J, Ji P, Weng S, He J, Huang Z. 2019. Antibiotic supplement in feed can

840 perturb the intestinal microbial composition and function in Pacific white shrimp. *Applied*
841 *Microbiology and Biotechnology* 103:3111–3122. DOI: 10.1007/s00253-019-09671-9.

842 Zheng Y, Yu M, Liu J, Qiao Y, Wang L, Li Z, Zhang XH, Yu M. 2017. Bacterial community
843 associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae
844 and rearing water across different growth stages. *Frontiers in Microbiology* 8:1–11. DOI:
845 10.3389/fmicb.2017.01362.

846 Zheng Y, Yu M, Liu Y, Su Y, Xu T, Yu M, Zhang XH. 2016. Comparison of cultivable bacterial
847 communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at
848 different health statuses and growth stages. *Aquaculture* 451:163–169. DOI:
849 10.1016/j.aquaculture.2015.09.020.

850 Zhou L, Chen C, Xie J, Xu C, Zhao Q, Qin JG, Chen L, Li E. 2019. Intestinal bacterial
851 signatures of the “cotton shrimp-like” disease explain the change of growth performance
852 and immune responses in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish*
853 *Immunology* 92:629–636. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.06.054.

854

855

Figure 1

Evolution of the larval survival during the experiment

Evolution of the larval survival during the experiment compared to the reference in turquoise (e.g.: usual survival rate obtained for a specific day, calculated for each day using data of 10 years of successful rearing; Ifremer data, Pham comm. pers.). Without-A, Without-B, Without-C, correspond to the rearing water without antibiotic in the tanks A, B and C; and With-A, With-B, With-C, stand for the rearing water with antibiotic in the tanks A, B and C. D0 to D9 correspond to the day of the rearing.

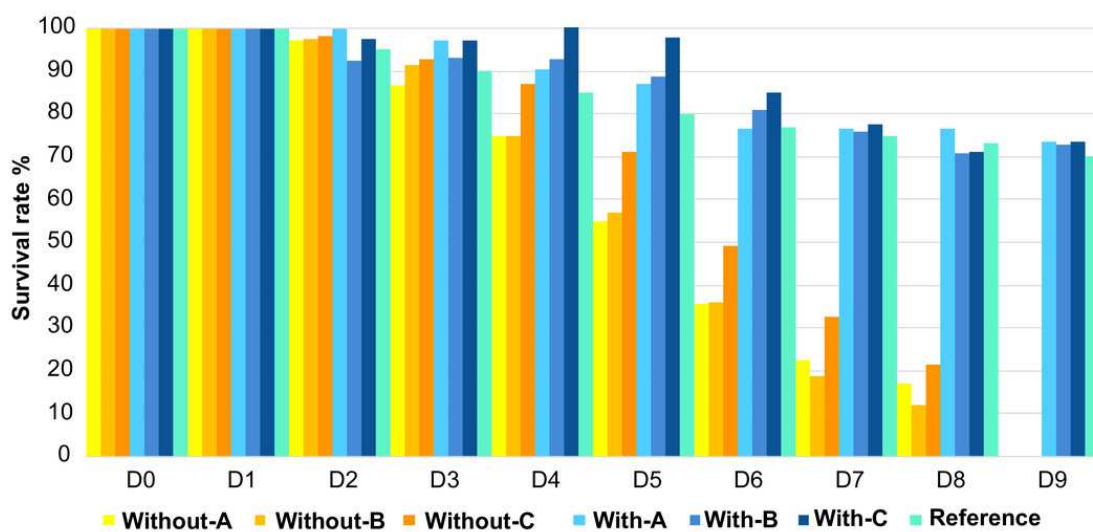


Figure 2

Ordination of the water samples based on the PCoA method and a Bray-Curtis dissimilarity matrix.

PCoA of the rearing water samples. The ellipses were constructed using a confidence level for a multivariate t-distribution set at 80%. For each cluster or samples outside the clusters, the larval stage and health (Good for high survival rate and Bad for high mortality rate) are noted. Each color corresponds to a sampling day in the figure and the corresponding sampling day is noted in the same color in the caption on the right side of the PCoA.

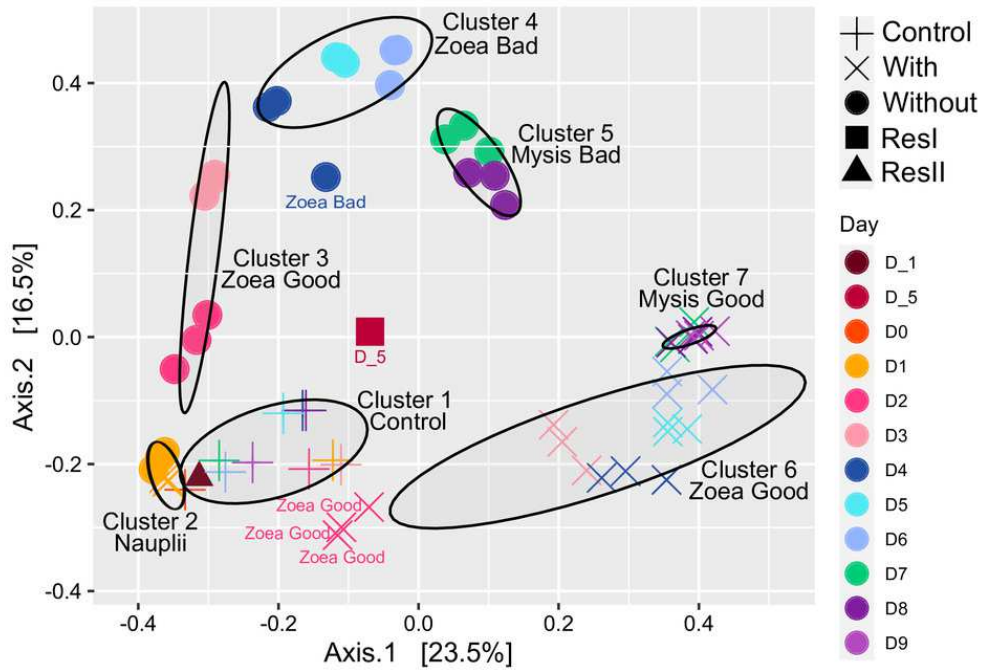


Figure 3

Microbial composition of the water samples.

Relative abundance of the main prokaryotic families. The relative abundance is represented in terms of percentage of the total prokaryotic sequences per sample. Only families representing more than 1% of the overall abundance in at least 3 samples are displayed on the barplot. ResI stands for the primary reservoir sample, ResII for the secondary reservoir sample, Control stands for the control water without larvae, antibiotic nor food; Without antibiotic for the rearing water without antibiotic, With antibiotic for the rearing water supplemented with antibiotic. D0 to D8 correspond to the sampling day. Sample day are followed by A, B or C which correspond to the replicate tanks for the rearing water with or without antibiotic.

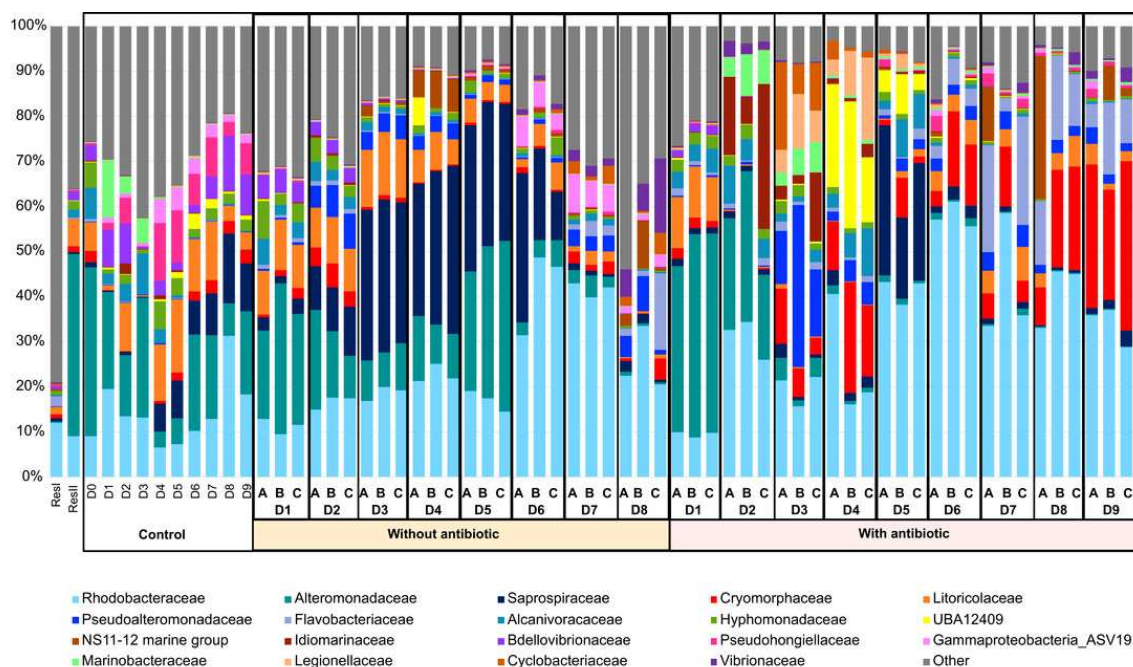


Figure 4

Microbial communities associated with the specific and core microbiomes of the whole rearing experiment in the rearing water and the water storages.

A) Venn diagram of shared ASVs among all the rearing water samples. Coloured ellipses correspond to group-specific ASVs of the rearing water hosting in: red = nauplii, khaki = zoea with a good survival rate, green = zoea with a bad survival rate, blue = mysis with a good survival rate, purple = mysis with a bad survival rate. The overlapping area between all the ellipses, corresponds to the core microbiome composed by the 137 ASVs common to all the samples. The numbers inside the ellipses and in the overlapping zones correspond to the total number of ASVs present in the condition. **B to F)** Venn diagram of shared ASVs between the specific ASVs of the water storage (yellow ellipse = group-specific ASVs of the primary reservoir and maroon = group-specific ASVs of the secondary reservoir) and **B)** with the nauplii (red ellipse), **C)** with the zoea with a bad survival rate (khaki ellipse), **D)** with the mysis with a good survival rate (blue ellipse), **E)** with the mysis with a bad survival rate (purple ellipse). **F)** Venn diagram of the core microbiota of the rearing water and the ASVs of the water storages: in light yellow the primary reservoir and in beige the secondary reservoir.

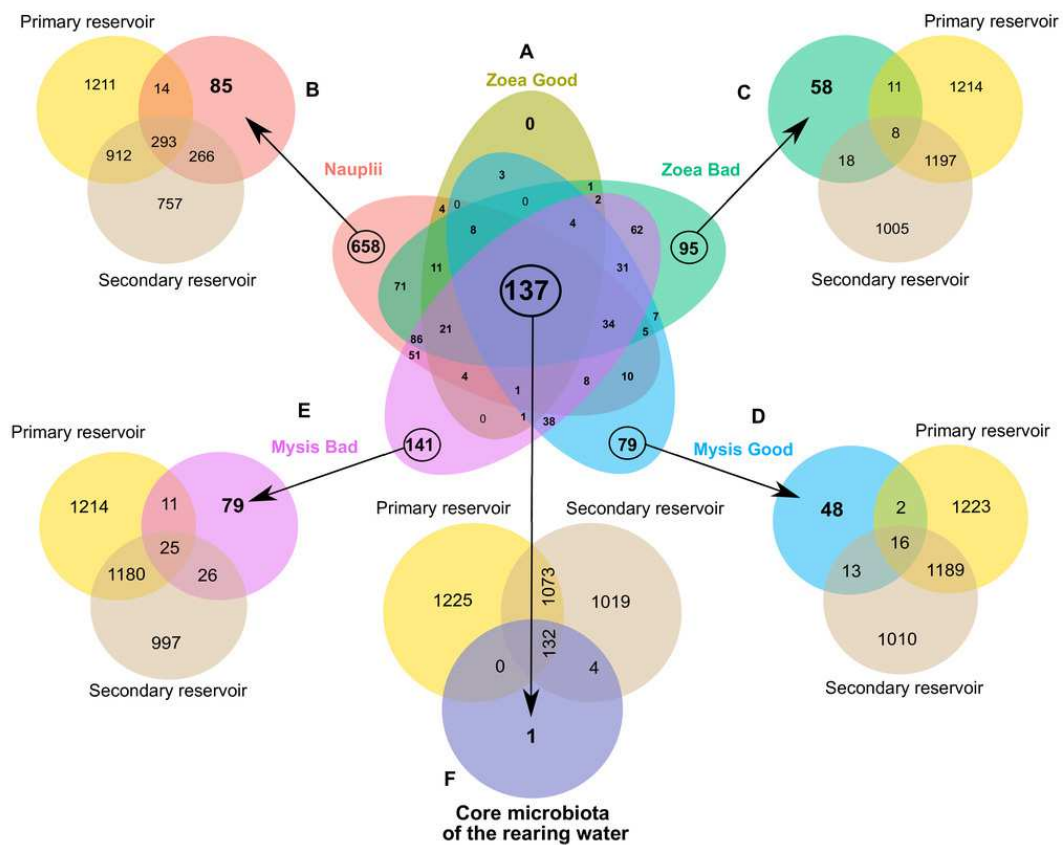


Figure 5

Differentially abundant genera according to the larval growth and survival status.

A) LEfSe, linear discriminant analysis (LDA) effect size, exhibiting the genera significantly more abundant in the rearing water A) hosting zoea that stayed healthy during the zoea stage (NTA0 Zoea Good), hosting zoea that were healthy at the beginning of the zoea stage and unhealthy at the end (NTSA Zoea Good, corresponding to the rearing day 2 and 3) and hosting zoea with high mortality rate at the end of the zoea stage (NTSA Zoea Bad, corresponding to the rearing day 4 to 6); **B)** hosting healthy mysis (Mysis Good) and unhealthy mysis (Mysis Bad). Genera wrote in blue are biomarkers enriched in the rearing water hosting both healthy zoea and mysis. Genera wrote in red are enriched in the rearing water hosting both unhealthy zoea and mysis. Genera wrote in purple were detected as biomarkers of the unhealthy zoea and healthy mysis. Genus wrote in brown was enriched in the rearing water hosting zoea that were healthy at the beginning of the zoea stage and unhealthy at the end and in the rearing water with unhealthy mysis.

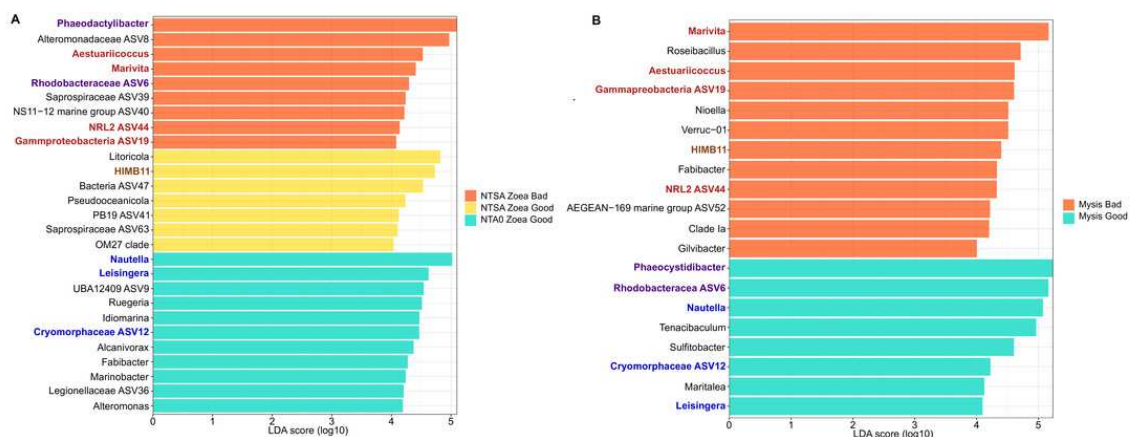


Table 1 (on next page)

Time series of larval stage

Time series of larval stage compared to the reference larval stage index to reach each day (e.g.: usual larval stage obtained for a specific day; stage reference has been calculated for each day using data of 10 years of successful rearing; Ifremer data, Pham comm. Pers.); D0 to D9 correspond to the day of the rearing, D10 was added to shown that the larvae were mostly at the Post larvae stage on D10 (excepted in tank With-C). Each color corresponds to a specific larval stage, when in black that means that the larvae were all dead in the tanks. Without-A, Without-B, Without-C, correspond to the rearing tanks without antibiotics; and With-A, With-B, With-C, stand for the rearing tanks with antibiotics. The considering larval stage was named, when more than 75% of observed the larvae

Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs

	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Without-A	Nauplii	Nauplii	Zoea 1	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 3	Zoea 3	Mysis 1	Mysis 2		
Without-B	Nauplii	Nauplii	Zoea 1	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 3	Mysis 1	Mysis 1		
Without-C	Nauplii	Nauplii	Zoea 1	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 3	Mysis 1	Mysis 2		
With-A	Nauplii	Nauplii	Zoea 1	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 3	Zoea 3	Mysis 1	Mysis 1	Mysis 2	Post Larvae
With-B	Nauplii	Nauplii	Zoea 1	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 3	Zoea 3	Mysis 1	Mysis 2	Mysis 3	Post Larvae
With-C	Nauplii	Nauplii	Zoea 1	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 3	Zoea 3	Mysis 1	Mysis 2	Mysis 2	Mysis 3
Reference	Nauplii	Nauplii	Zoea 1	Zoea 2	Zoea 2	Zoea 3	Mysis 1	Mysis 2	Mysis 3	Post Larvae	Post Larvae

Table 2

PERMANOVA

PERMANOVA using Bray-Curtis distance showing that the variation of the microbial community is explained by all the monitored variables: rearing day, treatment (control, rearing water with antibiotics, rearing water without antibiotics), larval survival rate, larval stage, larval stage and survival rate; and the combine variable rearing day and treatment. Only 8.3% of the variability between the samples is not explained by the listed variables. Bold values indicate significant correlation ($P < 0.05$).

	R ²	P-value
Rearing day	36%	0.0001
Treatment	25.4%	0.0001
Larval survival rate	6.5%	0.0001
Larval stage	5,3%	0.0001
Larval stage and survival rate	5%	0.0001
Rearing day and treatment	13.5%	0.0001
Residual	8.3%	
Total	100%	

VI.4- Synthèse des résultats et perspectives

La première étude (article 4) montre une eutrophisation de l'eau au cours d'élevages larvaires présentant d'importants taux de mortalités et ce avec ou sans ajout d'antibiotique. Cette augmentation de la concentration en sels nutritifs et en matière organique dissoute était également observée dans l'article 3 (chap. V, partie V.2) consacré à l'étude d'élevages larvaires en bonne santé. Ces résultats suggèrent que l'eutrophisation du milieu d'élevage n'est ni une cause ni une conséquence des mortalités larvaires observées. Cependant, elle correspond tout de même à des modifications drastiques du milieu d'élevage susceptibles d'influencer les communautés microbiennes présentes. Cela est mis en évidence par les ordonnancements des 2 études présentées dans ce chapitre avec un regroupement des échantillons en fonction du jour d'élevage. L'article 5 démontre d'ailleurs que ce facteur explique 36% de la variabilité de la diversité procaryotique observée dans les échantillons. Cependant, il met également en évidence d'autres éléments susceptibles d'influencer les communautés procaryotiques de l'eau d'élevage : l'ajout ou non d'antibiotique (25,4%), l'état de santé des larves (6,5%) et le stade de développement des larves (5%). Malgré l'impact des antibiotiques au sein des élevages, l'article 4 met en évidence, à J1, un core microbien correspondant à 97% de l'abondance relative totale des échantillons d'eau avec ou sans antibiotiques et suggère ainsi que les communautés bactériennes les plus impactées sont les communautés rares. Les bactéries majoritaires composant ce core microbien sont affiliées aux familles *Marinobacteraceae*, *Alteromonadaceae* et *Rhodobacteraceae*. En comparant les eaux d'élevages de larves à différents stades de développement et en bonne ou mauvaise santé (eaux d'élevage des larves aux stades nauplii en bonne santé, zoé en bonne santé, zoé en mauvaise santé, mysis en bonne santé, mysis en mauvaise et en très mauvaise santé), un autre core microbien composé de 54 OTUs affiliés aux familles *Alteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Saprospiraceae*, *Litoricolaceae*, *Beggiatoaceae*, *Pseudalteromonadaceae* et *Vibrionaceae* est mis en évidence. Parmi ces 54 OTUs, 52 sont également identifiés dans les eaux de remplissage et de réserve suggérant une forte influence de ces intrants tout au long de l'élevage. Cela est également montré par l'article 5 qui présente un core microbien partagé par l'ensemble des échantillons d'eau de 137 ASVs dont 136 sont mis en évidence dans les eaux de remplissage et de réserve. En utilisant des LEfSe, les 2 études de ce chapitre révèlent des biomarqueurs bactériens de l'état de santé des élevages. L'article 4 met ainsi en évidence, dans l'eau d'élevage, la famille des *Marinobacteraceae* comme marqueur des larves nauplii en bonne santé ainsi que les *Thalassospiraceae* et *Saprospiraceae* comme indicateurs de bonne santé des larves au stade zoé. En revanche, les *Litoricolaceae* et les *Microbacteraceae* sont respectivement identifiés comme des biomarqueurs des larves zoé et mysis en mauvaise santé. L'article 5 montre que les bactéries affiliées aux genres *Nautella*, *Leisingera*, *Ruegeria*, *Alcanivorax*, *Marinobacter* et *Tenacibaculum* sont enrichies dans l'eau d'élevage des larves en bonne santé alors que les *Marivita*, *Aestuariicoccus*, *HIMB11* et *Nioella* sont plus abondants dans l'environnement des larves en mauvaise santé. De manière intéressante, les genres *Ruegeria* et *Leisingera* avaient également été identifiés comme potentiels taxa bénéfiques dans l'article 3 présenté dans le chapitre V. Dans les 2 études de ce chapitre VI, l'identification des biomarqueurs, en amont des élevages dans les eaux de remplissage et de réserve, suggère la possibilité de mettre au point des outils de biosurveillance non invasifs de type PCR ou qPCR qui pourraient permettre une détection précoce de mortalités larvaires à venir. Cependant, ces analyses conduites à

Chapitre VI – Caractérisation des communautés procaryotiques de l'eau d'élevage au cours de mortalités larvaires : identification de biomarqueurs

l'échelle d'une seule éclosion limitent la découverte de biomarqueurs utilisables à l'échelle du territoire, dans l'ensemble des éclosions de la Nouvelle-Calédonie. En conséquence, une méta-analyse a été réalisée en regroupant l'ensemble des échantillons considérés au cours de cette thèse. Elle est présentée dans le chapitre suivant (chap. VII).

CHAPITRE VII

Méta-analyse : cores microbiens et biomarqueurs bactériens

VII- Chapitre VII – Méta-analyse : cores microbiens et biomarqueurs bactériens

Ce chapitre présente une méta-analyse incluant l'ensemble des échantillons considérés au cours de ce projet de thèse. Son objectif est de mettre en évidence de potentiels biomarqueurs bactériens de l'état de santé des élevages afin de développer des outils de biosurveillance précoces, de type PCR ou qPCR, utilisables à l'échelle du territoire. À terme, le but de cette première approche est de développer des amorces (PCR ou qPCR) permettant d'identifier des microorganismes cibles au moment du lancement des élevages (remplissage des réserves et pontes des œufs).

Dans un premier temps, la diversité procaryotique globale des échantillons d'élevage (eau d'élevage et larves de J0 à J9) a été évaluée et comparée par des NMDS (non-metric dimensional scaling) basées sur différentes matrices de distances obtenues à partir des données normalisées par les méthodes DESeq2 ou CPM (chap. III, parties III.4.2.b et III.4.2.c). Dans un second temps, les ASVs communs à l'ensemble des eaux d'élevage et des larves ont été recherchés afin de mettre en évidence les cores microbiens associés à chaque condition. Enfin, l'identification de biomarqueurs a consisté en une analyse des ASVs différentiellement abondants entre les larves en bonne et en mauvaise santé ainsi qu'entre les eaux d'élevage hébergeant ces larves.

VII.1- Normalisation par les méthodes DESeq2 et CPM et ordonnancements de l'ensemble des échantillons d'élevage

VII.1.1- Rappel des méthodes d'analyse de la diversité bêta

Le premier objectif de cette méta-analyse était de comparer la diversité procaryotique totale de l'ensemble des échantillons d'élevage considérés au cours de cette thèse. Ces échantillons ont été séquencés au cours de 3 séquençages distincts, réalisés à des profondeurs différentes (chap. IV, partie IV.1.1) et menant à des bibliothèques de tailles variables (chap. III, partie III.4.1) au sein de la table globale finale (taille minimale = 12 744 séquences, taille maximale = 2 279 931 séquences). Une normalisation des données a donc d'abord dû être réalisée. La méthode de normalisation par CPM (chap. III, partie III.4.2.b), utilisée pour les autres analyses de ce projet, a été envisagée. Cependant, elle se base sur les proportions et ne permet donc pas de corriger correctement la surdispersion d'un jeu de données (chap. III, partie III.4.3). Nous avons donc considéré une seconde méthode de normalisation, DESeq2 (chap. III, partie III.4.2.c), afin de comparer les résultats obtenus par ces 2 approches et ainsi choisir la stratégie la plus adaptée aux données utilisées. Pour chaque table d'ASVs obtenue (normalisée par CPM ou normalisée par DESeq2), différentes matrices de distances (Bray-Curtis, Jaccard, UniFrac, weighted UniFrac) (chap. II, partie II.6) ont été construites pour ensuite effectuer des analyses d'ordonnement par NMDS.

La NMDS est une analyse multivariée visant à réduire les dimensions d'un jeu de données. Elle a ainsi pour objectif de représenter, dans un graphique en 2D, une matrice de distances multidimensionnelle calculée à partir de la table d'ASVs d'intérêt (chap. I, partie I.4.1.a). La construction de cette matrice de distances permet d'évaluer la ressemblance des échantillons entre eux. Une distorsion des distances, résultant de la réduction de dimensions

entraînée par la NMDS, peut impacter les interprétations biologiques effectuées à partir des ordonnancements obtenus. En conséquence, une valeur de stress est calculée pour évaluer l'effet de la transformation graphique sur la représentation des distances. Si cette valeur est inférieure à 0,1 alors les distances ne sont pas impactées par la réduction de dimensionnalité. Inversement, si le stress est supérieur à 0,2 alors la NMDS conduit à des interprétations biologiques fausses et une autre analyse multivariée doit être utilisée (PCoA par exemple). En revanche, si la valeur de stress est comprise entre 0,1 et 0,2 alors la transformation graphique impacte la représentation des distances mais les interprétations biologiques peuvent être correctes. Dans ce dernier cas, une approche comparative de différentes NMDS, construites à partir de différentes matrices de distances, permet ainsi de considérer l'ensemble des résultats possibles.

VII.1.2- Interprétation des résultats

Les NMDS réalisées à partir des matrices de distance de Jaccard, UniFrac et Bray-Curtis apportent des conclusions similaires quelle que soit la méthode de normalisation considérée (DESeq2 ou CPM) (Fig. 55). En effet, dans les 2 cas, 2 groupes principaux se distinguent. Ils correspondent aux échantillons des élevages de la SASV (Station Aquacole de Saint Vincent, campagnes M1, M3 et M4) et des écloséries privées (E1 et E2). Plus spécifiquement, les échantillons récoltés au cours des campagnes M1 et M3, réalisées en septembre (saison fraîche) et novembre 2018 (saison intermédiaire), se différencient de ceux récoltés pendant la campagne M4, réalisée en février 2019 (saison chaude). Ce regroupement d'échantillons pourrait s'expliquer par des variations saisonnières impactant les communautés procaryotiques associées aux élevages. Cependant, il est probable que ces différences résultent également des biais de profondeur de séquençage persistant malgré les normalisations appliquées (chap. III, partie III.4.1). En parallèle, une séparation des échantillons des écloséries privées 1 et 2 (campagnes E1 et E2) est également observée et suggère que les larves et les eaux issues d'une même éclosérie présentent des communautés procaryotiques similaires. Cela pourrait s'expliquer par l'influence des eaux de remplissage provenant de baies géographiquement éloignées mais aussi par les différents protocoles d'élevage utilisés dans les écloséries (antibiotique, nourriture, traitement de l'eau, volume des bacs d'élevage, etc.) (chap. II, partie II.1).

En observant la NMDS basée sur la matrice de distances weighted UniFrac obtenue à partir des données normalisées par la méthode DESeq2 (Fig. 55A), une distinction des échantillons de la SASV est toujours visible mais les échantillons des écloséries privées se confondent. Contrairement aux élevages suivis dans les écloséries privées, les élevages considérés au cours des campagnes à la SASV ont été confrontés à des épisodes de fortes mortalités larvaires ou ont montré un développement larvaire ralenti (Tab. 12). L'ordonnancement weighted UniFrac basée sur les données DESeq2 pourrait ainsi montrer un effet de l'état de santé des élevages sur les compositions microbiennes des échantillons. Cependant, certains élevages conduits au cours de la campagne M4 ont montré des taux de survie similaires ou supérieurs aux valeurs de référence et cette distinction pourrait ainsi résulter des différents antibiotiques (érythromycine à la SASV, oxytétracycline dans les écloséries privées) ou volumes des bacs d'élevage (100l à la SASV, 10 m³ dans les écloséries privées) utilisés par la SASV et les écloséries privées.

La NMDS basée sur la matrice de distances weighted UniFrac obtenue à partir des données normalisées par CPM (Fig. 55B) ne permet pas une visualisation claire à cause

d'échantillons divergents. Cela peut être expliqué par une surdispersion encore trop importante au sein du jeu de données malgré la normalisation appliquée. En conclusion, il semblerait que la méthode de normalisation par DESeq2 soit la plus adaptée aux données considérées et elle sera conservée pour la suite de la méta-analyse ; à l'exception des analyses réalisées avec ANCOM-BC (Mandal et al. 2015; Lin & Peddada 2020) qui possède une méthode de normalisation propre.

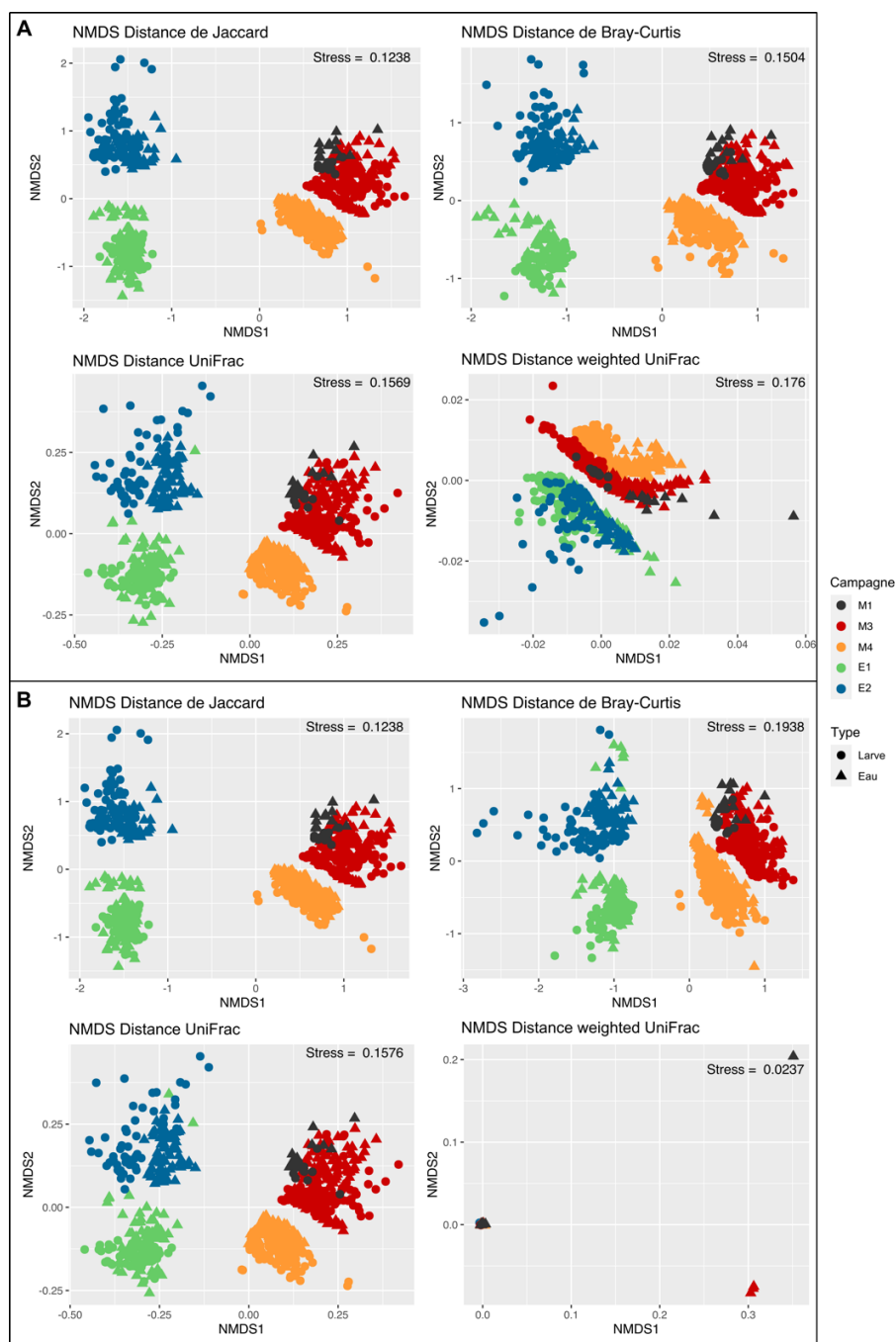


FIGURE 55 – NMDS (Non-Metric Dimensional Scaling) basées sur des matrices de distances de Jaccard, Bray-Curtis, UniFrac ou weighted UniFrac obtenues à partir des données d'élevage normalisées par A) la méthode DESeq2 ou B) la méthode CPM.

Les échantillons récoltés au sein des élevages réalisés à la SASV (campagnes M1, M3 et M4) sont représentés en noir, rouge et orange alors que ceux prélevés au cours des campagnes dans les écloséries privées (E1 et E2) sont représentés en vert et en bleu.

Chapitre VII – Méta-analyse : cores microbiens et biomarqueurs bactériens

TABLEAU 12 – Taux de survie des bacs d'élevage suivis au cours des campagnes M1 (encadrées en noir), M3 (encadrées en rouge), M4 (encadrées en orange), E1 (encadrées en vert) et E2 (encadrées en bleu).

Les taux de survie sont quotidiennement calculés de J0 (jour d'ensemencement des larves dans les bacs d'élevage) à J9 (transition au stade post-larve). Les taux de survie indiqués dans le tableau sont ceux relevés au dernier jour d'élevage d'observation de larves vivantes. Si le jour indiqué est inférieur à 9 alors la totalité des larves du bac considéré étaient mortes le jour suivant. Le dernier jour d'observation de larves vivantes est indiqué dans la colonne « Jour ». Les taux de survie notés en rouge correspondent aux échantillons des élevages considérés comme étant en mauvaise santé (larves n'ayant pas survécu jusqu'à J9 ou plus de 5% de différence avec le taux de survie attendu à J9, 70%, soit un seuil fixé à 66,5%). Le stade de développement des larves présentant un taux de survie attendu à J9 est précisé dans la colonne « stade larvaire à J9 ». Plusieurs conditions, réalisées en triplicats, ont été considérées selon le traitement de l'eau d'élevage (traitée, T ou non traitée, NT) et l'ajout ou non d'antibiotique (A0 pour ajout à partir de J0, A3 pour ajout à partir de J3 ou SA pour sans antibiotique). Les campagnes E1 et E2 ont été réalisées dans des écloséries privées ayant chacune un protocole d'élevage spécifique décrit dans le chapitre II (parties II.1.2 et II.1.3). Dans ces écloséries, 2 suivis d'élevages larvaires consécutifs ont été réalisés (A et B).

CAMPAGNE	CONDITION	JOUR	NUMÉRO DE RÉPLICAT	TAUX DE SURVIE (%)	STADE LARVAIRE À J9
M1	TA3	4	1	25,56	
M1	TA3	4	2	25,56	
M1	TA3	3	3	23,89	
M3	TA0	9	1	14,44	
M3	TA0	9	2	16,11	
M3	TA0	9	3	56,67	
M3	TSA	9	1	21,11	
M3	TSA	9	2	41,67	
M3	TSA	9	3	31,11	
M3	NTA0	9	1	62,78	
M3	NTA0	9	2	59,44	
M3	NTA0	9	3	56,11	
M3	NTSA	9	1	5,56	
M3	NTSA	9	2	12,22	
M3	NTSA	9	3	15,56	
M4	TA3	9	1	66,67	Mysis 2 – Mysis 3
M4	TA3	9	2	57,22	
M4	TA3	9	3	53,89	
M4	TSA	7	1	1,67	
M4	TSA	9	2	12,22	
M4	TSA	9	3	33,33	
M4	NTA0	9	1	72,22	Mysis 2 – Mysis 3
M4	NTA0	9	2	73,89	Mysis 2 – Mysis 3
M4	NTA0	9	3	85	Mysis 2 – Mysis 3
M4	NTA3	9	1	79,44	Mysis 2 – Mysis 3
M4	NTA3	9	2	81,67	Mysis 2 – Mysis 3
M4	NTA3	9	3	40,56	
M4	NTSA	8	1	7,22	
M4	NTSA	8	2	6,67	
M4	NTSA	8	3	14,44	
E1	Suivi A	9	1	94,74	Mysis 3 – Post-larve
E1	Suivi A	9	2	81,58	Mysis 3 – Post-larve
E1	Suivi A	9	3	68,42	Mysis 3 – Post-larve
E1	Suivi B	9	1	73,68	Mysis 3 – Post-larve
E1	Suivi B	9	2	78,95	Mysis 3 – Post-larve
E1	Suivi B	9	3	68,42	Mysis 3 – Post-larve
E2	Suivi A	9	1	86,59	Mysis 3 – Post-larve
E2	Suivi A	9	2	91,55	Mysis 3 – Post-larve
E2	Suivi A	9	3	87,10	Mysis 3 – Post-larve
E2	Suivi B	9	1	76,97	Mysis 3 – Post-larve
E2	Suivi B	9	2	84,65	Mysis 3 – Post-larve
E2	Suivi B	9	3	84,64	Mysis 3 – Post-larve

VII.2- Recherche de cores microbiens

VII.2.1- Identification des ASVs

Une comparaison des cores microbiens associés aux échantillons d'eau d'élevage et de larves a permis de mettre en évidence 9 ASVs spécifiquement associés à l'ensemble des échantillons d'eau, 3 ASVs uniquement identifiés dans les échantillons de larves et 5 ASVs communs à l'ensemble des échantillons d'élevage, soit un total de 17 ASVs (Fig. 56A). L'ensemble de ces ASVs est affilié au phylum des *Proteobacteria* et plus spécifiquement aux classes des *Alphaproteobacteria* et des *Gammaproteobacteria*. Ces observations sont en accord avec les études intégrées dans les chapitres IV à VI (Giraud et al. 2021; 2022; *In prep.*; Callac et al. 2022; *In review*) ainsi qu'avec la littérature présentée dans le chapitre I (partie I.3.4). En effet, ces recherches montrent une prédominance de bactéries affiliées aux *Proteobacteria* au sein du microbiote associé aux élevages de différentes espèces de crevettes (Cornejo-Granados et al. 2018) et ce à tous les stades larvaires (Zheng et al. 2017; Xue et al. 2018; Wang et al. 2020a; b; Giraud et al. 2021; 2022; Callac et al. 2022), post-larvaires (Garibay-Valdez et al. 2020), juvéniles (Xiong et al. 2014; Li et al. 2018) et adultes (Zeng et al. 2017).

Parmi les 17 ASVs mis en évidence, 8 ont été identifiés comme appartenant à la famille des *Rhodobacteraceae* (6 ASVs spécifiques aux eaux d'élevage et 2 communs aux eaux et aux larves, Fig. 56B et 56D). Ces bactéries sont connues pour leur diversité métabolique et écologique et sont mises en évidence dans des écosystèmes divers allant du sol aux plantes en passant par les eaux douces et marines (Garrity et al. 2015). Wang et al. (2020b) ont suggéré que les *Rhodobacteraceae*, acquises au moment de l'ouverture de la bouche des larves au stade zoé, persistaient tout au long de la vie des animaux et appartenaient ensuite au microbiote intestinal des crevettes adultes de *P. vannamei*, renforçant ainsi les hypothèses émises dans le chapitre IV quant au maintien de certains microorganismes procaryotiques au cours du développement de *P. stylirostris*. Les auteurs proposent également que ces procaryotes pourraient être impliqués dans les processus de digestion et d'inhibition de pathogènes et ainsi constituer une potentielle source de bactéries probiotiques.

Au-delà des *Rhodobacteraceae* mises en évidence dans le core microbien des eaux d'élevage, 3 ASVs affiliés à la famille des *Stappiaceae* et aux genres *Alcanivorax* et *Litoricola*, ont également été trouvés (Fig. 55B). À notre connaissance, les *Stappiaceae* ont uniquement été mises en évidence dans les eaux contrôle de l'étude 4 présentée dans le chapitre VI (partie VI.2). Cependant, les membres de cette famille bactérienne ont longtemps été considérés comme appartenant aux *Rhodobacteraceae* (Hördt et al. 2020), ce qui pourrait expliquer leur non identification en contexte aquacole. En effet, l'ordre des *Rhizobiales*, dont font partie les *Stappiaceae*, a été mis en évidence dans les branchies de crevettes *P. vannamei* adultes (Lv et al. 2020) et dans le microbiote intestinal de plusieurs espèces de poissons (Ikeda-Ohtsubo et al. 2018) suggérant qu'ils pourraient également appartenir aux populations procaryotiques associées à l'environnement d'élevage des larves de *P. stylirostris*. Le genre *Alcanivorax*, connu pour ses capacités à utiliser les hydrocarbures comme substrat (Golyshin et al. 2002), a été isolé à partir de sédiments de bassins de crevettes adultes (Rahul et al. 2014) et a été identifié dans les intestins de langoustes juvéniles (Ooi et al. 2017). Dans cette dernière étude, il a été suggéré que les membres de ce genre bactérien pourraient jouer un rôle dans le métabolisme des lipides de leur hôte (Ooi et al. 2017). Le genre *Litoricola* a été mis en évidence comme dominant dans l'eau et les sédiments de crevettes *P. vannamei* juvéniles où

il était positivement corrélé aux paramètres physiologiques des animaux (activité superoxyde dismutase, activité anti-bactérienne, capacité antioxydante totale) (Huang et al. 2018). Les auteurs ont suggéré que ces bactéries, présentes dans l'environnement d'élevage, étaient capables de stimuler le système immunitaire des animaux.

Dans les larves, le core microbien mis en évidence est affilié aux genres *Pseudoalteromonas* et *Vibrio* (Fig. 56B). Les *Pseudoalteromonas* sont considérées comme des sources prometteuses de probiotiques en aquaculture car elles synthétisent des molécules antimicrobiennes et présentent des propriétés algicides (Longeon et al. 2004). En Nouvelle-Calédonie, la souche de *Pseudoalteromonas* NC201 a d'ailleurs montré un potentiel probiotique dans les élevages larvaires de *P. stylirostris* (Pham et al. 2014; Sorieul et al. 2018; 2019). Le genre *Vibrio* a été identifié au sein d'élevages d'espèces de crevettes distinctes à différents stades de développement suggérant que ce genre est présent tout au long de la vie des animaux quel que soit leur état de santé (Vandenberghe et al. 1999; Zheng et al. 2017; Cornejo-Granados et al. 2018; Wang et al. 2020a).

Le genre bactérien *Nautella*, mis en évidence dans le core microbien associé à l'ensemble des échantillons d'élevage (Fig. 56C), a été identifié comme enrichi dans les larves de *P. vannamei* en mauvaise santé, et a ainsi été proposé comme biomarqueur de la dégradation de l'état de santé des animaux (Zheng et al. 2017). Cependant, son identification au sein d'élevages larvaires sains (Xue et al. 2018; Wang et al. 2020a) suggère, comme pour les *Vibrios*, que les membres du genre *Nautella* appartiennent au core microbien des larves de crevettes de *P. stylirostris* indépendamment de l'état de santé des élevages. Il est néanmoins possible que certaines espèces affiliées à ces genres puissent devenir néfastes sous certaines conditions et entraîner une dégradation de la santé des animaux (Egan & Gardiner 2016). Enfin, la mise en évidence d'ASVs affiliées aux genres *Alteromonas* et *Aestuariibacter* dans le core microbien de l'ensemble des échantillons d'élevage (Fig. 56C) renforce nos hypothèses quant à l'appartenance de ces taxa bactériens au core microbien des élevages de *P. stylirostris* (article 1, chap. IV, partie IV.1).

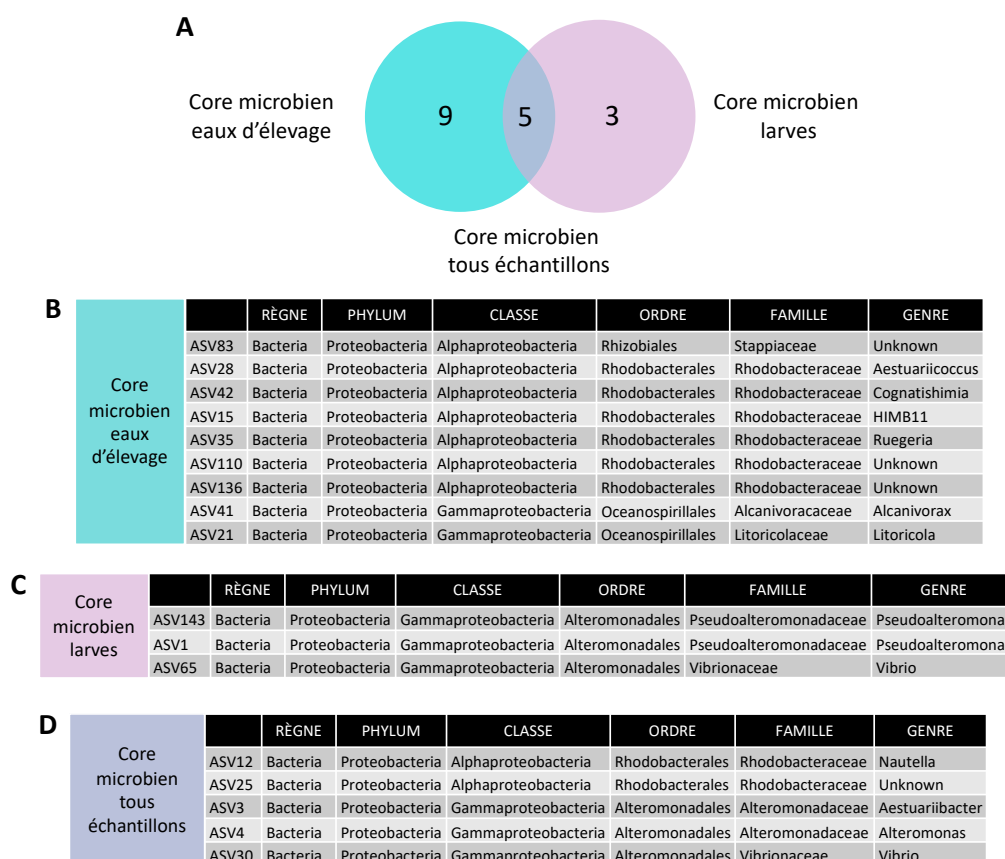


FIGURE 56 – A) Diagramme de Venn des ASVs mis en évidence dans les cores microbiens des eaux d'élevage, des larves et de l'ensemble des échantillons. Taxonomie des ASVs identifiés dans les cores microbiens B) des eaux d'élevage, C) des larves et D) de l'ensemble des échantillons d'élevage (communs eaux et larves).

VII.2.2- Influence des intrants

Les 17 ASVs mis en évidence par les analyses de core microbien ont été recherchés dans les eaux de remplissage et de réserve ainsi que dans les œufs de l'ensemble des élevages, afin d'évaluer s'ils étaient déjà présents au moment de l'ensemencement des larves (Tab. 13). À l'exception de l'ASV42, absent des eaux de remplissage et de réserve de l'écloserie privée 2 (campagne E2), l'ensemble des ASVs appartenant au core microbien des eaux d'élevage sont mis en évidence dès le remplissage des réserves de l'ensemble des écloséries. Ces ASVs semblent ensuite persister dans les élevages malgré les traitements d'eau (chap. II, partie II.1). De la même manière, les ASVs appartenant au core microbien des larves sont présents en amont des élevages larvaires, dans les œufs ainsi que dans les eaux de réserve, suggérant une persistance de communautés procaryotiques acquises dès le début de la vie des larves et renforçant les hypothèses émises dans le chapitre IV quant au maintien de certains taxa bactériens au cours du développement de *P. stylirostris*. Enfin, les ASVs appartenant au core microbien de tous les échantillons sont également identifiés dès le début de l'élevage. Ainsi, les 17 ASVs considérés sont mis en évidence dans la quasi-totalité des eaux de remplissage (provenant du lagon), des eaux de réserve (alimentant les bacs d'élevage) et des œufs. Ces résultats soulignent l'importance des intrants dans le devenir des communautés microbiennes des élevages.

TABLEAU 13 – Comptages non normalisés des ASVs identifiés dans les cores microbiens des eaux d'élevage, des larves et de l'ensemble des échantillons d'élevage.

Seuls les eaux de remplissage (lagon), les eaux de réserve et les œufs sont considérés (intrants initiaux). Lorsque plusieurs échantillons d'un même intrant étaient disponibles, une moyenne a été calculée. L'ASV42, noté en gras, est le seul ASV, identifié dans le core microbien des eaux d'élevage, qui n'est pas identifié dans toutes les eaux de remplissage et de réserve. En effet, il est présent dans les eaux de remplissage et de réserve des campagnes M1, M3, M4 (élevages réalisés à la SASV) et E1 (élevages réalisés dans l'écloserie privée 1) mais absent pour la campagne E2 (élevages réalisés dans l'écloserie privée 2).

		M1			M3			M4			E1			E2		
		Lagon	Réserve	Œufs	Lagon	Réserve	Œufs	Lagon	Réserve	Œufs	Lagon	Réserve	Œufs	Lagon	Réserve	Œufs
Core microbien des eaux d'élevage	ASV15	606	174	19	895	484	1	15347	6620	696	54765	11280	26	12072	4787	128
	ASV21	531	684	28	650	362	14	4177	14434	369	27875	10955	52	11425	8143	166
	ASV28	3	213	0	16	39	5	19	101	61	96	61	2	312	117	27
	ASV35	6	3	12	5	6	6	43	93	297	204	160	150	182	56	940
	ASV41	177	114	19	35	114	1	682	3979	252	729	2346	19	1146	375	6
	ASV42	90	126	88	4	206	183	40	1169	933	93	173	12871	0	0	7
	ASV53	24	9	9	1	3	27	29	63	175	34	26	3323	12	1	35
	ASV83	111	69	4	34	185	2	6182	656	40	72	2203	0	5907	920	3
	ASV110	111	6	6	32	20	3	624	849	198	1926	1141	2	116	6	4
ASV136	108	75	15	7	191	3	174	1416	4237	76	252	64	47	25	5	
Core microbien des larves	ASV1	21	6	33	12	3	44	54	89	732	442	306	6263	314	185	3305
	ASV65	24	9	141	64	86	211	65	95	876	84	16	8769	53	1	747
	ASV143	36	9	17	13	6	30	35	76	621	28	39	2089	27	12	96
Core microbien des échantillons d'élevage	ASV3	51	93	489	143	314	351	106	644	57686	725	628	29530	539	171	1988
	ASV4	48	39	472	6	124	1195	95	287	17228	673	750	25837	1044	1541	97335
	ASV12	30	126	27	5	12	28	68	272	904	100	64	372	77	11	5481
	ASV25	72	30	6	17	30	4	17	29	215	104	93	115	21	12	423
	ASV30	99	201	314	47	35	473	188	191	14998	169	56	27026	225	3	782

VII.3- ASVs différenciellement abondants en fonction de l'état de santé des élevages

Dans l'objectif de mettre en évidence de potentiels biomarqueurs bactériens de l'état de santé des élevages, des analyses de différentiels d'abondance d'ASVs ont été effectuées en utilisant le package R ANCOMBC (Mandal et al. 2015; Lin & Peddada 2020). Bien que des LEfSe (analyse linéaire discriminante avec effet de taille) aient été utilisées pour les études présentées dans les chapitres V et VI (parties V.2, VI.2 et VI.3), la méthode ANCOM-BC a été préférée au cours de la méta-analyse, sur les conseils du Service Bioinformatique de l'Ifremer (SeBiMER), en raison du nombre important d'échantillons considérés.

VII.3.1- ASVs différenciellement abondants dans les eaux d'élevage

Dans un premier temps, les ASVs différenciellement abondants, selon le stade de développement des larves et leur état de santé, ont été mis en évidence en considérant uniquement les échantillons d'eau d'élevage. Les larves ont été considérées comme étant en mauvaise santé (en rouge dans le Tab. 12) si leur élevage n'a pas pu être conduit jusqu'au dernier jour de développement larvaire (J9) ou si les taux de survie étaient inférieurs aux valeurs attendues (plus de 5% d'écart par rapport à la valeur attendue, 70% à J9, c'est-à-dire une survie à J9 inférieure à 66,5%). Au total, 4 listes d'ASVs différenciellement abondants ont été obtenues. Elles correspondent aux ASVs dont les abondances sont significativement différentes entre les eaux hébergeant des larves aux stades 1) nauplii en bonne et en mauvaise santé, 2) zoé en bonne et en mauvaise santé, 3) zoé / mysis (larves en transition) en bonne et en mauvaise santé et 4) mysis en bonne et en mauvaise santé.

Dans un second temps, la construction d'un graphique UpSetR (Conway et al. 2017) a mis en évidence les ASVs communs ou spécifiques entre les 4 listes précédemment identifiées (nommées Nauplii, Zoé, Zoé/Mysis et Mysis dans la Fig. 57). L'approche UpSetR a été préférée au diagramme de Venn car elle permet une représentation plus claire d'un plus grand nombre d'ensembles (Conway et al. 2017). Ainsi, 184 ASVs sont identifiés comme étant différentiellement abondants entre les eaux d'élevage des larves en bonne et en mauvaise santé tout au long du développement des animaux (Fig. 57). L'abondance relative moyenne de ces 184 ASVs a été calculée (Fig. 58) permettant de mettre en évidence 121 ASVs avec une abondance plus importante dans les échantillons d'eau des élevages en bonne santé (Fig. 58A) et 63 ASVs majoritairement identifiés dans les eaux des élevages en mauvaise santé (Fig. 58B).

L'objectif de cette première méta-analyse est de mettre en évidence des biomarqueurs de l'état de santé des élevages, identifiables dans toutes les écloséries du territoire à n'importe quel moment du développement larvaire ; ainsi seuls ces 184 ASVs ont été conservés pour la suite de l'étude. Néanmoins, il serait intéressant de répéter les analyses présentées dans ce chapitre en considérant les autres ensembles d'ASVs mis en évidence par le graphique UpSetR (Fig. 57). Une telle approche pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs spécifiques de chaque stade de développement larvaire par exemple.

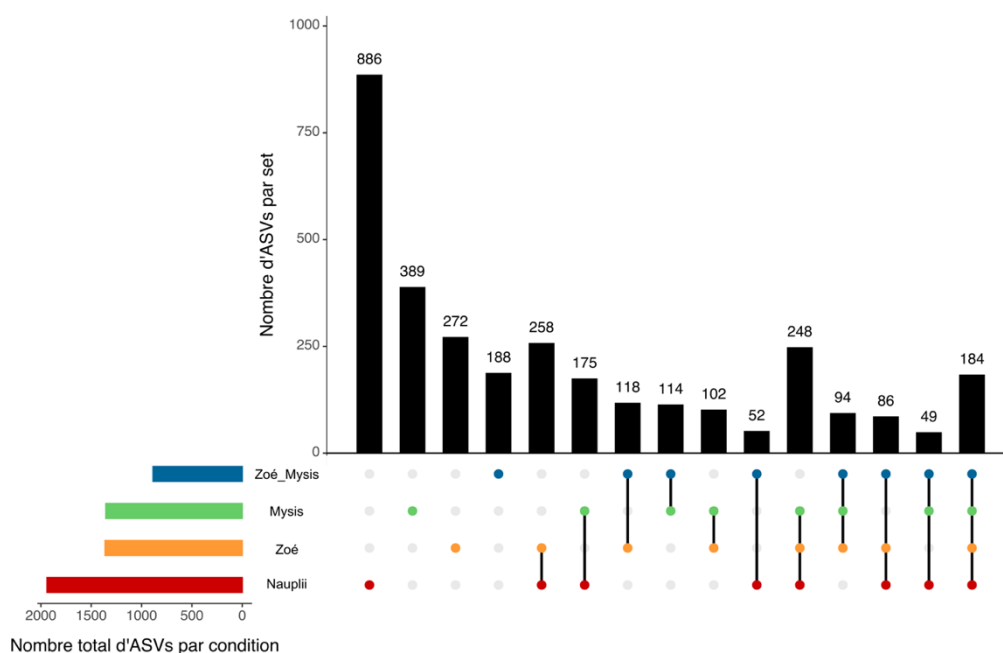


FIGURE 57 – Comparaison des ASVs différentiellement abondants dans les eaux d'élevage en fonction du stade larvaire et de l'état de santé des animaux.

Les conditions Nauplii, Zoé, Mysis et Zoé_Mysis correspondent respectivement aux ASVs différentiellement abondants entre les eaux hébergeant des larves aux stades nauplii en bonne et en mauvaise santé, zoé en bonne et en mauvaise santé, mysis en bonne et en mauvaise santé et zoé / mysis (larves en transition) en bonne et en mauvaise santé. Chaque point unique coloré désigne les ASVs spécifiques d'une condition (par exemple, 886 ASVs sont uniquement différentiellement abondants entre les eaux hébergeant des larves nauplii en bonne et en mauvaise santé). Plusieurs points colorés indiquent que les ASVs sont communs à plusieurs conditions (par exemple, 258 ASVs sont différentiellement abondants dans les eaux hébergeant des larves nauplii en bonne et en mauvaise santé mais aussi dans les eaux avec des larves au stade zoé en bonne et en mauvaise santé). Chaque ensemble d'ASV est désigné comme étant un set. Ainsi, un set de 184 ASVs est différentiellement exprimé dans les eaux tout au long du développement larvaire selon l'état de santé des animaux.

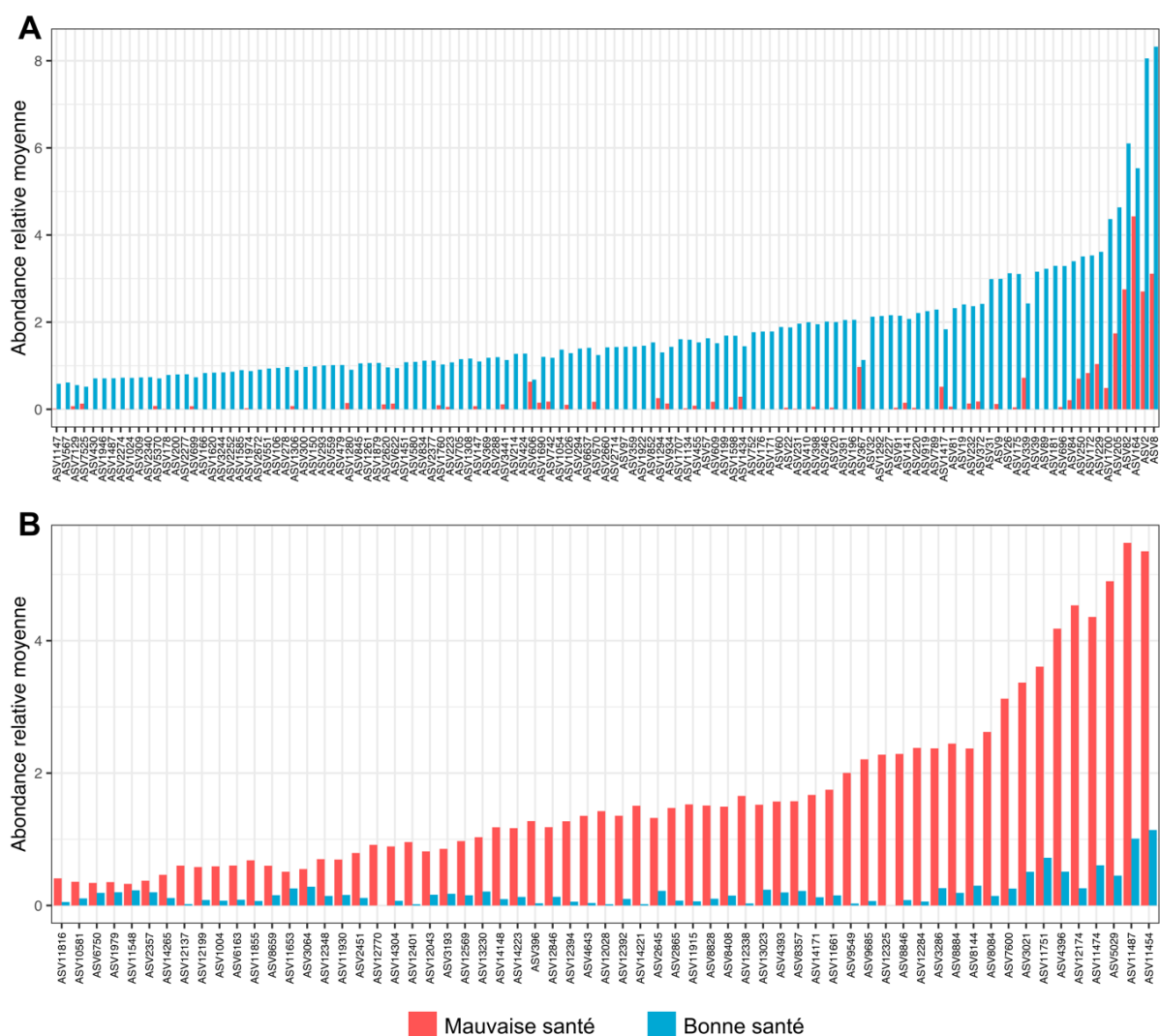


FIGURE 58 – Abondances relatives moyennes des ASVs différemment abondants mis en évidence par ANCOM-BC (184 ASVs). A) 121 ASVs plus abondants dans les eaux des élevages en bonne santé (bleu) par rapport aux élevages en mauvaise santé (rouge). B) 63 ASVs plus abondants dans les eaux des élevages en mauvaise santé (rouge) par rapport aux élevages en bonne santé (bleu).

L'abondance relative moyenne des ASVs a été calculée en utilisant la fonction « *get_group_abundance* » du package R *microbiomeutilities* (Lahti & Shetty 2020). Ainsi les abondances relatives des ASVs ont été calculées en moyennant l'ensemble des données des eaux des élevages en mauvaise santé, d'une part, et l'ensemble des données des eaux des élevages en bonne santé, d'autre part.

VII.3.2- ASVs différentiellement abondants dans les larves

En utilisant la même stratégie d'analyse pour les échantillons de larves que celle précédemment utilisée pour les échantillons d'eau d'élevage, 193 ASVs différentiellement abondants en fonction de l'état de santé des animaux ont été mis en évidence à chaque étape du développement larvaire (Fig. 59). Parmi ces 193 ASVs, 118 étaient majoritairement présents dans les larves en bonne santé (Fig. 60A) contre 75 dans les larves en mauvaise santé (Fig. 60B).

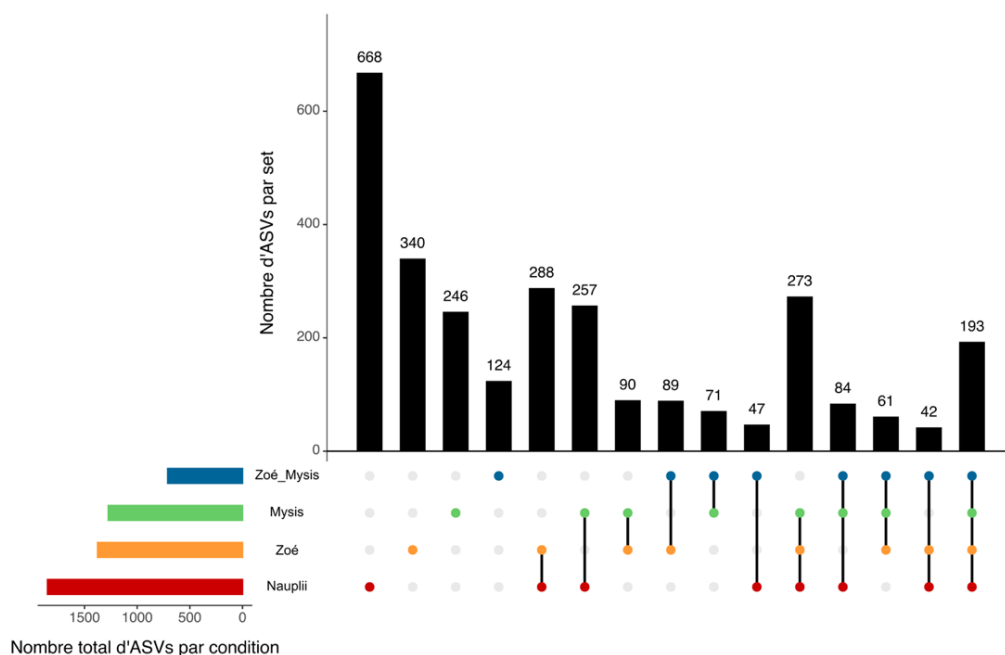


FIGURE 59 –ASVs différentiellement abondants dans les larves en fonction du stade larvaire et de l'état de santé des animaux.

Les conditions Nauplii, Zoé, Mysis et Zoé_Mysis correspondent respectivement aux ASVs différentiellement abondants entre les larves au stade nauplii en bonne et en mauvaise santé, au stade zoé en bonne et en mauvaise santé, au stade mysis en bonne et en mauvaise santé et aux stades zoé / mysis (larves en transition) en bonne et en mauvaise santé. Chaque point unique coloré désigne les ASVs spécifiques d'une condition (par exemple, 668 ASVs sont uniquement différentiellement abondants entre les larves nauplii en bonne et en mauvaise santé). Plusieurs points colorés indiquent que les ASVs sont communs à plusieurs conditions (par exemple, 288 ASVs sont différentiellement abondants dans les larves nauplii en bonne et en mauvaise santé mais aussi dans les larves au stade zoé en bonne et en mauvaise santé). Chaque ensemble d'ASV est désigné comme étant un set. Ainsi, un set (ou ensemble) de 193 ASVs est différentiellement exprimé dans les larves tout au long de leur développement en fonction de leur état de santé.

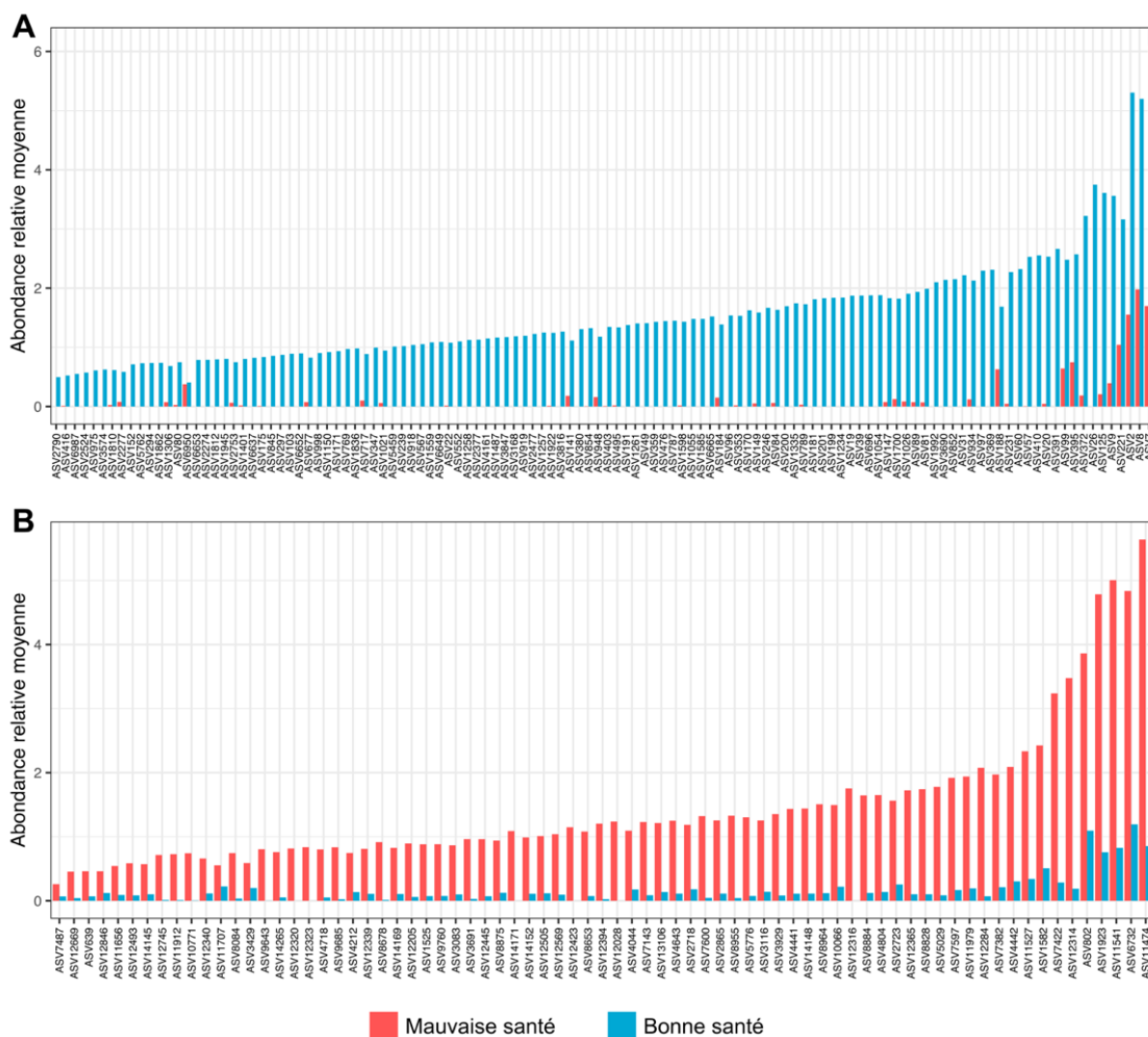


FIGURE 60 – Abondances relatives moyennes des ASVs différentiellement abondants mis en évidence par ANCOM-BC (193 ASVs). A) 118 ASVs plus abondants dans les larves en bonne santé (bleu) par rapport aux larves en mauvaise santé (rouge). B) 75 ASVs plus abondants dans les larves en mauvaise santé (rouge) par rapport aux larves en bonne santé (rouge).

L'abondance relative moyenne des ASVs a été calculée en utilisant la fonction « *get_group_abundance* » du package R *microbiomeutilities* (Lahti & Shetty, 2020). Ainsi les abondances relatives des ASVs ont été calculées en moyennant l'ensemble des données des larves en mauvaise santé, d'une part, et l'ensemble des données des larves en bonne santé, d'autre part.

VII.3.3- Comparaison des ASVs différentiellement abondants

Les analyses précédentes nous ont permis d'identifier 4 listes d'ASVs distinctes. Elles correspondent aux 121 ASVs plus abondants dans les eaux des élevages en bonne santé (Fig. 58A), aux 63 ASVs plus abondants dans les eaux des élevages en mauvaise santé (Fig. 58B), aux 118 ASVs plus abondants dans les larves en bonne santé (Fig. 60A) et aux 75 ASVs plus abondants dans les larves en mauvaise santé (Fig. 60B). Ces listes ont ensuite été comparées dans l'objectif d'identifier les ASVs communs ou partagés entre les eaux et les larves en fonction de l'état de santé des élevages. Pour cela, un graphique UpSetR a été construit (Fig.

61). Au total 310 ASVs ont ainsi été mis en évidence dont 189 sont associés aux élevages en bonne santé (71 dans les eaux, 68 dans les larves et 50 communs aux eaux et aux larves) et 121 sont associés aux élevages en mauvaise santé (58 dans les eaux, 46 dans les larves et 17 communs aux eaux et aux larves).

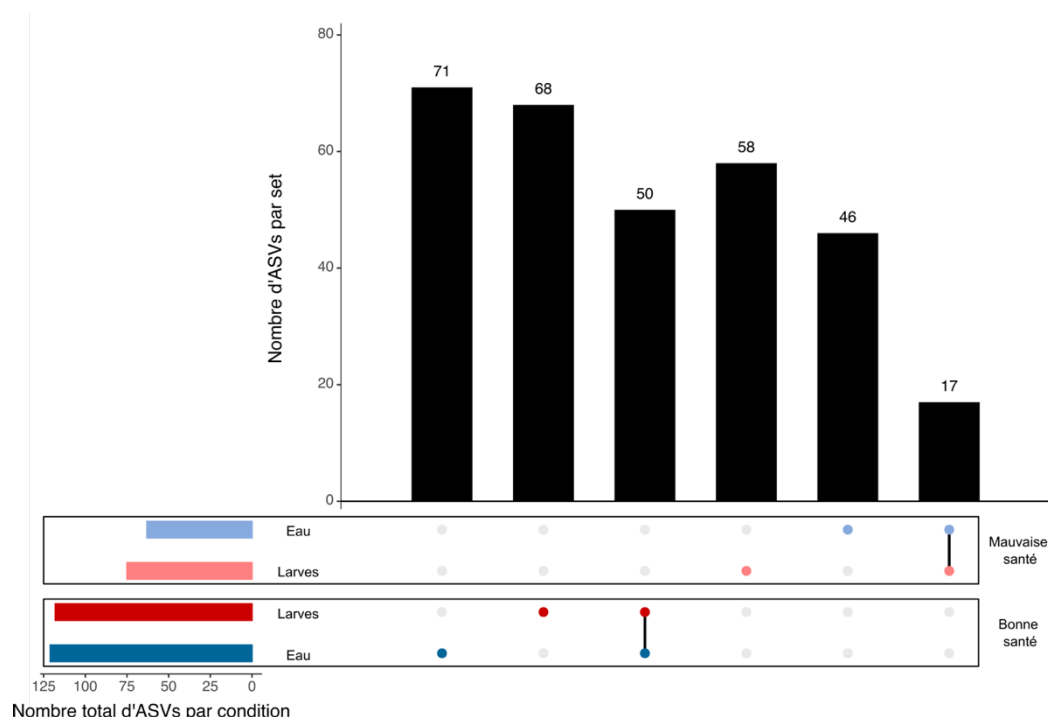


FIGURE 61 – Nombre d'ASVs présents dans les eaux d'élevage ou dans les larves en fonction de l'état de santé des animaux.

Les conditions Eau et Larves correspondent respectivement aux ASVs plus abondants dans les eaux des élevages en bonne ou en mauvaise santé et aux ASVs plus abondants dans les larves en bonne ou en mauvaise santé. Chaque point unique coloré désigne les ASVs spécifiques d'une condition (par exemple, 71 ASVs sont uniquement identifiés dans les eaux des élevages en bonne santé). Plusieurs points colorés indiquent que les ASVs sont communs à plusieurs conditions (par exemple, 50 ASVs sont communs aux eaux et aux larves des élevages en bonne santé). Chaque ensemble d'ASV est désigné comme étant un set.

VII.4- Influence des intrants et identification de potentiels biomarqueurs

VII.4.1- Biomarqueurs des élevages en bonne santé

Dans l'objectif de déterminer les potentielles communautés procaryotiques bénéfiques aux élevages, les 189 ASVs identifiés comme étant plus abondants dans les échantillons d'eau et de larves des élevages en bonne santé (Fig. 61) ont été considérés. Nous avons cherché si ces ASVs étaient mis en évidence dans les intrants (eau de remplissage du lagon, eau de réserve, œufs et nourriture) de l'ensemble des élevages analysés au cours de cette thèse (Fig. 62). À partir des résultats obtenus, une première sélection a été effectuée en éliminant les ASVs présents dans les intrants des élevages en mauvaise santé ; l'objectif étant d'identifier des communautés potentiellement bénéfiques présentes dès le démarrage des élevages larvaires. Ensuite, une seconde sélection a été réalisée en conservant les ASVs présents dans au moins un type d'intrant (eau de remplissage, eau de réserve, œufs,

microparticules et larves d'*Artemia* sp.) pour l'ensemble des élevages en bonne santé (uniquement campagnes E1 et E2) (Fig. 63). Cette stratégie analytique a permis d'identifier les ASVs plus abondants dans les élevages en bonne santé, présents dans les intrants de ces élevages et absents des intrants des élevages en mauvaise santé (Fig. 63). Plus spécifiquement, 33 ASVs (parmi 71 ASVs) sont identifiés dans les échantillons d'eau, 29 ASVs (parmi 68) sont mis en évidence dans les échantillons de larves et 28 ASVs (parmi 50 ASVs) sont communs aux échantillons d'eau et de larves (Fig. 63). Enfin, les ASVs qui n'ont pas pu être affiliés au-delà de la classe n'ont pas été considérés pour la suite des analyses. Ainsi 29 ASVs ont été considérés comme potentiels biomarqueurs des eaux des élevages en bonne santé (Tab. 14), 27 ASVs ont été identifiés comme des biomarqueurs putatifs des larves des élevages en bonne santé (Tab. 15) et 28 ASVs ont été mis en évidence comme biomarqueurs communs aux eaux et aux larves des élevages en bonne santé (Tab. 16) ; soit un total de 84 ASVs.

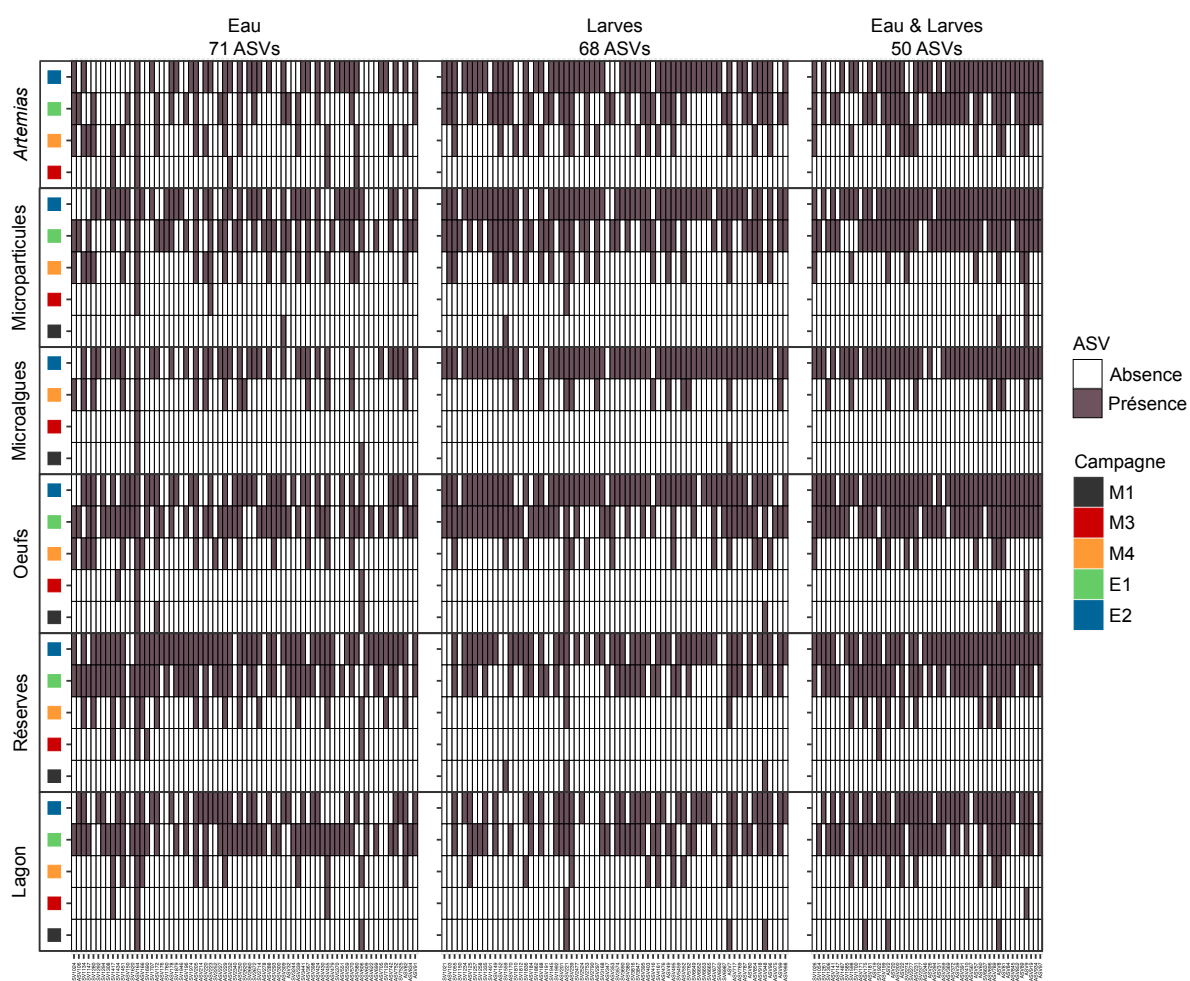


FIGURE 62 – Suivi de la présence / absence, dans les intrants, des 189 ASVs les plus abondants dans les échantillons d'eau et de larves des élevages en bonne santé. Les intrants (eau de remplissage provenant du lagon, eau de réserve, œufs, microalgues, microparticules et larves d'*Artemia* sp.) de l'ensemble des élevages suivis au cours des campagnes d'échantillonnage M1, M3, M4, E1 et E2 ont été considérés. Les 189 ASVs considérés correspondent aux ASVs identifiés par la figure 61 (71 ASVs plus abondants dans les eaux d'élevage en bonne santé, 68 ASVs plus abondants dans les larves en bonne santé, 50 ASVs plus abondants dans les eaux et dans les larves des élevages en bonne santé).

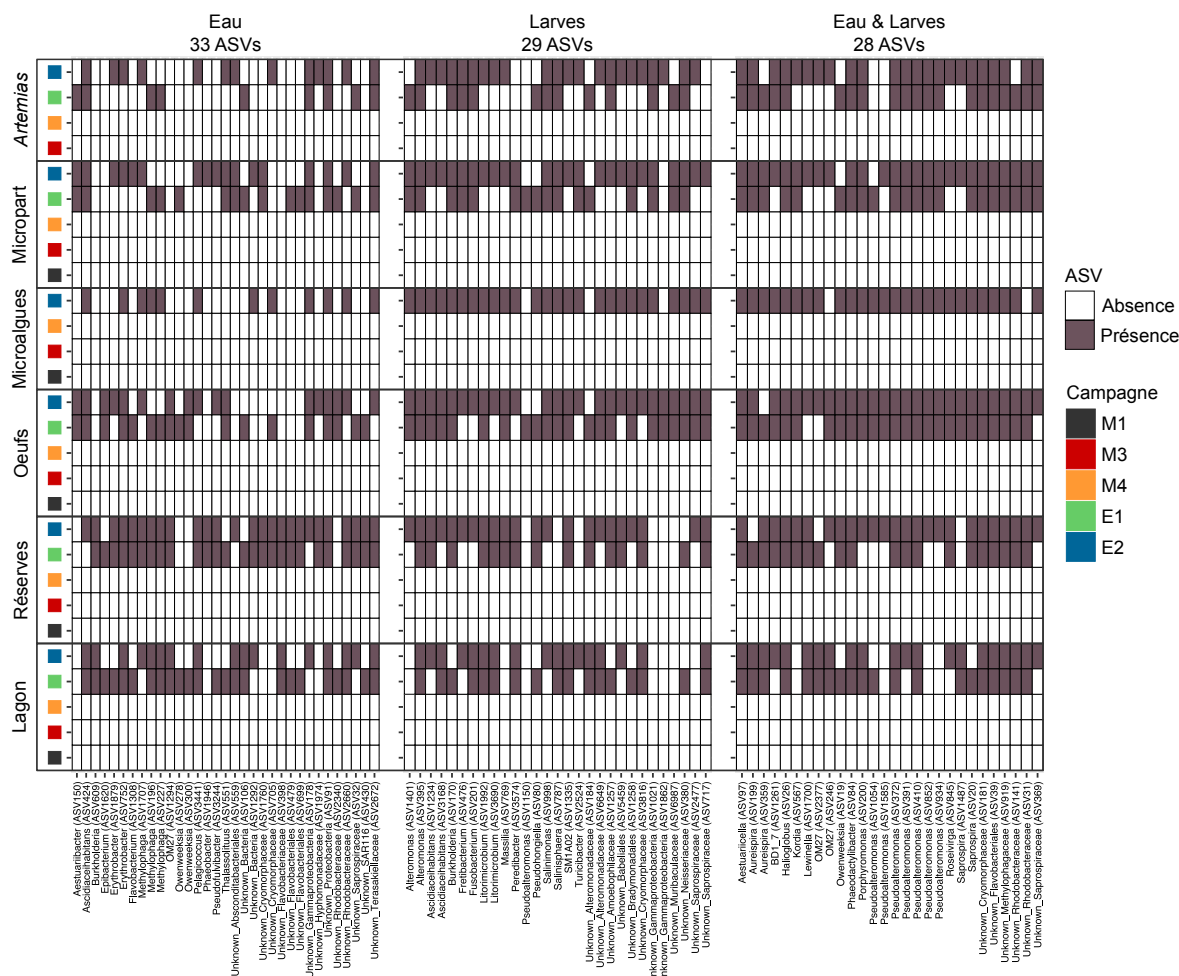


FIGURE 63 – Suivi de la présence / absence, dans les intrants, des 90 ASVs les plus abondants dans les échantillons d’eau et de larves des élevages en bonne santé, absents des intrants des élevages en mauvaise santé (campagnes M1, M3 et M4 réalisées à la SASV) et présents dans au moins un type d’intrant de l’ensemble des élevages en bonne santé (campagnes E1 et E2 réalisées dans les écloséries privées 1 et 2).

Une sélection des ASVs absents des intrants des élevages en mauvaise santé et présents dans au moins un type d’intrant de l’ensemble des élevages en bonne santé a été effectuée à partir des 189 ASVs identifiés dans la figure 62. Cette étape a permis de sélectionner les 90 ASVs présentés ici. Parmi ces 90 ASVs, 33 sont identifiés dans les échantillons d’eau (à gauche), 29 dans les larves (au milieu) et 28 sont communs aux eaux et aux larves (à droite).

TABLEAU 14 – Taxonomie des 29 ASVs mis en évidence comme potentiels biomarqueurs de la bonne santé des élevages dans les échantillons d'eau.

Les ASVs mis en évidence dans la figure 63 et non affiliés après la classe n'ont pas été considérés dans ce tableau. Les taxa en rouge n'ont pas été identifiés en contexte aquacole avant cette méta-analyse.

	RÈGNE	PHYLUM	CLASSE	ORDRE	FAMILLE	GENRE
ASV32	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprospiraceae	ASV32
ASV1760	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Cryomorpaceae	ASV1760
ASV705	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Cryomorpaceae	ASV705
ASV300	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Cryomorpaceae	Owenweeksia
ASV278	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Cryomorpaceae	Owenweeksia
ASV398	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	ASV398
ASV1308	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium
ASV3244	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Pseudofulvibacter
ASV479	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	NS9	ASV479
ASV699	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	NS9	ASV699
ASV1294	Bacteria	Bdellovibrionota	Bdellovibrionia	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	OM27
ASV559	Bacteria	Patescibacteria	Gracilibacteria	Absconditabacteriales	ASV559	ASV559
ASV1974	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	ASV1974
ASV430	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Puniceispirillales	SAR116	ASV430
ASV424	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ascidiaceihabitans
ASV2340	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	ASV2340
ASV2660	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	ASV2660
ASV1620	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Epibacterium
ASV1946	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Phaeobacter
ASV2672	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Terasakiellaceae	ASV2672
ASV752	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter
ASV1879	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter
ASV150	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Aestuariatibacter
ASV609	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
ASV1707	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosococcales	Methylophagaceae	Methylophaga
ASV227	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosococcales	Methylophagaceae	Methylophaga
ASV196	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosococcales	Methylophagaceae	Methylophaga
ASV551	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Saccharospirillaceae	Thalassolituus
ASV3441	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Opitales	Puniceococcaceae	Pelagicoccus

TABLEAU 15 – Taxonomie des 27 ASVs mis en évidence comme potentiels biomarqueurs de la bonne santé des élevages dans les échantillons de larves.

Les ASVs mis en évidence dans la figure 63 et non affiliés après la classe n'ont pas été considérés dans ce tableau. Les taxa en rouge n'ont pas été identifiés en contexte aquacole avant cette méta-analyse.

	RÈGNE	PHYLUM	CLASSE	ORDRE	FAMILLE	GENRE
ASV6987	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	ASV6987
ASV2477	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	ASV2477
ASV717	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	ASV717
ASV1257	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Cytophagales	Amoebophilaceae	ASV1257
ASV3816	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	ASV3816
ASV3574	Bacteria	Bdellovibrionota	Bdellovibrionia	Bacteriovoracales	Bacteriovoraceae	Peredibacter
ASV5459	Bacteria	Dependentiae	Babeliae	Babeliales	ASV5459	ASV5459
ASV1258	Bacteria	Desulfobacterota	Desulfuromonadia	Bradymonadales	ASV1258	ASV1258
ASV2524	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Turicibacter
ASV201	Bacteria	Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
ASV1335	Bacteria	Planctomycetota	Phycisphaerae	Phycisphaerales	Phycisphaeraceae	SM1A02
ASV3168	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ascidiaecihabitans
ASV1234	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ascidiaecihabitans
ASV1992	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Litorimicrobium
ASV3690	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Litorimicrobium
ASV395	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alteromonas
ASV1401	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alteromonas
ASV184	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	ASV184
ASV6649	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	ASV6649
ASV998	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Salinimonas
ASV1150	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
ASV170	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
ASV769	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia
ASV380	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	ASV380
ASV80	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudohongiellaceae	Pseudohongiella
ASV787	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Salinisphaerales	Salinisphaeraceae	Salinisphaera
ASV476	Bacteria	Synergistota	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	Fretibacterium

TABLEAU 16 – Taxonomie des 28 ASVs mis en évidence comme potentiels biomarqueurs de la bonne santé des élevages dans les échantillons d'eau et de larves.

Les ASVs mis en évidence dans la figure 63 et non affiliés après la classe n'ont pas été considérés dans ce tableau. Les taxa en rouge n'ont pas été identifiés en contexte aquacole avant cette méta-analyse.

	RÈGNE	PHYLUM	CLASSE	ORDRE	FAMILLE	GENRE
ASV200	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
ASV369	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	ASV369
ASV359	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	Aureispira
ASV199	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	Aureispira
ASV1700	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	Lewinella
ASV84	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	Phaeodactylibacter
ASV20	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	Saprosira
ASV1487	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	Saprosira
ASV845	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Cytophagales	Cyclobacteriaceae	Roseivirga
ASV181	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Cryomorpaceae	ASV181
ASV19	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Cryomorpaceae	Owenweeksia
ASV567	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Kordia
ASV39	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	NS9	ASV39
ASV2377	Bacteria	Bdellovibrionota	Bdellovibrionia	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	OM27
ASV246	Bacteria	Bdellovibrionota	Bdellovibrionia	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	OM27
ASV141	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	ASV141
ASV31	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	ASV31
ASV852	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
ASV934	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
ASV372	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
ASV410	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
ASV1054	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
ASV1585	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
ASV391	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
ASV97	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellevibrionales	Cellvibrionaceae	Aestuariicella
ASV26	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellevibrionales	Haliaceae	Halioglobus
ASV1261	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellevibrionales	Spongiibacteraceae	BD1-7
ASV919	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosococcales	Methylophagaceae	ASV919

Sur l'ensemble des 84 ASVs identifiés par cette analyse, 11 ont été affiliés à la famille des *Rhodobacteraceae* (Tab. 14 à 16) renforçant l'hypothèse de Wang et al. (2020b) selon laquelle un enrichissement en *Rhodobacteraceae* pourrait être bénéfique à la santé des larves de crevettes pénéides. Le genre *Phaeobacter*, affilié aux *Rhodobacteraceae* et identifié dans les eaux des élevages en bonne santé (Tab. 14), a d'ailleurs été suggéré comme potentiel probiotique pour l'aquaculture (Sonnenschein et al. 2021). De la même manière, 8 ASVs affiliés aux *Pseudoalteromonas* ont été mis en évidence dans les eaux et les larves en bonne santé (Tab. 15 et 16) confirmant leur action probiotique au sein des élevages larvaires de *P. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie (Pham et al. 2014; Sorieul et al. 2018; 2019). D'autres taxa bactériens bénéfiques ont également été mis en évidence lors de cette analyse : 3 ASVs affiliés aux *Bdellovibrionaceae* (Clade OM27) (Tab. 14 et 16) et 1 aux *Bacteriovoraceae* (*Peredibacter*) (Tab. 15). Ce sont des bactéries prédatrices appelées « BALOs » (*Bdellovibrio* and like organisms) et considérées comme de potentiels antibiotiques vivants utilisables en aquaculture (Bratanis et al. 2020). Leurs activités de prédation envers différentes souches de *Vibrio* pathogènes en font un sujet d'étude important en crevetticulture (Bratanis et al. 2020).

L'ordre des *Cytophagales*, mis en évidence par la famille des *Amoebophilaceae* (Tab. 15) et des *Cyclobacteriaceae* (Tab. 16), est impliqué dans la dégradation de molécules organiques en milieu marin (Reichenbach 1992). Ces microorganismes pourraient ainsi participer à la digestion des larves ou jouer un rôle dans le contrôle de la qualité de l'environnement d'élevage en dégradant la matière organique accumulée. De la même manière, 10 ASVs affiliés aux *Chitinophagales* (*Saprospiraceae*, Tab. 14 à 16) ont été mis en évidence dans les eaux et les larves des élevages en bonne santé. Les membres de cet ordre bactérien sont capables de dégrader la chitine, composant essentiel de la cuticule des crevettes (Fernández-Gómez et al. 2013). Il est possible que les *Chitinophagales* régulent l'accumulation de cette molécule dans les eaux d'élevage (en conséquence de l'accumulation de larves mortes et de mues de larves) ou soient impliquées dans la mue des larves, facilitant ainsi les passages de stades larvaires.

Les *Rhodospirillales* (*Terasakiellaceae*, Tab. 14), les *Bradymonadales* (Tab. 15) et les *Cellvibrionales* (*Cellvibrionaceae*, *Haliaceae*, *Spongiibacteraceae*, Tab. 16) ont respectivement été identifiées dans l'estomac (Restrepo et al. 2021), les intestins (Lee et al. 2022) et les fèces (Amoah et al. 2020) de crevettes *P. vannamei* adultes soumises à des infections expérimentales au *Vibrio parahaemolyticus*. Il a été suggéré que ces ordres bactériens conféraient aux animaux une protection contre les infections pathogènes (Restrepo et al. 2021; Lee et al. 2022). Dans l'ensemble des échantillons des élevages en bonne santé, des ASVs affiliés à l'ordre des *Flavobacteriales* ont également été identifiés (7 *Cryomorpaceae*, Tab. 14 à 16 ; 4 *Flavobacteriaceae*, Tab. 14 et 16 ; 3 *NS9*, Tab. 14 et 16). Ceci est en accord avec les observations de Zheng et al. (2017) qui ont montré une augmentation de l'abondance relative des bactéries affiliées à cet ordre dans les larves de *P. vannamei* en bonne santé. Les genres *Pseudofulvibacter* (Tab. 14) et *Kordia* (Tab. 16) (famille *Flavobacteriaceae*) ont d'ailleurs été identifiés dans des larves nauplii de *P. vannamei* en bonne santé (Wang et al. 2020a; Wang et al. 2020b). Le genre *Owenweeksia*, appartenant à la famille des *Cryomorpaceae*, a été mis en évidence dans l'eau d'élevage de crevettes *P. vannamei* adultes où il a été suggéré de stimuler la réponse immunitaire des animaux (Huang et al. 2018).

Outre les *Flavobacteriales*, les ordres *Oceanospirillales* (*Saccharospiroillaceae*, Tab. 14) et *Pseudomonadales* (*Pseudohongiellaceae*, Tab. 15) ont également été identifiés chez d'autres espèces de crevettes marines (*P. vannamei*, *P. monodon*, *Alvinocaris longirostris*) en

bonne santé (Cornejo-Granados et al. 2018; Lv et al. 2020; Valle-Gough et al. 2022). Nous avons d'ailleurs suggéré que les membres des *Oceanospirillales* appartenaient au core microbien des larves de *P. stylirostris* en bonne santé (article 3, chap. V, partie V.2). Le genre *Thalassolituus* (*Saccharospirillaceae*, Tab. 14) a également été mis en évidence chez des larves nauplii saines de *P. vannamei* (Wang et al. 2020a). D'autres ordres bactériens tels que les *Sphingomonadales* (*Sphingomonadaceae*, Tab. 14), les *Fusobacteriales* (*Fusobacteriaceae*, Tab. 15), et les *Burkholderiales* (*Burkholderiaceae*, Tab. 14 et 15 ; *Oxalobacteriaceae*, Tab. 15), ont déjà été identifiés chez des crevettes pénéides en bonne santé et pourraient également être source de bactéries bénéfiques aux élevages larvaires de *P. stylirostris* (Zhang et al. 2014b; Zeng et al. 2017; Callac et al. 2022).

Certains taxa mis en évidence par cette méta-analyse n'ont pas encore été identifiés en contexte aquacole (identifiés en rouge Tab. 14 à 16) et des analyses supplémentaires seront nécessaires pour comprendre leur rôle dans les élevages larvaires en Nouvelle-Calédonie.

Malgré les nombreuses pistes proposées par cette première méta-analyse, il est important de rappeler que la majorité des échantillons des élevages ne présentant pas de mortalités ont été séquencés avec une profondeur de séquençage plus élevée que les échantillons des élevages identifiés comme étant en mauvaise santé. Il est ainsi possible que certaines bactéries n'aient pas été mises en évidence dans les élevages soumis à de fortes mortalités à cause de biais expérimentaux. La base de données construite au cours de cette thèse devra donc être complétée avec d'autres données issues d'élevages en bonne santé ou non et séquencées à la même profondeur.

VII.4.2- Biomarqueurs des élevages en mauvaise santé

La même démarche analytique que celle employée pour la mise en évidence de biomarqueurs de bonne santé larvaire a été utilisée pour étudier les 121 ASVs identifiés comme majoritairement abondants dans les eaux et les larves des élevages en mauvaise santé (Fig. 64). Ainsi nous avons d'abord observé le profil de présence / absence de ces ASVs dans l'ensemble des intrants des élevages considérés (Fig. 64). Ensuite, les ASVs absents des intrants des élevages en bonne santé et présents dans au moins un type d'intrant (eau de remplissage, eau de réserve, œufs, microalgues, microparticules, larves d'*Artemia* sp.) de tous les élevages en mauvaise santé ont été sélectionnés. Au total, 6 ASVs sont identifiés comme potentiels biomarqueurs des mortalités dans l'eau, 5 sont mis en évidence dans les larves et 2 sont communs aux eaux et aux larves (Fig. 65). En ne considérant que les ASVs affiliés au-delà de la classe, 3 ASVs ont été identifiés comme plus abondants dans les eaux des élevages en mauvaise santé et uniquement présents dans les intrants de ces élevages, 4 dans les larves et 2 communs aux eaux et aux larves (Tab. 17). Ces ASVs sont affiliés au clade OM27 (*Bdellovibrionaceae*), aux familles *Nanocystaceae* et *Alteromonadaceae* ainsi qu'aux genres *Portibacter* (*Saprospiraceae*), *Ponticaulis* (*Hyphomonadaceae*), *Oceanococcus* (*Solimonadaceae*), *Turicella* (*Corynebacteriaceae*), *P30B-42* (*Myxococcaceae*) et *Celeribacter* (*Rhodobacteraceae*) (Tab. 17). Cependant, bien que ces microorganismes soient identifiés en milieu marin (à l'exception du genre *Turicella* affilié à la famille *Corynebacteriaceae* qui avait été identifiée dans l'article 2 présentée dans le chapitre IV, partie IV.2.2), aucune donnée n'est disponible dans la littérature quant à un potentiel effet néfaste de ces bactéries sur la santé des animaux marins. Des études supplémentaires seront donc nécessaires pour identifier leur rôle et leur implication potentielle dans les mortalités larvaires de *P. stylirostris*.

Dans un premier temps, des amorces PCR ou qPCR visant à identifier les genres bactériens mis en évidence pourraient être développées. Elles permettraient d'effectuer une recherche systématique de ces communautés au cours des élevages, et ainsi établir une potentielle corrélation entre la présence des genres identifiés et les mortalités larvaires. Dans un second temps, des méthodes de culture des microorganismes identifiés pourraient être développées pour expérimentalement valider un lien de causalité entre la présence des genres identifiés et les mortalités larvaires.

De manière intéressante, le clade OM27 mis en évidence par cette analyse avait déjà été énoncé dans la partie précédente (et dans le chap. V) comme étant potentiellement bénéfique (car appartenant aux *Bdellovibrionaceae*). Cependant ce clade est phylogénétiquement très divers (Orsi et al. 2016) et des taxa bactériens à la fois néfastes et bénéfiques pourraient être identifiés. De la même manière, les genres *Portibacter* et *Celeribacter* appartiennent respectivement aux familles des *Saprospiraceae* et des *Rhodobacteraceae*, qui ont précédemment été identifiées comme source de microorganismes potentiellement favorables à la santé des élevages. Cependant, les genres *Portibacter* et *Celeribacter* n'ayant pas été mis en évidence dans les élevages en bonne santé, certaines bactéries affiliées à ces familles (*Saprospiraceae* et *Rhodobacteraceae*) pourraient donc avoir un effet négatif sur les élevages.

Il est important de nuancer les résultats obtenus par cette analyse. En effet, les potentiels biomarqueurs bactériens de la mauvaise santé des élevages larvaires ont été identifiés à partir des données de l'écloserie de la SASV et pourraient aussi refléter des communautés procaryotiques géographiquement spécifiques. De plus, les protocoles d'élevage de la SASV (antibiotique différent, petits volumes d'élevage, nourriture différente) ainsi que les biais de profondeurs de séquençage pourraient également expliquer les différences. En conséquence, le jeu de données devra être complété avec des données relatives à des élevages en mauvaise santé réalisés dans les écloseries privées 1 et 2 (ou autres écloseries privées du territoire) ou à des élevages en bonne santé réalisés à la SASV.

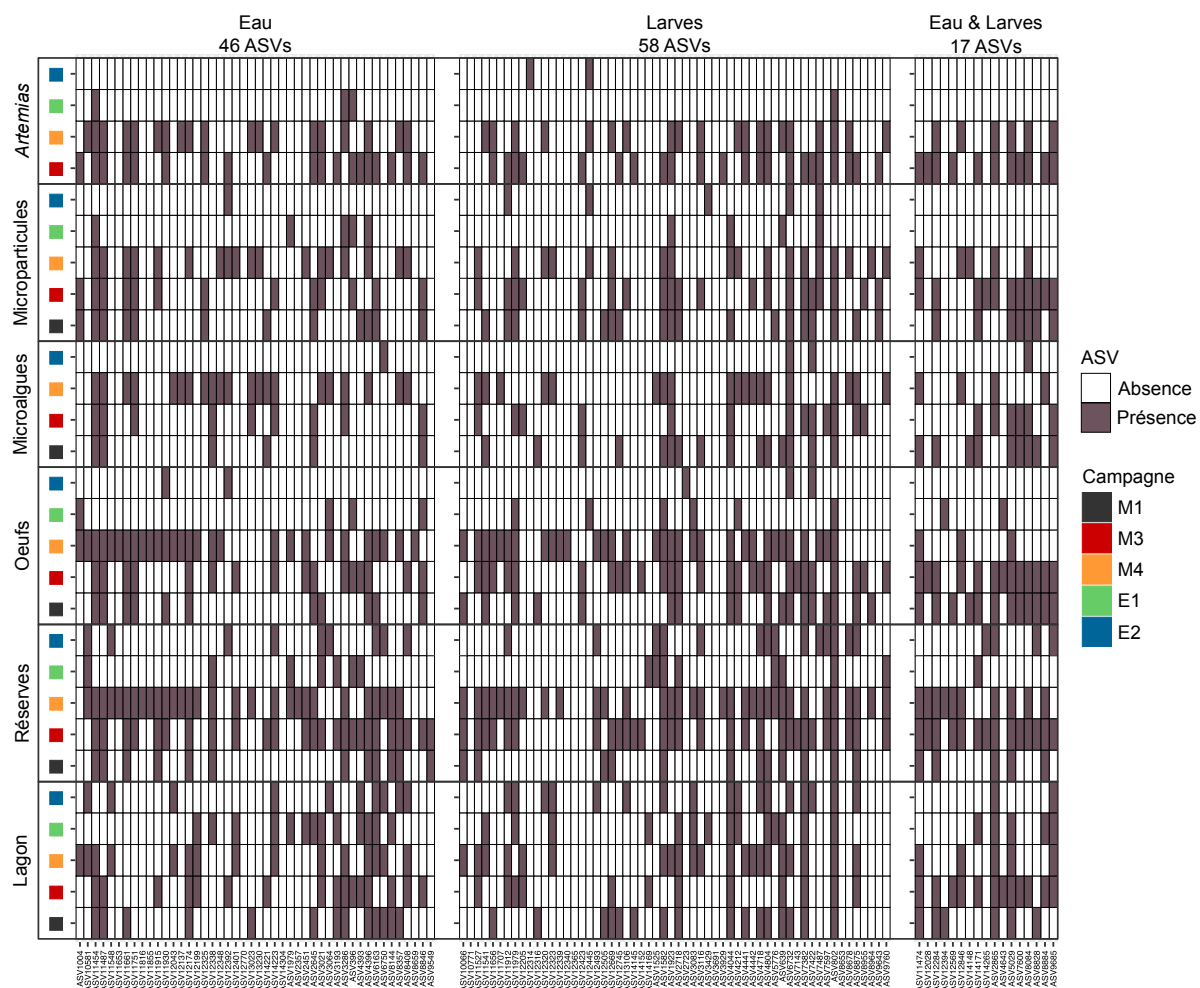


FIGURE 64 – Suivi de la présence / absence, dans les intrants, des 121 ASVs les plus abondants dans les échantillons d’eau et de larves des élevages en mauvaise santé.

Les intrants (eau de remplissage provenant du lagon, eau de réserve, œufs, microalgues, microparticules et larves d’Artemia sp.) de l’ensemble des élevages suivis au cours des campagnes d’échantillonnage M1, M3, M4, E1 et E2 ont été considérés. Les 121 ASVs considérés correspondent aux ASVs identifiés dans la figure 61 (46 ASVs plus abondants dans les eaux d’élevage en mauvaise santé, 58 ASVs plus abondants dans les larves en mauvaise santé, 17 ASVs plus abondants dans les eaux et dans les larves des élevages en mauvaise santé).

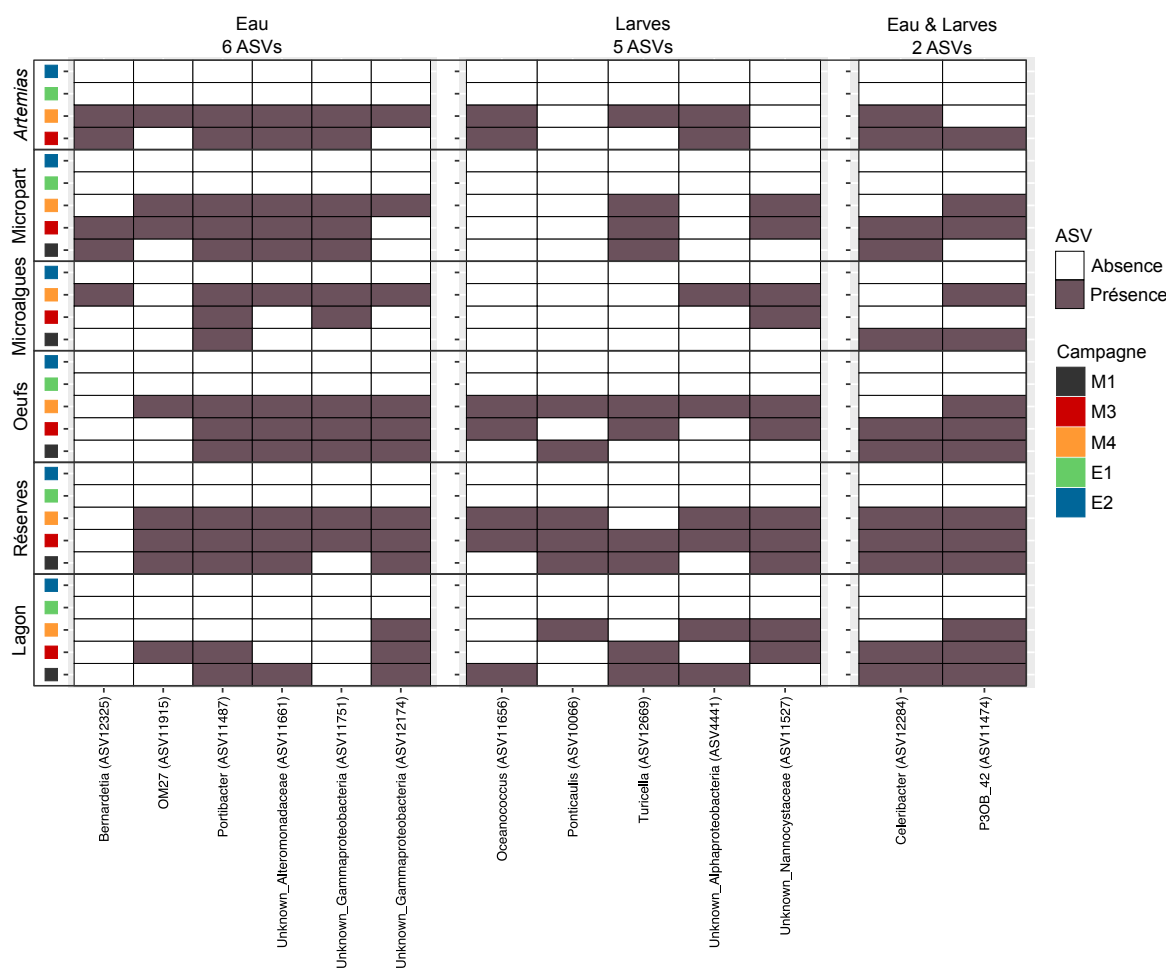


FIGURE 65 – Suivi de la présence / absence, dans les intrants, des 13 ASVs les plus abondants dans les échantillons d’eau et de larves des élevages en mauvaise santé, absents des intrants des élevages en bonne santé (campagnes E1 et E2 réalisées dans les écloséries privées 1 et 2) et présents dans au moins un type d’intrant de l’ensemble des élevages en mauvaise santé (campagnes M1, M3 et M4 réalisées à la SASV).

Une sélection des ASVs absents des intrants des élevages en bonne santé et présents dans au moins un type d’intrant de l’ensemble des élevages en mauvaise santé a été effectuée à partir des 121 ASVs identifiés dans la figure 64. Cette étape a permis de sélectionner les 13 ASVs présentés ici. Parmi ces 13 ASVs, 6 sont identifiés dans les échantillons d’eau (à gauche), 5 dans les larves (au milieu) et 2 sont communs aux eaux et aux larves (à droite).

TABLEAU 17 – Taxonomie des 9 ASVs mis en évidence comme potentiels biomarqueurs d’une dégradation de l’état de santé larvaire.

Les ASVs mis en évidence dans la figure 65 et non affiliés après la classe et / ou uniquement mis en évidence dans un intrant de nourriture n’ont pas été considérés dans ce tableau.

		RÈGNE	PHYLUM	CLASSE	ORDRE	FAMILLE	GENRE
EAU	ASV11487	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprospiraceae	Portibacter
	ASV11661	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	ASV11661
	ASV11915	Bacteria	Bdellovibrionota	Bdellovibrionia	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	OM27
LARVES	ASV10066	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Hyphomonadaceae	Ponticaulis
	ASV11527	Bacteria	Myxococcota	Polyangia	Nannocystales	Nannocystaceae	ASV11527
	ASV11656	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Salinisphaerales	Solimonadaceae	Oceanococcus
EAU & LARVES	ASV12669	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Turicella
	ASV11474	Bacteria	Myxococcota	Myxococcia	Myxococcales	Myxococcaceae	P3OB-42
LARVES	ASV12284	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Celeribacter

CHAPITRE VIII

Conclusions générales

VIII- Chapitre VIII – Conclusions générales

Depuis le début des années 1990, l'aquaculture est un secteur économique en constante augmentation et contribue actuellement à la moitié de la production mondiale d'animaux aquatiques. En 2020, parmi l'ensemble des espèces aquacoles élevées, la crevette à pattes blanches, *Penaeus vannamei*, était l'espèce la plus produite ; démontrant ainsi la part importante des activités crevetticoles au sein des marchés aquacoles mondiaux. En Nouvelle-Calédonie, l'aquaculture de la crevette bleue du Pacifique, *P. stylirostris*, initiée au début des années 1970, représente le premier exportateur agro-alimentaire du territoire et le deuxième secteur économique toutes activités confondues (après le nickel). Cependant, des mortalités larvaires observées dans les écloséries de l'île freinent le développement de la filière et constituent une menace pour la pérennité des activités. Une dysbiose des communautés microbiennes associées aux élevages larvaires, liée à des modifications physico-chimiques de l'eau, pourrait moduler l'état de santé des larves et ainsi être à l'origine des mortalités observées. Dans ce contexte, cette thèse a d'abord eu pour objectif de caractériser les populations procaryotiques impliquées au cours de la mise en place du microbiote larvaire ainsi que les facteurs (environnement, contribution des géniteurs) les modulant. Dans un second temps, les communautés associées aux larves et à leur environnement ont été étudiées au cours d'élevages larvaires impactés ou non par des épisodes de mortalités, élevages considérés comme étant en mauvaise ou en bonne santé. Enfin, une méta-analyse a été effectuée en regroupant les données issues d'élevages larvaires conduits dans différentes écloséries de Nouvelle-Calédonie et présentant des états de santé variables. Pour chaque étude réalisée, les communautés procaryotiques associées aux intrants : eau de remplissage provenant du lagon, eau de réserve, œufs et nourriture, ont également été considérées.

VIII.1- Synthèse, discussion et perspectives

VIII.1.1- Transmissions horizontales et verticales au cours de la mise en place du microbiote larvaire

Les premiers travaux de cette thèse se sont intéressés à la colonisation procaryotique des œufs et des premiers stades larvaires (nauplii) de *P. stylirostris* (chap. IV). Ils ont mis en évidence des communautés bactériennes actives communes aux œufs, aux larves nauplii et à leur eau d'élevage suggérant l'existence de transmissions microbiennes horizontales. Peu d'études concernant les jeunes stades larvaires de crustacés sont disponibles. Cependant, [Verscheure et al. \(2000\)](#) et [Nyholm \(2020\)](#) ont montré que de tels processus de transmission horizontale étaient impliqués chez les poissons lors de la mise en place des communautés microbiennes épibiotiques des œufs. En effet, ces derniers sont considérés comme étant axéniques (totalement dépourvus de microorganismes) au moment de la ponte et sont ensuite rapidement colonisés par les microorganismes présents dans l'eau environnante ([Verschuere et al. 2000](#)). Une colonisation microbienne dense et diverse, sans espèces pathogènes, est d'ailleurs considérée comme une barrière de protection favorable pour le développement embryonnaire ([Verschuere et al. 2000](#)), et pourrait même être impliquée dans les échanges de nutriments et d'oxygène avec l'extérieur ([Nyholm, 2020](#)). Les communautés microbiennes épibiotiques, acquises au cours du développement

embryonnaire et des premiers stades larvaires, pourraient également moduler l'endobiote des animaux par une internalisation de certaines communautés au moment de l'ouverture de la bouche (Nyholm, 2020). Ces résultats suggèrent donc une influence durable de l'environnement d'élevage sur les microorganismes associés aux larves au cours des élevages.

Nos analyses des communautés procaryotiques associées aux œufs, aux nauplii et aux organes reproducteurs de leurs géniteurs, mettent en évidence de potentielles transmissions verticales contribuant également à l'acquisition des premiers microorganismes symbiotiques. Ces mécanismes ont déjà été mis en évidence chez les Vertébrés (Cho & Blaser 2012) et les Invertébrés (Larenas et al. 2003; Sylvain & Derome 2017; Nyholm 2020). Chez les crevettes *P. monodon* et *P. vannamei*, des analyses par microscopie et par PCR nichée ont respectivement montré une transmission verticale du virus du White Spot Syndrom (WSSV) (Lo et al. 1997) et du virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (IHHNV) (Motte et al. 2003). Nos résultats suggèrent que le microbiote associé aux œufs et aux premiers stades larvaires de *P. stylirostris* résulte d'interactions microbiennes complexes entre l'environnement d'élevage et les communautés transmises par les géniteurs. Cependant des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer la possibilité d'une transmission verticale du microbiote comme cela a été démontré chez l'humain (Cho & Blaser 2012). Des expérimentations comparant le microbiote d'œufs évoluant dans des eaux différentes ou d'œufs obtenus à partir de géniteurs élevés dans des conditions diverses (lieu d'élevage, température, exposition à des stress biotiques ou abiotiques, différents régimes alimentaires, espèces sauvages ou cultivées, etc.) pourraient permettre de mieux évaluer les transmissions microbiennes ayant lieu au cours de la mise en place du microbiote larvaire. Le développement de familles gnotobiotiques (animaux élevés en condition axénique et exposés à une sélection connue de communautés microbiennes), bien que techniquement complexe à accomplir, pourrait également apporter une plus grande compréhension sur l'acquisition des premières communautés procaryotiques larvaires mais aussi renseigner sur le rôle de ces microorganismes dans la physiologie des animaux (Basic & Bleich 2019).

VIII.1.2- Eutrophisation du milieu d'élevage

Une eutrophisation de l'eau d'élevage a été mise en évidence au cours du développement larvaire aussi bien dans les élevages en bonne santé que dans les élevages soumis à des épisodes de mortalités massives (chap. V et VI). Elle est marquée par une augmentation de la concentration en sels nutritifs (ammonium et phosphate) et en matière organique dissoute colorée (CDOM). Aucun renouvellement d'eau n'ayant lieu au cours des 10 premiers jours d'élevage larvaire, elle résulte de l'accumulation, dans l'eau, de fèces, de nourriture non ingérée, de larves mortes et de mues de larves. Dans les élevages en bonne santé des éclosiers privées 1 et 2 (campagnes E1 et E2), l'eutrophisation s'accompagne d'une diminution du pH (non mesuré lors des suivis à la Station Aquacole de Saint Vincent, SASV) qui pourrait être causée par une augmentation des activités bactériennes et larvaires menant à une diminution de l'oxygène et à une augmentation de la concentration en CO₂ dans le milieu (Smith & Schindler 2009). Cependant, le bullage central appliqué à tous les bacs d'élevage permet de limiter ce phénomène. En parallèle, une diminution du SR (ratio des pentes spectrales) a également été observée dans l'ensemble des élevages et reflète une modification de la composition de la matière organique dissoute dans l'eau (Helms et al. 2009). Dans les élevages des éclosiers privées, des augmentations drastiques de la concentration en CDOM ainsi qu'une diminution brutale du pH et du SR ont été observées au

lendemain du premier ajout d'antibiotiques et de larves d'*Artemia* sp., au moment du passage des stades larvaires de zoé 2 à zoé 3. Il est difficile de déterminer la cause de ces shifts, et des analyses par chromatographie ou par spectrométrie de masse seront nécessaires pour identifier et quantifier des molécules organiques d'intérêt (protéines, sucres, acides gras, etc.) dans les élevages, et ainsi comprendre leur implication dans la santé des larves. Bien que cette évolution de la qualité de l'eau d'élevage soit attendue et qu'elle ne semble pas être à l'origine des mortalités larvaires observées en Nouvelle-Calédonie, elle pourrait cependant, fortement influencer les communautés microbiennes associées à l'eau et aux larves et ainsi indirectement impacter la santé des animaux (Yang et al. 2018).

VIII.1.3- Évolution du microbiote des élevages au cours du développement larvaire

La caractérisation quotidienne de l'environnement microbien d'élevages en bonne et en mauvaise santé a mis en évidence que le jour d'élevage, associé à l'environnement physico-chimique et à l'eutrophisation progressive du milieu, l'ajout d'antibiotique, le stade de développement larvaire et l'état de santé des larves influençaient les communautés procaryotiques associées aux élevages (chap. V et VI). Cependant ces facteurs n'expliquent pas la totalité des variations microbiennes observées. En effet, les communautés procaryotiques associées à des élevages en bonne santé présentaient un nombre réduit de corrélations avec les paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage au moment du stade zoé (article 3, chap. V). De plus, 8,3% de la variabilité microbienne n'ont pas été expliqués lors de l'analyse de l'eau d'élevages soumis à des épisodes de mortalités larvaires (article 5, chap. VI). Sachant que la co-occurrence de processus écologiques déterministes et stochastiques a été suggérée d'impacter les communautés microbiennes présentes dans les systèmes aquacoles (Verschuere et al. 2000) et plus particulièrement au niveau larvaire (Vadstein et al. 2018a; Heyse et al. 2021), il est possible que de tels processus soient également impliqués dans les élevages larvaires de *P. stylirostris*. Les facteurs déterministes sont définis comme ayant une relation dose-réponse claire et sont considérés comme non aléatoires (Zhou & Ning 2017; Verschuere et al. 2000). En aquaculture, ces processus incluent majoritairement les paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité, la concentration en oxygène et la concentration en nutriments, mais peuvent également englober les phénomènes de concurrence, de prédation et de mutualisme existant entre les microorganismes (Zhou & Ning 2017). En parallèle, les processus stochastiques supposent que l'ensemble des communautés microbiennes sont écologiquement et fonctionnellement équivalentes et que les modifications des communautés résultent du hasard (Zhou & Ning 2017) (Fig. 66). Verschuere et al. (2000) parlent même de microorganismes présents « au bon endroit et au bon moment ». Ainsi, en Nouvelle-Calédonie, l'eutrophisation du milieu d'élevage, l'ajout d'antibiotique, le pH, la température, le développement larvaire et l'état de santé des larves sont des processus déterministes pouvant exercer des pressions de sélection sur les communautés microbiennes associées aux élevages larvaires de *P. stylirostris*. Il est également possible que des processus stochastiques puissent être impliqués même si de nombreux facteurs déterministes n'ont potentiellement pas été pris en compte au cours de nos expérimentations. Par exemple, Wang et al. (2020b) ont remarqué une augmentation des processus stochastiques (dispersion) au moment de l'ouverture de la bouche des larves de *P. vannamei* au passage du stade zoé. Au cours de ce projet, nous avons également émis l'hypothèse que les phénomènes stochastiques pouvaient être plus importants au cours de

ce stade (chap. V). Cependant, des analyses supplémentaires devront être réalisées pour évaluer l'occurrence de tels processus écologiques d'assemblages microbiens au sein des élevages. Il existe 3 méthodes d'analyse principales qu'il serait intéressant de développer (Zhou & Ning 2017):

- Les analyses multivariées de type analyse canonique des correspondances (ACC ou CCA), analyse de redondances (RDA) (Tab. 2, chap. I, partie I.4.1.a) ou analyse de partitionnement de la variance.
- L'utilisation de modèles mathématiques basés sur la théorie neutre qui soutient que la plupart des modifications génétiques n'affectent pas la fitness des individus et que, par conséquent, elles résultent de processus stochastiques (Duret, 2008).
- L'utilisation de modèles nuls qui, grâce à des permutations aléatoires des données, génèrent des modèles stochastiques statistiquement attendus (Zhou & Ning 2017).

Malgré les variations microbiennes observées dans les élevages, la méta-analyse effectuée (chap. VII) a mis en évidence des cores microbiens associés à l'ensemble des échantillons d'eau d'élevage et de larves considérés au cours de cette thèse (chap. VII, partie VII.2). Plus spécifiquement, 9 ASVs sont partagés par les échantillons d'eau d'élevage, 3 ASVs sont communs aux larves et 5 ASVs sont identifiés dans tous les échantillons (Fig. 56, chap. VII, partie VII.2.1). Ces résultats mettent en évidence la présence de certaines communautés microbiennes (affiliées aux familles *Rhodobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Stappiaceae*, *Alcanivoraceae*, *Litoricolaceae*, *Pseudoalteromonadaceae* et *Alteromonadaceae*) tout au long du développement larvaire dans l'ensemble des élevages considérés indépendamment de leur état de santé, et confortent ainsi les hypothèses faites précédemment quant à une persistance de communautés procaryotiques spécifiques au cours de la vie des crevettes. Comme pour l'étude des transmissions microbiennes horizontales et verticales, le développement de familles gnotobiotiques pourrait permettre de comprendre le rôle de chacune de ces familles au cours du développement larvaire de *P. stylirostris*.

La notion de core microbien est sujet à débat et plusieurs méthodes ont été décrites pour pouvoir l'identifier (Shade & Handelsman 2012). Comme pour les études présentées dans les chapitres IV à VI, la méthode d'appartenance basée sur la présence / absence des ASVs a été utilisée au cours de la méta-analyse. Mais les méthodes basées sur l'abondance relative des ASVs, leur phylogénie, leur persistance au cours du temps ou leurs interactions auraient pu être employées (Fig. 67) (Shade & Handelsman 2012). Il est possible qu'en considérant l'une de ces méthodes, d'autres communautés procaryotiques puissent être mises en évidence. En effet, les différences de profondeurs de séquençage, qui ont été mentionnées dans le chapitre IV (partie IV.1.1), ainsi que les biais expérimentaux relatifs au métabarcoding (abordés dans la partie VIII.2.2 de ce chapitre) peuvent impacter la mise en évidence de communautés communes et introduire des biais d'abondances relatives des ASVs. Une approche combinant plusieurs méthodes pourrait permettre de pallier à ce problème et compléter les premiers résultats obtenus. L'identification du core microbien est considérée comme une première étape essentielle pour définir des communautés microbiennes saines et permettre ensuite des analyses comparatives (Shade & Handelsman 2012). Au regard de ces informations, il serait également pertinent d'identifier séparément les cores microbiens associés aux élevages en bonne et en mauvaise santé.

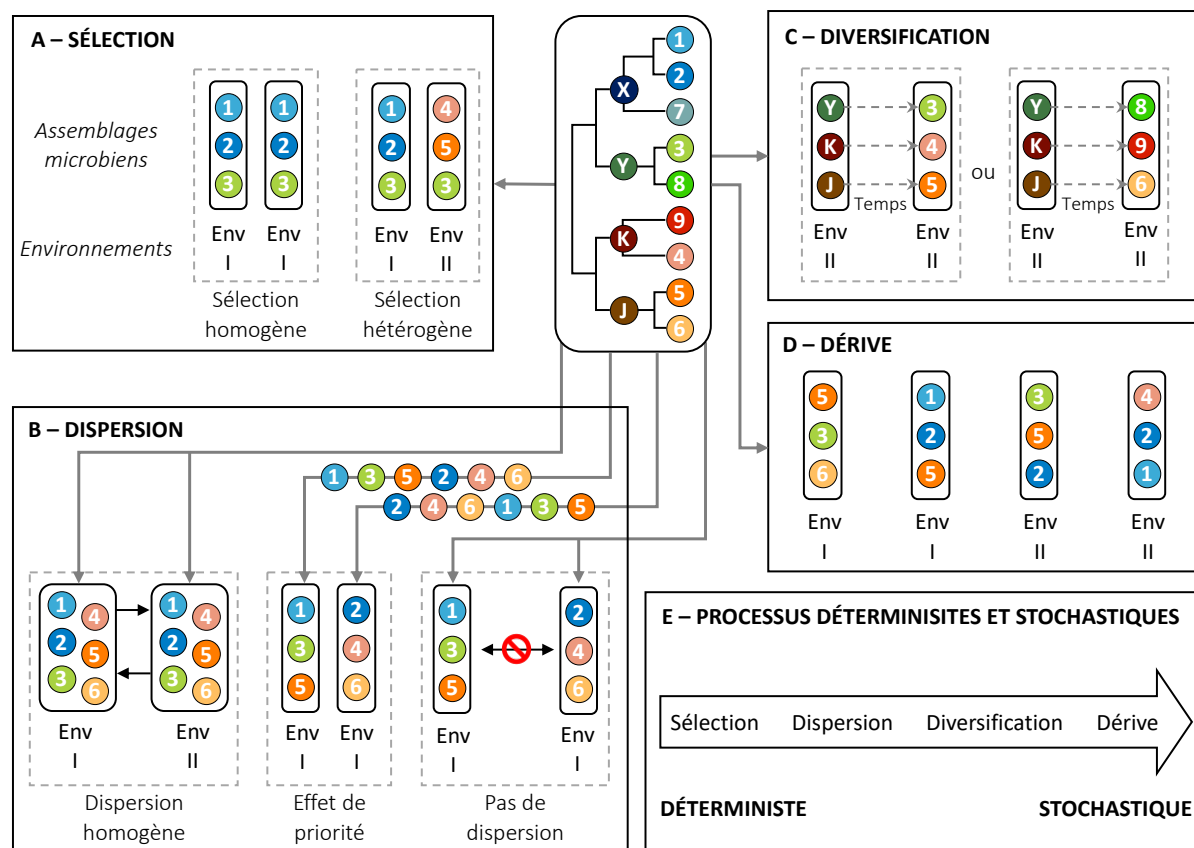


FIGURE 66 – Processus écologiques déterministes et stochastiques d’assemblages de communautés microbiennes (adapté de Zhou & Ning 2017).

Chaque cercle numéroté correspond à une espèce microbienne. Les cercles avec une lettre correspondent à un ancêtre commun. Les processus de sélection, de dispersion, de diversification et de dérive écologique sont présentés dans les figures A à D. Chaque processus suppose l’absence d’autres processus d’assemblages de communautés microbiennes. **A) Processus de sélection.** Chaque environnement possède des caractéristiques qui vont être préférées par différentes espèces. Le premier environnement (Env I) sélectionne ainsi les espèces 1, 2 et 3 alors que le second environnement (Env II) sélectionne les espèces 4, 5 et 3. La sélection est dite homogène lorsque les processus de sélection sont identiques au sein d’un même environnement et hétérogène lorsque les processus de sélection divergent entre 2 environnements distincts. **B) Processus de dispersion.** La dispersion est dite homogène si les espèces sont dispersées entre des environnements distincts. Un fort processus de dispersion mène à des assemblages microbiens homogènes et ce même si les environnements présentent des caractéristiques différentes. Les espèces peuvent être dispersées au sein d’un même environnement en fonction de leur ordre d’arrivée (effet de priorité). Lorsque les espèces 1, 3 et 5 arrivent en premier dans l’environnement 1 (Env I) elles occupent l’ensemble des niches écologiques disponibles alors que l’inverse se produit si les espèces 2, 4 et 6 arrivent en premier. Le dernier processus de dispersion inclut peu de dispersion d’espèces et conduit à des communautés différentes au sein d’environnements identiques. **C) Processus de diversification.** Deux communautés identiques dans un même environnement et soumises à des phénomènes aléatoires de mutations génétiques conduisent à différentes nouvelles espèces. **D) Processus de dérive.** Les espèces occupent un environnement donné uniquement sous l’effet du hasard. **E) La sélection est un processus d’assemblage des communautés microbiennes purement déterministe alors que la dérive écologique est un processus purement stochastique. Les processus de dispersion et de diversification sont considérés comme stochastiques mais peuvent être déterministes sous certaines conditions.**

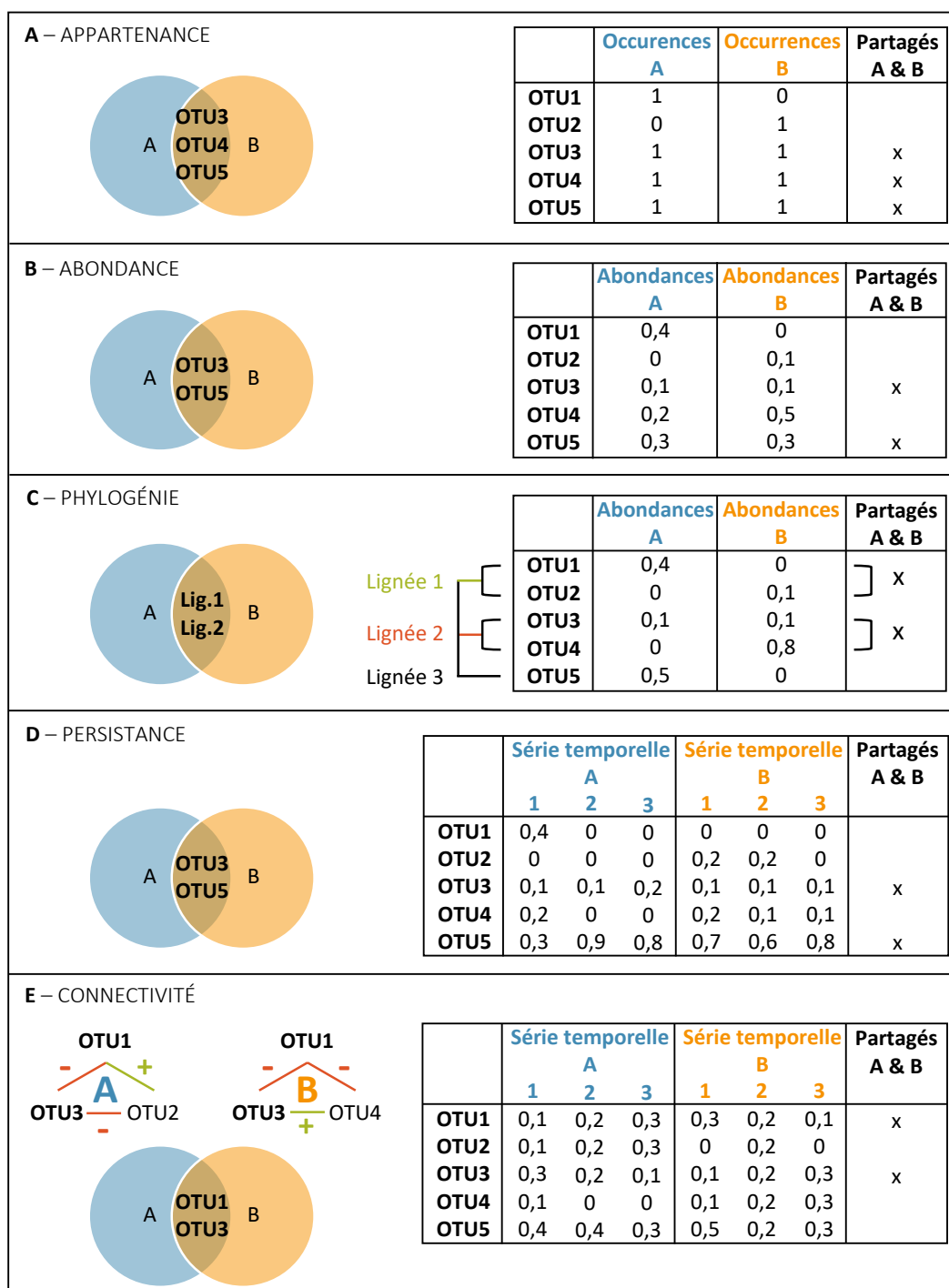


FIGURE 67 – Méthodes de détermination du core microbien (adapté de Shade & Handelsman, 2012). A) La méthode basée sur la présence / absence des OTUs (ou ASVs) (appartenance) met en évidence les OTUs présents dans l'ensemble des échantillons. B) La méthode basée sur les abondances relatives met en évidence les OTUs ayant des abondances similaires au sein des échantillons. C) La méthode basée sur la phylogénie met en évidence des lignées microbiennes communes entre les échantillons. D) La méthode basée sur la persistance met en évidence les OTUs persistant au cours d'une série temporelle. E) La méthode basée sur les interactions entre les OTUs (connectivité) met en évidence les OTUs ayant des interactions similaires entre 2 échantillons.

VIII.1.4- Influence des intrants

Afin d'identifier l'origine des ASVs mis en évidence au cours de l'analyse des cores microbiens, des suivis des ASVs ont été effectués dans les intrants initiaux des élevages, à savoir les œufs, les eaux du lagon ayant servi à remplir les réserves et les eaux de réserve contenant l'eau traitée servant à remplir les bacs d'élevage (chap. VII, partie VII.2.2). Ces analyses ont montré que la quasi-totalité des ASVs identifiés tout au long du développement larvaire étaient déjà présents en amont des élevages dès le remplissage des réserves suggérant un rôle fondamental de l'eau de mer lagonaire sur les assemblages microbiens au sein des écloséries. Cette influence des intrants initiaux a également été mise en évidence lors de la recherche de biomarqueurs bactériens de la santé des élevages (chap. VII, partie VII.4). Même si ces communautés ont aussi été mises en évidence dans la nourriture, leur présence dès le début de l'élevage suggère une influence plus importante de l'eau de mer lagonaire et des œufs (qui sont eux-mêmes sous l'influence de leurs géniteurs). Ceci est en accord avec [Heyse et al. \(2021\)](#) qui ont montré que la nourriture et les renouvellements d'eau, initiés à partir du 7^{ème} jour d'élevage larvaire de *P. vannamei*, ne contribuaient qu'à 10% du microbiote total de l'eau d'élevage suggérant un impact encore plus important de l'eau de remplissage des bacs. À l'heure actuelle aucune donnée n'existe quant à l'écologie microbienne des microorganismes associés aux eaux lagonaires pompées par les écloséries du territoire. Pourtant, une compréhension approfondie de ces écosystèmes pourrait permettre de mieux appréhender les interactions microbiote – environnement – écloséries. Ainsi, cette thèse offre de nouvelles perspectives de travail quant à un suivi annuel des baies de chaque éclosérie du territoire. La mise en évidence de communautés potentiellement essentielles aux élevages et présentes en amont du remplissage des bacs ouvre également la voie pour la mise au point de méthodes de détection précoce (type PCR ou qPCR) de biomarqueurs bactériens de la santé des élevages.

VIII.1.5- Biomarqueurs bactériens de la santé des élevages larvaires

VIII.1.5.a- Biomarqueurs bactériens de bonne santé : vers la maîtrise des communautés procaryotiques associées aux élevages et identification de potentiels nouveaux probiotiques

De nombreux biomarqueurs bactériens des élevages larvaires en bonne santé ont été mis en évidence à différentes échelles taxonomiques (de l'ASV au genre) (chap. V, VI et VII). Certains de ces biomarqueurs ont été identifiés comme de potentiels microorganismes bénéfiques pour l'aquaculture. Par exemple, dans l'article 3 présenté dans le chapitre V, une succession de communautés procaryotiques bénéfiques a été mise en évidence au cours du développement larvaire aussi bien dans les larves que dans leur eau d'élevage. Ces microorganismes pourraient jouer des rôles clés à certains moments du développement larvaire expliquant leur enrichissement ponctuel. Les mortalités larvaires pourraient ainsi résulter d'une absence de certaines communautés procaryotiques impliquées dans des processus physiologiques essentiels tels que la digestion ou l'immunité. En effet, [Wang et al. \(2020b\)](#) ont suggéré que certaines bactéries affiliées à la famille des *Rhodobacteraceae* pourraient être sélectionnées au moment de l'ouverture de la bouche par le système digestif immature des larves au stade zoé et ainsi aider leur digestion. Les auteurs ont également émis l'hypothèse que ces communautés pouvaient être impliquées dans l'immunité et assurer un rôle de protection contre les pathogènes. Chez les crevettes, l'immunité est principalement

assurée par les hémocytes (cellules circulant dans l'hémolymphe) et cible un large spectre de pathogènes (Fontaine & Lightner 1973). Après une étape de reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes par des récepteurs PRR (Pathogen Recognition Receptor) situés à la surface des hémocytes, des cascades moléculaires sont initiées induisant ainsi des réponses cellulaires (phagocytose, activation métabolique oxydative) et humorales (encapsulation des pathogènes par mélanisation, limite de diffusion des pathogènes par coagulation, production de peptides antimicrobiens) (Bayne 1990; Campa-Córdova et al. 2002; Bachere et al. 2004; Theopold et al. 2004; Jiravanichpaisal et al. 2006; Destoumieux-Garzón et al. 2016) (Fig. 68). Une étude menée par Jiravanichpaisal et al. (2007) a montré que le nombre d'hémocytes augmentaient au cours du développement larvaire des crevettes et était en lien avec une augmentation des transcrits des gènes de la prophénol oxydase (impliquée dans l'initiation de cascades moléculaires) ainsi que de différents peptides antimicrobiens (Pénéidines, Crustines, etc.). Ainsi, l'environnement microbien disponible au moment de l'activation des différents gènes immunitaires pourraient être crucial pour les larves. Une étude récente a d'ailleurs montré qu'une exposition précoce de larves d'huître, *Crassostrea gigas*, à un environnement microbien riche issu de l'environnement d'élevage d'adultes en bonne santé permettait une augmentation de l'activité immunitaire des larves. Cette immunité renforcée est ensuite conservée à l'âge adulte sur 2 générations et permet une résistance accrue des animaux à des infections virales expérimentales (Fallet et al. 2022). Ce processus, appelé « shaping immunitaire », pourrait être appliqué au sein des élevages larvaires de *P. stylirostris*. Un enrichissement des milieux d'élevage larvaire avec des communautés microbiennes identifiées comme bénéfiques pourrait être envisagé afin de renforcer le système immunitaire des larves et prévenir les épisodes de mortalités massives. Un tel « shaping immunitaire » pourrait également être mis en place en appliquant des stress abiotiques (augmentations temporaires de la température de l'eau, stress salin). Inversement, l'exposition des larves à des motifs moléculaires pathogènes, aussi appelé « priming immunitaire » ou pseudo-vaccination, pourrait permettre de stimuler le système immunitaire des animaux et améliorer leur survie (Flegel, 2019). Des analyses intégrées de transcriptomiques et de métabarcoding permettront d'explorer les interactions existantes entre le système immunitaire des larves de *P. stylirostris* et le microbiote des élevages.

Les biomarqueurs de la bonne santé des élevages pourraient également permettre la recherche et la mise au point de nouvelles souches probiotiques. Par exemple, de nombreux ASVs (ASV1150, ASV852, ASV934, ASV372, ASV410, ASV1054, ASV1585, ASV391) affiliés au genre bactérien des *Pseudoalteromonas* ont été mis en évidence (chap. VII, partie VII.4.1). Or la souche *Pseudoalteromonas* NC201 a déjà montré un potentiel probiotique prometteur dans les élevages larvaires de *P. stylirostris* confortant ainsi nos hypothèses (Pham et al. 2014; Sorieul et al. 2018; 2019). Nos analyses ont également montré une abondance relative plus importante de bactéries prédatrices affiliées aux *Bdellovibrionales* et ayant des effets antagonistes contre différentes espèces de *Vibrio* pathogènes dans les élevages de *P. vannamei* (Cao et al. 2015; 2019). Ces bactéries, considérées comme des antibiotiques vivants, pourraient être développées pour une utilisation en élevage larvaire en Nouvelle-Calédonie. De la même manière, la mise en évidence de nombreuses bactéries affiliées aux *Saprospiraceae* dans les élevages en bonne santé pourraient mener à la découverte de souches bénéfiques. De par leur activité chitinolytique, ces microorganismes pourraient favoriser la dégradation des cuticules suite à la mue et ainsi limiter l'accumulation de matière organique dans l'eau. D'autres bactéries potentiellement bénéfiques ont été mises en évidence et des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer ou infirmer leur

rôle dans les élevages. Le développement de cocktails de probiotiques ou de séquences de probiotiques différemment distribués au cours de l'élevage, et spécifiquement dirigés pour améliorer la qualité de l'eau ou la qualité des larves, pourraient permettre d'améliorer la santé des élevages larvaires mais aussi de s'affranchir des antibiotiques. En effet, comme mentionné par [Verschuere et al. \(2000\)](#), les antibiotiques, même utilisés de manière prophylactique, ne permettent pas un contrôle complet du microbiote et peuvent même, dans certains cas, entraîner une altération négative de l'écosystème microbien voire favoriser le développement de souches antibiorésistantes ([Karunasagar et al. 1994](#); [Cabello 2006](#)). Ils limitent cependant le développement de microorganismes à stratégie r (développement rapide, sans spécification ou compétition) en élevage larvaire. En aquaculture, il est reconnu que les techniques employées (traitement de l'eau, antibiotique, eutrophisation) favorisent le développement de ces bactéries, souvent pathogènes, au détriment des bactéries à stratégie k (développement moins rapide, spécification et compétition) ([Vadstein et al. 2018b](#)). La mise au point de différentes souches probiotiques pouvant être distribuées selon une séquence précise pourrait limiter les niches écologiques disponibles au développement de microorganismes pathogènes et ainsi améliorer la santé des élevages tout en limitant l'utilisation des antibiotiques. D'autres méthodes, telles que l'utilisation de peptides antimicrobiens dans l'eau d'élevage, sont aussi développées en aquaculture pour limiter les antibiotiques ([Flegel, 2019](#)) et pourraient être envisagées au sein des élevages larvaires de *P. stylirostris*.

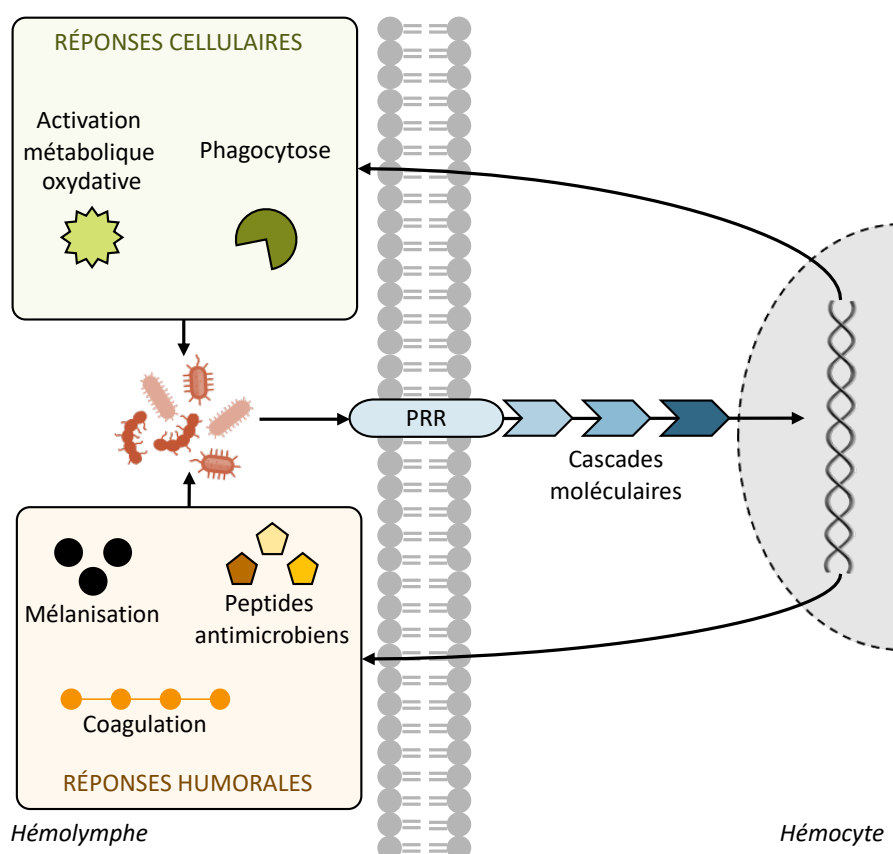


FIGURE 68 – Réponse immunitaire chez les crevettes pénéides (Simplifié de Tassanakajon et al. 2013).

Les pathogènes (en rouge) sont reconnus par les PRR (pathogen recognition receptor) qui initient des cascades moléculaires à l'origine de réponses cellulaires et humorales.

VIII.1.5.b- Biomarqueurs bactériens de mauvaise santé : outils de détection des mortalités à venir

Au-delà des communautés potentiellement bénéfiques, il est également possible que les mortalités larvaires résultent de la présence de bactéries pathogènes et / ou opportunistes. Des biomarqueurs bactériens de la mauvaise santé des élevages ont donc aussi été recherchés. Dans l'objectif de développer des outils de détection précoces utilisables avant le début des élevages larvaires dans l'ensemble des écloseries du territoire, nous avons sélectionnés les ASVs significativement plus abondants dans les élevages en mauvaise santé et uniquement présents dans les intrants de ces élevages (absents des intrants en bonne santé). Par cette approche, 6 genres bactériens ont été identifiés : *Portibacter*, *Ponticaulis*, *Oceanococcus*, *Turicella*, *P3OB-42* et *Celeribacter*. Le développement d'amorces spécifiques de ces genres pourrait permettre la mise au point de méthodes de détection de type PCR ou qPCR réalisables en amont du début des élevages larvaires et utilisables à l'échelle de toutes les écloseries. La détection de ces biomarqueurs dans les intrants et dans les élevages pourrait signaler de potentielles mortalités à venir. Bien que cette méthode ne permette pas de solutionner directement les mortalités larvaires, elle pourrait éviter des pertes économiques importantes en prévenant le lancement d'élevages voués à l'échec. Sur le long terme, le développement de techniques d'élevage pour limiter ou empêcher la propagation de ces microorganismes pourrait également aider la filière. Le développement d'amorces plus spécifiques à chaque écloserie est aussi envisageable. Par exemple, les genres *Marivita*, *Aestuariicoccus* et *Nioella* (article 5, chap.VI, partie VI.3) pourraient être des biomarqueurs spécifiques de la mauvaise santé des élevages à la SASV. Cependant, ces propositions ne sont que des hypothèses et peu de données sont disponibles dans la littérature sur ces genres bactériens. Des analyses complémentaires et des validations expérimentales devront être réalisées pour confirmer ou infirmer leur rôle dans la mauvaise santé des élevages. Dans un premier temps, une recherche systématique de ces communautés procaryotiques au cours des élevages pourrait permettre d'établir une potentielle corrélation entre la présence des genres identifiés et les mortalités larvaires. Dans un second temps, des méthodes de culture des bactéries identifiées pourraient être développées pour expérimentalement valider un lien de causalité entre la présence des genres identifiés et les mortalités larvaires. De plus, des analyses devront être consacrées à l'étude des profils de variations d'abondance de ces biomarqueurs au cours du développement larvaire. Des analyses multivariées de type ACC ou RDA pourraient également être effectuées pour évaluer les liens existants entre les paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage et les communautés procaryotiques identifiées par la méta-analyse.

Des processus plus complexes pourraient être impliqués dans les mortalités larvaires. Par exemple, des bactéries appartenant au core microbien des larves pourraient passer d'un mode de vie commensal à un statut de pathogène sous l'effet de facteurs de stress ou de modifications environnementales (Egan & Gardiner 2016). De la même manière, l'eutrophisation progressive du milieu d'élevage combinée à l'utilisation prophylactique d'antibiotique peuvent favoriser le développement de bactéries opportunistes ou pathogènes dans l'eau des larves et ainsi déséquilibrer le ratio d'abondance entre les bactéries bénéfiques et néfastes (Vadstein et al. 2018a). Les mortalités larvaires pourraient ainsi résulter d'actions synergiques d'un consortium de microorganismes. Par exemple, chez l'huître *C. gigas*, le POMS (Pacific Oyster Mortality Syndrome) résulte d'une infection virale à OsHV-1 combinée à une dysbiose du microbiote total des animaux (de Lorgeril et al. 2018). Le virus cible les hémocytes et entraîne une modification du profil de transcription des

peptides antimicrobiens menant ainsi à une prolifération de bactéries opportunistes puis à une septicémie. Cette étude montre que des maladies polymicrobiennes peuvent affecter les élevages aquacoles. En ce sens, une étude de l'ensemble des microorganismes du microbiote des élevages larvaires de *P. stylirostris* permettrait d'approfondir la compréhension des interactions hôte – microbiote. En effet, différents microorganismes peuvent, *via* une dysbiose, impacter la santé des animaux. Ainsi [Xiong et al. \(2018\)](#) ont montré que des crevettes *P. vannamei* juvéniles infectées avec le WSSV (White Spot Syndrom Virus) présentaient une dysbiose des communautés micro-eucaryotiques (protozoaires et microalgues) de leur microbiote intestinal. Ils ont également mis en évidence qu'il était possible de quantifier le degré de gravité de la maladie en se basant sur les profils de variations de certains taxons de micro-eucaryotes indiquant ainsi que ces microorganismes pouvaient aussi être des biomarqueurs de l'état de santé des crevettes. Au niveau fongique, une infection expérimentale des crevettes *P. vannamei* adultes par la microsporidie, *Enterocytozoon hepatopenai*, a entraîné une dysbiose des communautés bactériennes et fongiques associées à leur hépatopancréas ([López-Carvalho et al. 2022](#)). Enfin, [Zhou et al. \(2022\)](#) ont étudié le virome de crevettes géantes d'eau douce, *Macrobrachium rosengerjii*. Ils ont remarqué une abondance virale beaucoup plus importante dans les branchies, l'hépatopancréas et les muscles des animaux affectés par un retard de croissance (GRD, growth retardation disease) dont la cause n'avait pas encore été identifiée. L'étude approfondie de l'ensemble des microorganismes associés aux élevages larvaires de *P. stylirostris* pourrait donc permettre de mieux comprendre les épisodes de mortalités massives.

VIII.2- Points de discussion et limites de l'étude

VIII.2.1- Communautés procaryotiques actives

Au cours de cette thèse, les communautés procaryotiques actives ([Stoeck et al. 2007](#)) associées aux élevages larvaires de *P. stylirostris* ont été analysées en réalisant des extractions d'ARNs suivies de rétrotranscriptions en ADNc et de séquençages Illumina HiSeq du gène codant pour l'ARNr 16S (chap. III, partie III.1). Cette approche a été utilisée car elle est recommandée dans le cadre d'études visant à établir des diagnostics de santé et à mettre en évidence les assemblages microbiens vivants au sein d'un écosystème d'intérêt ([Yates et al. 2021](#)). Bien que l'ARN soit considéré comme une molécule instable, il permet, contrairement à l'ADN, de limiter la détection de faux négatifs (microorganismes absents d'un écosystème mais détectés par l'analyse) et de faux positifs (microorganismes présents dans un écosystème mais non détectés par l'analyse) ([Cristescu 2019](#)). Alors que l'ADN permet de mettre en évidence les communautés microbiennes actives, dormantes et mortes, l'ARN permet d'identifier uniquement les microorganismes dormants ou actifs et donc vivants. En effet, un microorganisme dormant conserve une machinerie cellulaire réduite menant à une faible transcription de certains ARNs pouvant être détectés lors des analyses par extractions d'ARN ([Blagodatskaya & Kuzyakov 2013](#)). Certaines bactéries du sol sont même capables de passer rapidement d'un état actif à un état inactif et sont dites potentiellement actives ([Blagodatskaya & Kuzyakov 2013](#)). Ces constatations soulèvent un débat quant à l'utilisation des termes actifs ([Stoeck et al. 2007](#)) ou vivants ([Cristescu 2019](#); [Yates et al. 2021](#)) pour désigner correctement les communautés microbiennes mises en évidence par les approches ARN. De manière générale, les approches par analyses de l'ARN ou de l'ADN ne mènent pas

aux mêmes conclusions biologiques et il est recommandé de combiner les 2 méthodes pour mieux comprendre les assemblages microbiens vivants ou morts de l'écosystème étudié (Stoeck et al. 2007). Cependant, pour des raisons budgétaires cela n'a pas pu être considéré dans le cadre des travaux présentés ici. Dans l'objectif de construire une base de données regroupant plusieurs élevages issus d'écloseries différentes et présentant des taux de survie contrastés, l'approche ARN a donc été choisie pour la caractérisation des communautés microbiennes associées aux élevages et la mise en évidence de biomarqueurs.

VIII.2.2- Biais expérimentaux

Les projets de métabarcoding peuvent présenter des biais et des limites dont il est important d'avoir conscience. En effet, les choix concernant la méthode d'extraction des acides nucléiques, la région à séquencer du gène codant pour l'ARNr 16S, la technologie de séquençage, les analyses des données de séquençage et la normalisation de ces données peuvent chacun biaiser les conclusions biologiques finales. Par exemple, Xue et al. (2018) ont montré que les microorganismes mis en évidence pouvaient varier selon le kit d'extraction d'ADN utilisé et suggèrent que certaines communautés pourraient être avantagées par certaines méthodes d'extraction et ainsi biaiser les interprétations biologiques. Au cours de cette thèse, des kits d'extraction différents et adaptés à chaque type d'échantillon ont donc été utilisés (chap. II, partie II.5.1). Il a également été montré que le choix de la région hypervariable du gène codant pour l'ARNr 16S pouvait influencer l'amplification des séquences et leur assignation taxonomique et ainsi impacter les assemblages microbiens mis en évidence en aval (Soergel et al. 2012; Ghyselinck et al. 2013). Cependant, l'amplification de la région hypervariable V4 est recommandée pour les analyses de séquençage « short reads » (50 à 300pb) car elle est considérée comme plus stable pour étudier les communautés procaryotiques (Ghyselinck et al. 2013). De plus, l'utilisation du couple d'amorces 515F/806R au cours de cette thèse, permet un regroupement optimal des séquences courtes de procaryotes (Caporaso et al. 2011). Au-delà de ces biais expérimentaux, des erreurs de séquençage peuvent également impacter les analyses de diversité. En effet, l'étape d'amplification PCR requise par les technologies de 2^{ème} génération peut aboutir à la formation de chimères (Fig. 47, chap. III, partie III.3.1.d) et il a été montré que le séquençage Illumina HiSeq présentait un taux d'erreur médian de 0,112% (Stoler & Nekrutenko 2021). L'algorithme DADA2 a d'ailleurs été créé pour pallier à ces erreurs mais possède ses propres limites puisque son utilisation peut mener à une surestimation de la diversité microbienne (Callahan et al. 2016). Pour limiter cette dernière, l'algorithme dbOTU3 (Olesen et al. 2017) a été utilisé sur le jeu de données final avant de réaliser la méta-analyse (chap. VII). La prise en compte de l'ensemble de ces biais et de ces limites permet de diminuer les erreurs d'interprétations biologiques. Pour aller plus loin, une approche par séquençage « long read » (> 300pb) ou par approche culturale (bien que moins de 1% de la diversité total soit cultivable) pourrait permettre une compréhension approfondie des écosystèmes microbiens des élevages larvaires de *P. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie. Par exemple, la mise au point de techniques de culture des microorganismes chitinolytiques permettrait d'étudier plus en détails les *Chitinophagales* qui ont largement été mises en évidence au cours des travaux de cette thèse. De telles approches expérimentales ont déjà permis de caractériser les populations de *Vibrio* colonisant l'hépatopancréas et l'hémolymphe de *P. vannamei* adultes en bonne santé ainsi que celles associées à des larves et des post-larves de *P. vannamei* en mauvaise santé (Gomez-Gil et al. 1998; Vandenberghe et al. 1999).

VIII.2.3- Un jeu de données à compléter

Comme expliqué dans le chapitre VII (partie VII.4.2), le jeu de données utilisé au cours de cette thèse devra être amélioré en vue de futures analyses. En effet, le manque de données relatives à des élevages en bonne santé à la SASV et en mauvaise santé dans les écloséries privées entraîne un biais sur la mise en évidence de biomarqueurs qui pourraient être éclosérie-dépendants. De plus, les protocoles d'élevage étant spécifiques à chaque éclosérie, les variations microbiennes observées pourraient résulter de différences concernant les protocoles alimentaires, les antibiotiques utilisés et les eaux de remplissage des bacs provenant d'environnements lagunaires géographiquement éloignés. L'implémentation de nouvelles données permettrait de compléter le jeu de données existant et de mieux appréhender la contribution de chaque facteur. Dans cet objectif, des campagnes d'échantillonnages ont été menées dans une autre éclosérie privée de Nouvelle-Calédonie (éclosérie privée 3) en juillet 2021 ainsi qu'à la SASV en novembre 2021. Au cours de chacune de ces campagnes, les élevages considérés ont montré des taux de survie contrastés. Les données issues de ces prélèvements pourraient ainsi permettre une résolution plus fine des biomarqueurs bactériens.

VIII.3- Conclusion

Pour conclure, les travaux de cette thèse ont permis, pour la première fois, de mieux comprendre les interactions hôte – microbiote – environnement au sein des élevages larvaires de *P. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie (Fig. 69). Comme schématisé dans la figure 69, nous avons mis en évidence que des transmissions microbiennes horizontales et verticales pouvaient être impliquées au moment de la mise en place du microbiote larvaire et potentiellement durablement impacter les communautés procaryotiques associées aux élevages. Cette hypothèse est renforcée par l'identification d'un core microbien commun à l'ensemble des échantillons d'élevage (plus de 700 échantillons) analysés au cours de cette thèse et provenant d'écloséries différentes soumises ou non à des épisodes de mortalités larvaires. Au cours du développement larvaire, nous avons montré que l'eutrophisation du milieu, l'ajout d'antibiotique, le stade de développement des larves ainsi que leur état de santé modulaient les communautés de procaryotes associés aux larves et à leur milieu d'élevage (Fig. 69). Cependant, des analyses supplémentaires seront nécessaires pour évaluer l'occurrence de processus stochastiques d'assemblages des communautés microbiennes. Enfin, des biomarqueurs bactériens de l'état de santé des larves ont été mis en évidence et devraient permettre de développer des outils de détection de type PCR ou qPCR qui pourront être utilisés pour évaluer le devenir des élevages larvaires à partir des communautés bactériennes associées aux intrants. Bien que des variations microbiennes aient été observées entre les élevages en bonne et en mauvaise santé, il est difficile de déterminer si ces modifications sont une cause ou une conséquence des mortalités larvaires. En conséquence, il n'est donc pas possible de répondre de manière dichotomique (oui ou non) à la question scientifique posée dans l'introduction générale de ce manuscrit (les variations des communautés procaryotiques associées aux élevages pourraient-elles expliquer les mortalités larvaires observées ?). Cependant, cette thèse constitue une première étape dans la compréhension des assemblages microbiens associés aux larves et à leur environnement. Elle permet également de souligner le rôle important des intrants d'eau de mer lagunaire

dans la réussite des élevages et offre de nombreuses perspectives de travail visant à maîtriser les communautés procaryotiques associées aux élevages larvaires de *P. stylirostris*.

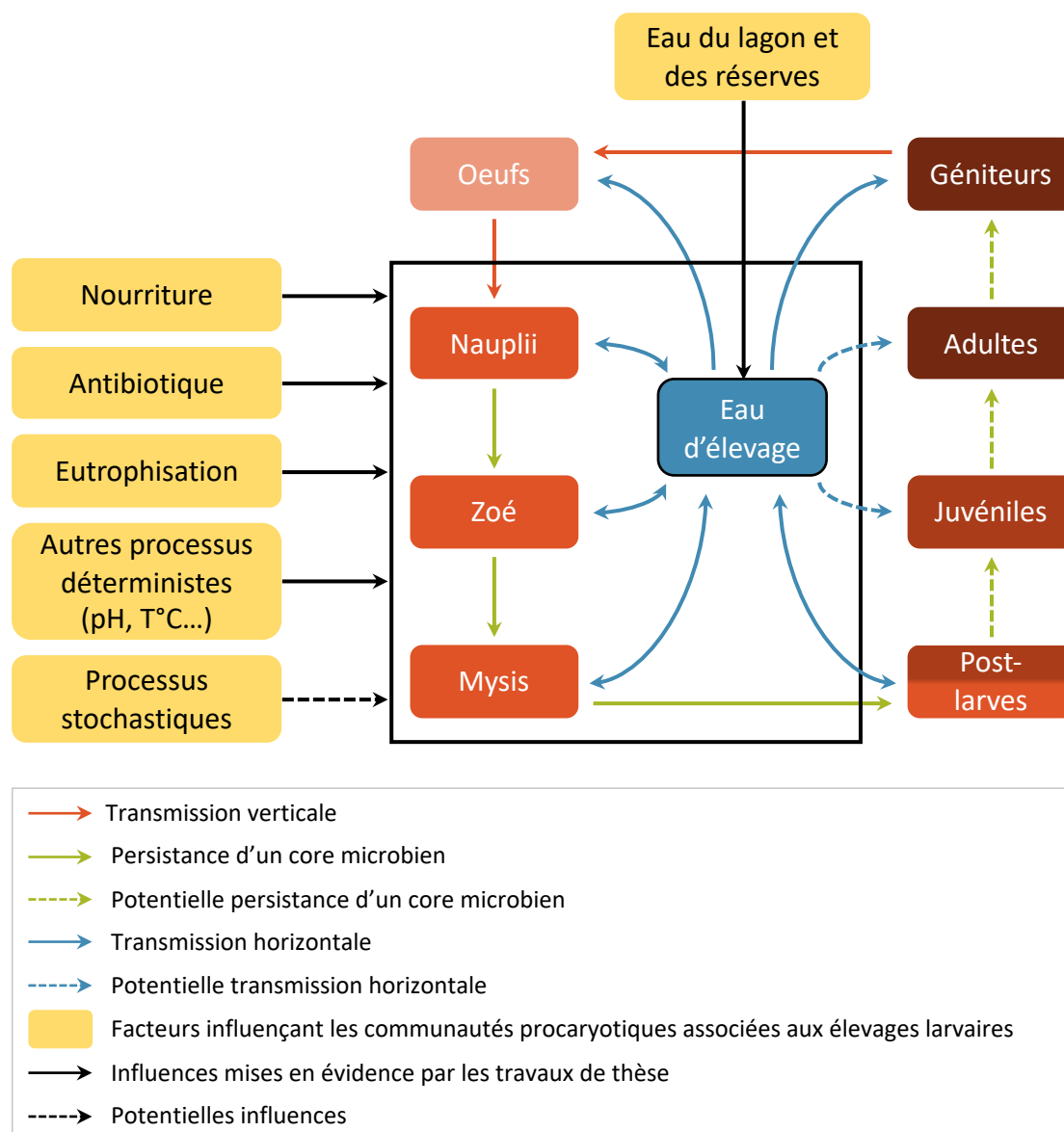


FIGURE 69 – Schéma bilan résumant les Interactions hôte – microbiote – environnement au sein des élevages de *Penaeus stylirostris*.

Cette figure synthétise les résultats obtenus par les travaux de cette thèse. Les flèches pleines représentent ce qui a été démontré et les flèches en pointillés représentent les hypothèses qui ont été faites.

Bibliographie

A

Al-Masqari ZA, Guo H, Wang R, Yan H, Dong P, Wang G, Zhang D. 2022. Effects of high temperature on water quality, growth performance, enzyme activity and the gut bacterial community of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research* 53:3283–3296.
DOI: [10.1111/are.15836](https://doi.org/10.1111/are.15836).

Allali I, Arnold JW, Roach J, Cadenas MB, Butz N, Hassan HM, Koci M, Ballou A, Mendoza M, Ali R, Azcarate-Peril MA. 2017. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiology* 17:1–16.
DOI: [10.1186/s12866-017-1101-8](https://doi.org/10.1186/s12866-017-1101-8).

Aminot A, Kérouel R. 2004. *Hydrologie des écosystèmes marins: paramètres et analyses*. Ifremer.

Amoah K, Huang QC, Dong XH, Tan BP, Zhang S, Chi SY, Yang QH, Liu HY, Yang YZ. 2020. *Paenibacillus polymyxa* improves the growth, immune and antioxidant activity, intestinal health, and disease resistance in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 518:734563.
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.734563](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734563).

Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11.
DOI: [10.1186/gb-2010-11-10-r106](https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106).

Austin B, Zhang XH. 2006. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43:119–124.
DOI: [10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x).

B

Bachere E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews* 198:149–168.
DOI: [10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x).

Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114:173–186.
DOI: [10.1016/j.vetmic.2006.01.009](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009).

Basic M, Bleich A. 2019. Gnotobiotics: Past, present and future. *Laboratory Animals* 53:232–243.
DOI: [10.1177/0023677219836715](https://doi.org/10.1177/0023677219836715).

Bayne CJ. 1990. Non-Self Phagocytosis Phagocytosis appears to be an ancient line of defense in Invertebrate Recognition. *Bioscience* 40:723–731.

Beliaeff B, Chim L, Della Patrona L, ..., Wabete N. 2009. DEDUCTION: A Research Project for Shrimp Farming Sustainability in New Caledonia. In: The 11th Pacific Science Inter-Congress : Pacific Countris and their Ocean : Facing Local and Global Changes. March 2 - 6 2009. ed. Tahiti, French Polynesia,.

Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 67:192–211.
DOI: [10.1016/j.soilbio.2013.08.024](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024).

Bland JM, Altman DG. 1995. Statistics notes: Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310:170–170.
DOI: [10.1136/bmj.310.6973.170](https://doi.org/10.1136/bmj.310.6973.170).

Bonami JR, Haddon KW, Mari J, Poulos BT, Lightner DV. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: Characterization of the viral agent. *Journal of General Virology* 78:313–319.
DOI: [10.1099/0022-1317-78-2-313](https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-313).

Bratanis E, Andersson T, Lood R, Bukowska-Faniband E. 2020. Biotechnological Potential of *Bdellovibrio* and Like Organisms and Their Secreted Enzymes. *Frontiers in Microbiology* 11:1–14.
DOI: [10.3389/fmicb.2020.00662](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00662).

Brosnan CA, Voinnet O. 2009. The long and the short of noncoding RNAs. *Current Opinion in Cell Biology* 21:416–425.
DOI: [10.1016/j.ceb.2009.04.001](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.04.001).

C

Cabello FC. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8:1137–1144.
DOI: [10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x).

Callac N, Boulo V, Giraud C, Beauvais M, Ansquer D, Ballan V, Maillez JR, Wabete N, Pham D. 2022. Microbiota of the Rearing Water of *Penaeus stylirostris* Larvae Influenced by Lagoon Seawater and Specific Key Microbial Lineages of Larval Stage and Survival. *Microbiology Spectrum*. 10,6
DOI: [10.1128/spectrum.04241-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.04241-22).

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13:581–583.
DOI: [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869).

Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11:2639–2643.
DOI: [10.1038/ismej.2017.119](https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119).

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421-430
DOI: [10.1186/1471-2105-10-421](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421).

Campa-Córdova AL, Hernández-Saavedra NY, De Philippis R, Ascencio F. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology* 12:353–366.
DOI: [10.1006/fsim.2001.0377](https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0377).

Cantarel BL, Lombard V, Henrissat B. 2012. Complex Carbohydrate Utilization by the Healthy Human Microbiome. *PLoS ONE* 7:e28742.
DOI: [10.1371/journal.pone.0028742](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028742).

Cao H, An J, Zheng W, He S. 2015. *Vibrio cholerae* pathogen from the freshwater-cultured whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* and control with *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 130:13–20.
DOI: [10.1016/j.jip.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.002).

Cao H, Wang H, Yu J, An J, Chen J. 2019. Encapsulated *bdellovibrio* powder as a potential bio-disinfectant against whiteleg shrimp-pathogenic vibrios. *Microorganisms* 7.
DOI: [10.3390/microorganisms7080244](https://doi.org/10.3390/microorganisms7080244).

Caoy Y. 2020. microbiomeMarker: microbiome biomarker analysis toolkit.
DOI: [10.5281/zenodo.3749415](https://doi.org/10.5281/zenodo.3749415).

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:4516–4522.
DOI: [10.1073/pnas.1000080107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107).

Cassard A-M, Thomas M. 2022. Les microbiotes humains : des alliés pour notre santé. *Encyclopédie de l'Environnement*.
DOI: [ISSN 2555-0950](https://doi.org/10.1016/j.encycl.2022.09.001).

Chao A. 1984. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11:265–27

Bibliographie

Chao A, Lee SM. 1992. Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. *Journal of the American Statistical Association* 87:210–217.

DOI: [10.1080/01621459.1992.10475194](https://doi.org/10.1080/01621459.1992.10475194).

Chao A, Yang MCK. 1993. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* 80:193–201.

DOI: [10.1093/biomet/80.1.193](https://doi.org/10.1093/biomet/80.1.193).

Chatton E. 1937. Titres et travaux scientifiques. In: Sète, France: E. Sottano,.

Chen Z, Chang Z, Zhang L, Jiang Y, Ge H, Song X, Chen S, Zhao F, Li J. 2019. Effects of water recirculation rate on the microbial community and water quality in relation to the growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *BMC Microbiology* 19:1–15.

DOI: [10.1186/s12866-019-1564-x](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1564-x).

Cho I, Blaser MJ. 2012. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* 13:260–270.

DOI: [10.1038/nrg3182](https://doi.org/10.1038/nrg3182).

Cloern J. 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210:223–253.

DOI: [10.3354/meps210223](https://doi.org/10.3354/meps210223).

Collado L, Figueras MJ. 2011. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews* 24:174–192.

DOI: [10.1128/CMR.00034-10](https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10).

Conway JR, Lex A, Gehlenborg N. 2017. UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 33:2938–2940.

DOI: [10.1093/bioinformatics/btx364](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx364).

Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Gallardo-Becerra L, Mendoza-Vargas A, Sánchez F, Vichido R, Brieba LG, Viana MT, Sotelo-Mundo RR, Ochoa-Leyva A. 2017. Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports* 7:11783.

DOI: [10.1038/s41598-017-11805-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-11805-w).

Cornejo-Granados F, Gallardo-Becerra L, Leonardo-Reza M, Ochoa-Romo JP, Ochoa-Leyva A. 2018. A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. *PeerJ*. 6:e5382

DOI: [10.7717/peerj.5382](https://doi.org/10.7717/peerj.5382).

Cristescu ME. 2019. Can Environmental RNA Revolutionize Biodiversity Science? *Trends in Ecology and Evolution* 34:694–697.

DOI: [10.1016/j.tree.2019.05.003](https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.05.003).

D

Dakin W. 1938. The Habits and Life-History of a Penaeid Prawn. *Proceedings of the Zoological Society of London* A108:163–181.

DOI: [10.1111/j.1469-7998.1938.tb07893.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1938.tb07893.x).

Dall W, Hill J, Rothlisberg PC, Staples DJ. 1990. The Biology of the Penaeidae (Advances in marine biology). Blaxter JHS and Southward AJ (Eds.). Academic Press, New York, USA. Volume 27, 489 p.

Desai A, Jere A. 2012. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clinical Genetic* 81:503–510

DOI: [10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x).

Destoumieux-Garzón D, Rosa RD, Schmitt P, Barreto C, Vidal-Dupiol J, Mitta G, Gueguen Y, Bachère E. 2016. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371:20150300.

DOI: [10.1098/rstb.2015.0300](https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0300).

Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot NS, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloë D, Le Gall C, Schaëffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrézic F. 2013. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Briefings in Bioinformatics* 14:671–683.

DOI: [10.1093/bib/bbs046](https://doi.org/10.1093/bib/bbs046).

Ding ZF, Cao MJ, Zhu XS, Xu GH, Wang RL. 2017. Changes in the gut microbiome of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in response to White spot syndrome virus (WSSV) infection. *Journal of Fish Diseases* 40:1561–1571.

DOI: [10.1111/jfd.12624](https://doi.org/10.1111/jfd.12624).

Duret L. 2008. Neutral theory: The null hypothesis of molecular evolution. *Nature Education* 1(1):218.

E

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635–1638.

DOI: [10.1126/science.1110591](https://doi.org/10.1126/science.1110591).

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194–2200.

DOI: [10.1093/bioinformatics/btr381](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381).

Egan S, Gardiner M. 2016. Microbial Dysbiosis: Rethinking Disease in Marine Ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 7:1–8.

DOI: [10.3389/fmicb.2016.00991](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00991).

Escudie F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294.

DOI: [10.1093/bioinformatics/btx791](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791).

Evans C, Hardin J, Stoebel DM. 2018. Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Briefings in bioinformatics* 19:776–792.

DOI: [10.1093/bib/bbx008](https://doi.org/10.1093/bib/bbx008).

F

Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito-Taki T, Kondo H, Aoki T, Hirono I. 2009. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS Journal* 276:5298–5306.

DOI: [10.1111/j.1742-4658.2009.07225.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07225.x).

Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. 2008. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* 320:1034–1039.

DOI: [10.1126/science.1153213](https://doi.org/10.1126/science.1153213).

Fallet M, Montagnani C, Petton B, Dantan L, de Lorgeril J, Comarmond S, Chaparro C, Toulza E, Boitard S, Escoubas J-M, Vergnes A, Le Grand J, Bulla I, Gueguen Y, Vidal-Dupiol J, Grunau C, Mitta G, Cosseau C. 2022. Early life microbial exposures shape the *Crassostrea gigas* immune system for lifelong and intergenerational disease protection. *Microbiome* 10:1–21.

DOI: [10.1186/s40168-022-01280-5](https://doi.org/10.1186/s40168-022-01280-5).

Fan L, Wang Z, Chen M, Qu Y, Li J, Zhou A, Xie S, Zeng F, Zou J. 2019. Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment. *Science of The Total Environment* 657:1194–1204.

DOI: [10.1016/j.scitotenv.2018.12.069](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.069).

Bibliographie

FAO. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Health and Nutritional properties of probiotics in food including powder milk with lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina.

FAO. 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO.

DOI: [10.4060/cc0461en](https://doi.org/10.4060/cc0461en).

Faure D, Simon JC, Heulin T. 2018. Holobiont: a conceptual framework to explore the eco-evolutionary and functional implications of host–microbiota interactions in all ecosystems. *New Phytologist* 218:1321–1324.

DOI: [10.1111/nph.15199](https://doi.org/10.1111/nph.15199).

Felder DL, Álvarez F, Goy JW, Lemaitre R. 2009. Decapoda (Crustacea) of the Gulf of Mexico, with comments on the amphionidacea. *Gulf of Mexico Origin, Waters, and Biota* 1:1019–1104.

Fernández-Gómez B, Richter M, Schüller M, Pinhassi J, Acinas SG, González JM, Pedrós-Alió C. 2013. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *The ISME Journal* 7:1026–1037.

DOI: [10.1038/ismej.2012.169](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.169).

Flegel TW. 2019. A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 50:249–266.

DOI: [10.1111/jwas.12589](https://doi.org/10.1111/jwas.12589).

Fontaine CT, Lightner DV. 1973. Observations on the process of wound repair in penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 22:23–33.

DOI: [10.1016/0022-2011\(73\)90005-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(73)90005-0).

G

Garibay-Valdez E, Martínez-Porchas M, Calderón K, Vargas-Albore F, Gollas-Galván T, Martínez-Córdova L. 2020. Taxonomic and functional changes in the microbiota of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) associated with postlarval ontogenetic development. *Aquaculture* 518:734842.

DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.734842](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734842).

Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. 2015. Rhodobacteraceae fam. nov. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, 1–2.

DOI: [10.1002/9781118960608.fbm00173](https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00173).

Ghoul M, Mitri S. 2016. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends in Microbiology* 24:833–845.

DOI: [10.1016/j.TIM.2016.06.011](https://doi.org/10.1016/j.TIM.2016.06.011)

Ghyselinck J, Pfeiffer S, Heylen K, Sessitsch A, De Vos P. 2013. The effect of primer choice and short read sequences on the outcome of 16S rRNA gene based diversity studies. *PLoS one* 8:1–14.

DOI: [10.1371/journal.pone.0071360](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071360).

Giraud C, Callac N, Beauvais M, Mailliez J, Ansquer D, Selmaoui-Folcher N, Pham D, Wabete N, Boulo V. 2021. Potential lineage transmission within the active microbiota of the eggs and the nauplii of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: possible influence of the rearing water and more. *PeerJ* 9:e12241.

DOI: [10.7717/peerj.12241](https://doi.org/10.7717/peerj.12241).

Giraud C, Callac N, Boulo V, Lam J-S, Pham D, Selmaoui-Folcher N, Wabete N. 2022. The Active Microbiota of the Eggs and the Nauplii of the Pacific Blue Shrimp *Litopenaeus stylirostris* Partially Shaped by a Potential Vertical Transmission. *Frontiers in Microbiology* 13.

DOI: [10.3389/fmicb.2022.886752](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.886752).

Glass G. 1976. Primary, Secondary, and Meta-Analysis of Research. *Educational researcher*:5:3–8.

Glassman SI, Martiny JBH. 2018. Broadscale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact. *mSphere* 3:e00148–18.

DOI: [10.1128/mSphere.00148-18](https://doi.org/10.1128/mSphere.00148-18)

Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, Bruns G, Yarza P, Peplies J, Westram R, Ludwig W. 2017. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology* 261:169–176.

DOI: [10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198).

Goarant C, Régnier F, Brizard R, Marteau AL. 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* 169:291–296.

DOI: [10.1016/S0044-8486\(98\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00380-9).

Goarant C, Merien F, Berthe F, Mermoud I, Perolat P. 1999. Arbitrarily Primed PCR To Type *Vibriosp.* Pathogenic for Shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1145–1151.

DOI: [10.1128/AEM.65.3.1145-1151.1999](https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1145-1151.1999).

Goarant C, Harache Y, Herbland A, Mugnier C. 2003. *Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie*. DOI: Goarant Cyrille, Harache Yves, Herbland Alain, Mugnier Chantal (2004). *Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Actes du colloque, Nouméa-Koné, 2-6 juin 2003*. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00716/82825/>.

Goarant C, Ansquer D, Herlin J, Domalain D, Imbert F, De Decker S. 2006. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253:105–113.

DOI: [10.1016/j.aquaculture.2005.07.031](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.031).

Golyshin PN, Chernikova TaN, Abraham WR, Lünsdorf H, Timmis KN, Yakimov MM. 2002. Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:901–911.

DOI: [10.1099/ijs.0.01890-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.01890-0).

Gomez-Gil B, Tron-Mayén L, Roque A, Turnbull JF, Inglis V, Guerra-Flores AL. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163:1–9.

DOI: [10.1016/S0044-8486\(98\)00162-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00162-8).

Guo K, Zhao Z, Luo L, Wang S, Zhang R, Xu W, Qiao G. 2021. Immune and intestinal microbiota responses to aerial exposure stress in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Aquaculture* 541:736833.

DOI: [10.1016/j.aquaculture.2021.736833](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736833).

H

Haidich AB. 2010. Meta-analysis in medical research. *Hippokratia* 14:29–37.

Hansen GH, Olafsen JA. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38:1–26.

DOI: [10.1007/s002489900158](https://doi.org/10.1007/s002489900158).

Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K. 2009. Erratum: Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 54:1023–1023.

DOI: [10.4319/lo.2009.54.3.1023](https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.3.1023).

Heyse J, Props R, Kongnuan P, De Schryver P, Rombaut G, Defoirdt T, Boon N. 2021. Rearing water microbiomes in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larviculture assemble stochastically and are influenced by the microbiomes of live feed products. *Environmental Microbiology* 23:281–298.

DOI: [10.1111/1462-2920.15310](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15310).

Holmes RM, Aminot A, Kérouel R, Hooker BA, Peterson BJ. 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56:1801–1808.

DOI: [10.1139/f99-128](https://doi.org/10.1139/f99-128).

Bibliographie

Holt CC, van der Giezen M, Daniels CL, Stentiford GD, Bass D. 2020. Spatial and temporal axes impact ecology of the gut microbiome in juvenile European lobster (*Homarus gammarus*). *ISME Journal* 14:531–543.
DOI: [10.1038/s41396-019-0546-1](https://doi.org/10.1038/s41396-019-0546-1).

Holt CC, Bass D, Stentiford GD, van der Giezen M. 2021. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 186:107387.
DOI: [10.1016/j.jip.2020.107387](https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107387).

Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold LM, Tindall BJ, Gronow S, Kyrpidis NC, Woyke T, Göker M. 2020. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Frontiers in Microbiology* 11.
DOI: [10.3389/fmicb.2020.00468](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468).

Huang Z, Li X, Wang L, Shao Z. 2016. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 47:1737–1746.
DOI: [10.1111/are.12628](https://doi.org/10.1111/are.12628).

Huang F, Pan L, Song M, Tian C, Gao S. 2018. Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:8585–8598.
DOI: [10.1007/s00253-018-9229-5](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9229-5).

Hutchins DA, Fu F. 2017. Microorganisms and ocean global change. *Nature Microbiology* 2:1–11.
DOI: [10.1038/nmicrobiol.2017.58](https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.58).

Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, ..., White O. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207–214.
DOI: [10.1038/nature11234](https://doi.org/10.1038/nature11234).

I

Ikeda-Ohtsubo W, Brugman S, Warden CH, Rebel JMJ, Folkerts G, Pieterse CMJ. 2018. How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. *Frontiers in Nutrition* 5:1–18.
DOI: [10.3389/fnut.2018.00090](https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00090).

Infante-Villamil S, Huerlimann R, Jerry DR. 2021. Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 13:1077–1096.
DOI: [10.1111/raq.12513](https://doi.org/10.1111/raq.12513).

J

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211:213–236.
DOI: [10.1016/j.imbio.2005.10.015](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015).

Jiravanichpaisal P, Puanglarp N, Petkon S, Donnuea S, Söderhäll I, Söderhäll K. 2007. Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology* 23:815–824.
DOI: [10.1016/j.fsi.2007.03.003](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.003).

K

Kamada N, Seo S-U, Chen GY, Núñez G. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 13:321–335.
DOI: [10.1038/nri3430](https://doi.org/10.1038/nri3430).

Karunasagar I, Pai R, Malathi GR, Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128:203–209.
DOI: [10.1016/0044-8486\(94\)90309-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90309-3).

Karunasagar I, Karunasagar I, Umesha RK. 2001. Microbial Diseases in Shrimp Aquaculture. *Fish Pathology*:121–134.

Kembel SW, Wu M, Eisen JA, Green JL. 2012. Incorporating 16S Gene Copy Number Information Improves Estimates of Microbial Diversity and Abundance. 8:16–18.
DOI: [10.1371/journal.pcbi.1002743](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002743).

Kim BR, Guevarra RB, Lee JH, Kim DW, Seol KH, Lee JH, Kim HB, Isaacson RE. 2017. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:2089–2093.
DOI: [10.4014/jmb.1709.09027](https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027).

Kitani H. 1986. Larval development of the blue shrimp *Penaeus stylirostris* STIMPSON reared in the laboratory. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 52:1121–1130.
DOI: [10.2331/suisan.52.1121](https://doi.org/10.2331/suisan.52.1121).

L

Lahti L, Shetty S. 2020. Tools for microbiome analysis in R. Version 2.1.28.

<http://microbiome.github.com/microbiome>

Lane-Petter W. 1962. The Provision and Use of Pathogen-Free Laboratory Animals. *Journal of the Royal Society of Medicine* 55:253–263.
DOI: [10.1177/003591576205500402](https://doi.org/10.1177/003591576205500402).

Larenas J, Bartholomew J, Troncoso O, Fernández S, Ledezma H, Sandoval N, Vera P, Contreras J, Smith P. 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms* 56:25–30.
DOI: [10.3354/dao056025](https://doi.org/10.3354/dao056025).

Lee J, Hyeon DY, Hwang D. 2020. Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods. *Experimental and Molecular Medicine* 52:1428–1442.
DOI: [10.1038/s12276-020-0420-2](https://doi.org/10.1038/s12276-020-0420-2).

Lee JW, Chiu ST, Wang ST, Liao YC, Chang HT, Ballantyne R, Lin JS, Liu CH. 2022. Dietary SYNSEA probiotic improves the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and reduces the risk of *Vibrio* infection via improving immunity and intestinal microbiota of shrimp. *Fish and Shellfish Immunology* 127:482–491.
DOI: [10.1016/j.fsi.2022.06.071](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.071).

Legrand TPRA, Catalano SR, Wos-Oxley ML, Stephens F, Landos M, Bansemmer MS, Stone DAJ, Qin JG, Oxley APA. 2018. The inner workings of the outer surface: Skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in Yellowtail Kingfish. *Frontiers in Microbiology* 8:1–17.
DOI: [10.3389/fmicb.2017.02664](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02664).

Lein EY, Lal MTM, Maran BAV, Ch'ng CL, Hamasaki K, Sano M, Tuzan AD. 2022. Gastrointestinal Microbiota of Spiny Lobster: A Review. *Fishes* 7:1–17.
DOI: [10.3390/fishes7030108](https://doi.org/10.3390/fishes7030108).

Lemonnier H, Herbland A, Salery L, Soulard B. 2006. “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow out ponds in New Caledonia: Zootechnical and environmental factors. *Aquaculture* 261:1039–1047.
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2006.08.036](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.036).

Lemos LN, Fulthorpe RR, Triplett EW, Roesch LFW. 2011. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods* 86:42–51.
DOI: [10.1016/j.mimet.2011.03.014](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.014).

Leung TLF, Poulin R, Leung TLF, Parasitism RP, Explor- M, Leung TLF, Poulin R. 2021. Mutualism : exploring the many shades of symbioses. *Life & Environment*. 2008. pp107-115
[hal-03246057](https://doi.org/10.3246057)

Li E, Xu C, Wang X, Wang S, Zhao Q, Zhang M, Qin JG, Chen L. 2018. Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 26:381–399.
DOI: [10.1080/23308249.2018.1440530](https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1440530).

Li Z, Zhao Z, Luo L, Wang S, Zhang R, Guo K, Yang Y. 2023. Immune and intestinal microbiota responses to heat stress in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Aquaculture* 563.
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2022.738965](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738965).

Lightner DV, Redman RM, Bell TA. 1983. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 42:62–70.
DOI: [10.1016/0022-2011\(83\)90202-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90202-1).

Lightner DV, Bell TA, Redman RM. 1989. A Review of the Known Hosts, Geographic Range and Current Diagnostic Procedures for the Virus Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. Actes de colloques Ifremer, Tahiti, French Polynesia, 20 Feb – 4 Mar 1989, n°9, chap. 13, pp.113–126.
<https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1481/>

Lin H, Peddada SD. 2020. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications* 11:1–11.
DOI: [10.1038/s41467-020-17041-7](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7).

Liu H, Wang L, Liu M, Wang B, Jiang K, Ma S, Li Q. 2011. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR–DGGE and clone library analyses. *Aquaculture* 317:32–36.
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2011.04.008](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.008).

Liu C, Cui Y, Li X, Yao M. 2021. microeco : an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 97:1–9.
DOI: [10.1093/femsec/fiaa255](https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa255).

Lo CF, Ho CH, Chen CH, Liu KF, Chiu YL, Yeh PY, Peng SE, Hsu HC, Liu HC, Chang CF, Su M Sen, Wang CH, Kou GH. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Disease of Aquatic Organisms* 30:53–72.
DOI: [10.3354/dao030053](https://doi.org/10.3354/dao030053).

Lokmer A, Mathias Wegner K. 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME Journal* 9:670–682.
DOI: [10.1038/ismej.2014.160](https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160).

Lokmer A, Goedknecht MA, Thielges DW, Fiorentino D, Kuenzel S, Baines JF, Mathias Wegner K. 2016. Spatial and temporal dynamics of Pacific oyster hemolymph microbiota across multiple scales. *Frontiers in Microbiology* 7:1–18.
DOI: [10.3389/fmicb.2016.01367](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01367).

Longeon A, Peduzzi J, Barthélemy M, Corre S, Nicolas JL, Guyot M. 2004. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Marine Biotechnology* 6:633–641.
DOI: [10.1007/s10126-004-3009-1](https://doi.org/10.1007/s10126-004-3009-1).

López-Carvallo JA, Cruz-Flores R, Dhar AK. 2022. The emerging pathogen Enterocytozoon hepatopenaei drives a degenerative cyclic pattern in the hepatopancreas microbiome of the shrimp (*Penaeus vannamei*). *Scientific reports* 12:14766.
DOI: [10.1038/s41598-022-19127-2](https://doi.org/10.1038/s41598-022-19127-2).

de Lorgeril J, Lucasson A, Petton B, ..., Mitta G. 2018. Immune-suppression by OshV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nature Communications* 9.
DOI: [10.1038/s41467-018-06659-3](https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3).

Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. :1–21.
DOI: [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8).

Lu Z, Ren Z, Lin W, Shi C, Mu C, Wang C, Wu Q, Ye Y. 2022. Succession, sources, and assembly of bacterial community in the developing crab larval microbiome. *Aquaculture* 548:737600.
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2021.737600](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737600).

Lv X, Li S, Yu Y, Zhang X, Li F. 2020. Characterization of a gill-abundant crustin with microbiota modulating function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 105:393–404.
DOI: [10.1016/j.fsi.2020.07.014](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.014).

M

Ma KY, Chan TY, Chu KH. 2011. Refuting the six-genus classification of *Penaeus* s.l. (Dendrobranchiata, Penaeidae): a combined analysis of mitochondrial and nuclear genes. *Zoologica Scripta* 40:498–508.
DOI: [10.1111/j.1463-6409.2011.00483.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00483.x).

Maddox MB, Manzi JJ. 1976. The Effects Of Algal Supplements On Static System Culture Of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) Larvae1,2. *Proceedings of the annual meeting - World Mariculture Society* 7:677–698.
DOI: [10.1111/j.1749-7345.1976.tb00096.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1976.tb00096.x).

Magoc T, Salzberg SL. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27:2957–2963.
DOI: [10.1093/bioinformatics/btr507](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507).

Magurran A. 2004. Measuring Biological Diversity. Blackwell Science Ltd, Oxford, United Kingdom.

Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2:e593.
DOI: [10.7717/peerj.593](https://doi.org/10.7717/peerj.593).

Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. 2015. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology in Health & Disease* 26.
DOI: [10.3402/mehd.v26.27663](https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27663).

Maraci Ö, Antonatou-Papaioannou A, Jünemann S, Castillo-Gutiérrez O, Busche T, Kalinowski J, Caspers BA. 2021. The Gut Microbial Composition Is Species-Specific and Individual-Specific in Two Species of Estrildid Finches, the Bengalese Finch and the Zebra Finch. *Frontiers in Microbiology* 12:1–15.
DOI: [10.3389/fmicb.2021.619141](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.619141)

Marchesi JR, Ravel J. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3:31.
DOI: [10.1186/s40168-015-0094-5](https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5).

Martin D, Rybicki E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics. Oxford Journals* 16:562–563.
DOI: [10.1093/16.6.562](https://doi.org/10.1093/16.6.562)

Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17:10–12.
DOI: [10.14806/ej.17.1.200](https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200)

Martin BD, Schwab E. 2012. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *International Journal of Biology* 5:32–45.
DOI: [10.5539/ijb.v5n1p32](https://doi.org/10.5539/ijb.v5n1p32).

McMurdie PJ, Holmes S. 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8:1–11.
DOI: [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217).

McMurdie PJ, Holmes S. 2014. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology* 10:e1003531.
DOI: [10.1371/journal.pcbi.1003531](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531).

McNeil NI. 1984. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *The American Journal of Clinical Nutrition* 39:338–342.
DOI: [10.1093/ajcn/39.2.338](https://doi.org/10.1093/ajcn/39.2.338).

Bibliographie

Mermoud I, Costa R, Ferré O, Goarant C, Haffner P. 1998. 'Syndrome 93' in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of three major outbreaks. *Aquaculture* 164:323–335.
DOI: [10.1016/S0044-8486\(98\)00197-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00197-5).

Methou P, Hernández-Ávila I, Aube J, Cuffe-Gauchard V, Gayet N, Amand L, Shillito B, Pradillon F, Cambon-Bonavita MA. 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* 10:1–19.
DOI: [10.3389/fmicb.2019.00808](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00808).

Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. 2011. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biology* 9:1–8.
DOI: [10.1371/journal.pbio.1001127](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127).

Motte E, Yugcha E, Luzardo J, Castro F, Leclercq G, Rodríguez J, Miranda P, Borja O, Serrano J, Terreros M, Montalvo K, Narváez A, Tenorio N, Cedeño V, Mialhe E, Boulo V. 2003. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 219:57–70.
DOI: [10.1016/S0044-8486\(02\)00631-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00631-2).

Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27:31–36.
DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).

N

Nayak SK. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* 41:1553–1573.
DOI: [10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x).

Needleman SB, Wunsch CD. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 48:443–453.
DOI: [10.1016/0022-2836\(70\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90057-4).

Nyholm SV. 2020. In the beginning: egg–microbe interactions and consequences for animal hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375:20190593.
DOI: [10.1098/rstb.2019.0593](https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0593).

O

Offret C, Paulino S, Gauthier O, Château K, Bidault A, Corporeau C, Miner P, Petton B, Pernet F, Fabioux C, Paillard C, Le Blay G. 2020. The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* 96:1–12.
DOI: [10.1093/femsec/fiaa078](https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa078)

Offret C, Gauthier O, Despréaux G, Bidault A, Corporeau C, Miner P, Petton B, Pernet F, Fabioux C, Paillard C, Le Blay G. 2022. Microbiota of the digestive glands and extrapallial fluids of clams evolve differently over time depending on the intertidal position. *Microbial Ecology* 85:288–297
DOI: [10.1007/s00248-022-01959-0](https://doi.org/10.1007/s00248-022-01959-0)

Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2020. CRAN - Package vegan. <https://cran.rproject.org/web/packages/vegan/index.html>

Olesen SW, Duvallet C, Alm EJ. 2017. dbOTU3: A new implementation of distribution-based OTU calling. *PLoS ONE* 12:e0176335.
DOI: [10.1371/journal.pone.0176335](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176335).

Oliphant K, Allen-Vercoe E. 2019. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome* 7:91.
DOI: [10.1186/s40168-019-0704-8](https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8).

Ooi MC, Goulden EF, Smith GG, Nowak BF, Bridle AR. 2017. Developmental and gut-related changes to microbiomes of the cultured juvenile spiny lobster *Panulirus ornatus*. *FEMS Microbiology Ecology* 93:1–10.
DOI: [10.1093/femsec/fix159](https://doi.org/10.1093/femsec/fix159).

Orsi WD, Smith JM, Liu S, Liu Z, Sakamoto CM, Wilken S, Poirier C, Richards TA, Keeling PJ, Worden AZ, Santoro AE. 2016. Diverse, uncultivated bacteria and archaea underlying the cycling of dissolved protein in the ocean. *ISME Journal* 10:2158–2173.
DOI: [10.1038/ismej.2016.20](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.20).

Osterholz H, Kirchman DL, Niggemann J, Dittmar T. 2018. Diversity of bacterial communities and dissolved organic matter in a temperate estuary. *FEMS microbiology ecology* 94:1–11.
DOI: [10.1093/femsec/fiy119](https://doi.org/10.1093/femsec/fiy119).

P

Paillard C, Gueguen Y, Wegner M, Bass D, Pallavicini A, Vezzulli L, Arzul I. 2022. Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. *Current Opinion in Biotechnology* 73:225–232
DOI: [10.1016/j.copbio.2021.07.026](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.07.026)

Della Patrona L, Brun P. 2009. Elevage de la Crevette Bleue en Nouvelle-Calédonie. *Litopenaeus Stylirostris*. Bases biologiques et zootechnie. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00251/36229/>.

Paulson JN, Colin Stine O, Bravo HC, Pop M. 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nature Methods* 10:1200–1202.
DOI: [10.1038/nmeth.2658](https://doi.org/10.1038/nmeth.2658).

Péricard P. 2017. Algorithmes pour la reconstruction de séquences de marqueurs conservés dans des données de métagénomique. Université de Lille.

Petersen C, Round JL. 2014. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology* 16:1024–1033.
DOI: [10.1111/cmi.12308](https://doi.org/10.1111/cmi.12308).

Pham D. 2011. Les capacités osmorégulatrices chez la crevette bleue *Litopenaeus stylirostris*, au cours de l'ontogénèse. Université de la Polynésie Française.

Pham D, Ansquer D, Chevalier A, Dauga C, Peyramale A, Wabete N, Labreuche Y. 2014. Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. *Aquaculture* 432:475–482.
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2014.04.031](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.031).

Pierce ML, Ward JE. 2018. Microbial Ecology of the Bivalvia, with an Emphasis on the Family Ostreidae. *Journal of Shellfish Research* 37:793–806.
DOI: [10.2983/035.037.0410](https://doi.org/10.2983/035.037.0410).

Pierce ML, Evan J. 2019. and the Blue Mussel (*Mytilus edulis*): Temporal Variation and Communities. 4:1–17.
DOI: [10.1128/mSphere.00730-19](https://doi.org/10.1128/mSphere.00730-19).

Porter TM, Hajibabaei M. 2020. Putting COI Metabarcoding in Context: The Utility of Exact Sequence Variants (ESVs) in Biodiversity Analysis. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8:1–15.
DOI: [10.3389/fevo.2020.00248](https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00248).

Prescott SL. 2017. History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. *Human Microbiome Journal* 4:24–25.
DOI: [10.1016/j.humic.2017.05.004](https://doi.org/10.1016/j.humic.2017.05.004).

Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2009. Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26:1641–1650.
DOI: [10.1093/molbev/msp077](https://doi.org/10.1093/molbev/msp077).

Bibliographie

Prodan A, Tremaroli V, Brolin H, Zwinderman AH, Nieuwdorp M, Levin E. 2020. Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLOS ONE* 15:e0227434. DOI: 10.1371/journal.pone.0227434.

Q

Qiao F, Liu YK, Sun YH, Wang XD, Chen K, Li TY, Li EC, Zhang ML. 2017. Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Nutrition* 23:444–452. DOI: 10.1111/anu.12412.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41:590–596. DOI: 10.1093/nar/gks1219.

R

Rahul K, Sasikala C, Tushar L, Debadrita R, Ramana C V. 2014. *Alcanivorax xenomutans* sp. nov., a hydrocarbonoclastic bacterium isolated from a shrimp cultivation pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64:3553–3558. DOI: 10.1099/ijs.0.061168-0.

Ramette A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62:142–160. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.

Reichenbach H. 1992. The Order Cytophagales. In: *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York, 3631–3675. DOI: 10.1007/978-1-4757-2191-1_37.

Restrepo L, Domínguez-Borbor C, Bajaña L, Betancourt I, Rodríguez J, Bayot B, Reyes A. 2021. Microbial community characterization of shrimp survivors to AHPND challenge test treated with an effective shrimp probiotic (*Vibrio diabolus*). *Microbiome* 9:88. DOI: 10.1186/s40168-021-01043-8.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2009. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp616.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. DOI: 10.7717/peerj.2584.

Le Roux F, Labreuche Y, Davis BM, Iqbal N, Mangenot S, Goarant C, Mazel D, Waldor MK. 2011. Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environmental Microbiology* 13:296–306. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02329.x.

RStudio Team. 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA.

S

Sadeghi-Nassaj SM, Catalá TS, Álvarez PA, Reche I. 2018. Sea cucumbers reduce chromophoric dissolved organic matter in aquaculture tanks. *PeerJ* 2018:1–20. DOI: 10.7717/peerj.4344.

Santiago-Rodríguez TM, Hollister EB. 2021. Multi-omic data integration: A review of concepts, considerations, and approaches. *Seminars in Perinatology* 45:151456. DOI: 10.1016/j.semperi.2021.151456.

Sathish Kumar T, Vidya R, Kumar S, Alavandi SV, Vijayan KK. 2017. Zoesa-2 syndrome of *Penaeus vannamei* in shrimp hatcheries. *Aquaculture* 479:759–767. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.022.

Satpathy KK, Mohanty AK, Natesan U, Prasad MVR, Sarkar SK. 2010. Seasonal variation in physicochemical properties of coastal waters of Kalpakkam, east coast of India with special emphasis on nutrients. *Environmental Monitoring and Assessment* 164:153–171. DOI: 10.1007/s10661-009-0882-0.

Saulnier D, Avarre J, Le Moullac G, Ansquer D, Levy P, Vonau V. 2000. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Diseases of Aquatic Organisms* 40:109–115. DOI: 10.3354/dao040109.

Sha H, Lu J, Chen J, Xiong J. 2022. A meta-analysis study of the robustness and universality of gut microbiota–shrimp diseases relationship. *Environmental Microbiology* 24:3924–3938. DOI: 10.1111/1462-2920.16024.

Shade A, Handelsman J. 2012. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology* 14:4–12. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x.

Simpson E. 1949. Measurement of Diversity. *Nature* 163:688.

Smith VH, Schindler DW. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution* 24:201–207. DOI: 10.1016/j.tree.2008.11.009.

Soergel DAW, Dey N, Knight R, Brenner SE. 2012. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME Journal* 6:1440–1444. DOI: 10.1038/ismej.2011.208.

Sonnenschein EC, Jimenez G, Castex M, Gram L. 2021. The Roseobacter-Group Bacterium *Phaeobacter* as a Safe Probiotic Solution for Aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology* 87:1–15. DOI: 10.1128/AEM.02581-20.

Sorieul L, Rückert C, Al-Dilaimi A, Winkler A, Kalinowski J, Pham D, Wabete N, Boulo V. 2019. Whole-Genome Sequence of *Pseudoalteromonas* sp. NC201, a Probiotic Strain for *Litopenaeus stylirostris* Hatcheries in New Caledonia. *Microbiology Resource Announcements* 8:23–24. DOI: 10.1128/MRA.00477-19.

Sorieul L, Wabete N, Ansquer D, Mailliez J-R, Pallud M, Zhang C, Lindivat M, Boulo V, Pham D. 2018. Survival improvement conferred by the *Pseudoalteromonas* sp. NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress. *Aquaculture* 495:888–898. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.058.

Stimpson W. 1871. Notes on North American Crustacea, in the Museum of the Smithsonian Institution. No. III. *Annals of the Lyceum of Natural History of New York* 10:92–136. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1874.tb00028.x.

Stoeck T, Zuendorf A, Breiner HW, Behnke A. 2007. A molecular approach to identify active microbes in environmental eukaryote clone libraries. *Microbial Ecology* 53:328–339. DOI: 10.1007/s00248-006-9166-1.

Stoler N, Nekrutenko A. 2021. Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. *NAR Genomics and Bioinformatics* 3:1–9. DOI: 10.1093/nargab/lqab019.

Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y. 1990. The Vitamin B₁₂-Producing Ability of Intestinal Bacteria Isolated from Tilapia and Channel Catfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:701–701. DOI: 10.2331/suisan.56.701.

Sun P, Jin M, Ding L, Lu Y, Ma H, Yuan Y, Zhou Q. 2018a. Dietary lipid levels could improve growth and intestinal microbiota of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture* 490:208–216. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.02.018.

Sun Z, Hao S, Gong Y, Zhang M, Aweya JJ, Tran NT, Zhang Y, Ma H, Li S. 2018b. Dual oxidases participate in the regulation of hemolymph microbiota homeostasis in mud crab *Scylla paramamosain*. *Developmental and Comparative Immunology* 89:111–121.

DOI: [10.1016/j.dci.2018.08.009](https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.08.009).

Sun Y, Han W, Liu J, Liu F, Cheng Y. 2020. Microbiota comparison in the intestine of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* fed different diets. *Aquaculture* 515:734518.

DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.734518](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734518).

Sylvain FÉ, Derome N. 2017. Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Scientific Reports* 7:1–14.

DOI: [10.1038/s41598-017-05662-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-05662-w).

T

Tassanakajon A, Somboonwivat K, Supungul P, Tang S. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions on shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology*. 34:954–967.

DOI: [10.1016/j.fsi.2012.09.021](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021)

Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS. 2004. Coagulation in arthropods: Defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology* 25:289–294.

DOI: [10.1016/j.it.2004.03.004](https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.004).

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* 449:804–810.

DOI: [10.1038/nature06244](https://doi.org/10.1038/nature06244).

V

Van Den Broeck N, Moutin T, Rodier M, Le Bouteiller A. 2004. Seasonal variations of phosphate availability in the SW Pacific Ocean near New Caledonia. *Marine Ecology Progress Series* 268:1–12.

DOI: [10.3354/meps268001](https://doi.org/10.3354/meps268001).

Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Forberg T, Olsen Y, Verdegem M, Giatsis C, Skjermo J, Aasen IM, Gatesoupe F-J, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. 2018a. Managing the Microbial Community of Marine Fish Larvae: A Holistic Perspective for Larviculture. *Frontiers in Microbiology* 9:1–22.

DOI: [10.3389/fmicb.2018.01820](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01820).

Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Olsen Y. 2018b. K-selection as microbial community management strategy: A method for improved viability of larvae in aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 9:1–17.

DOI: [10.3389/fmicb.2018.02730](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02730).

Valle-Gough RE, Samaniego-Gómez BY, Apodaca-Hernández JE, Chiappa-Carrara FX, Rodríguez-Dorantes M, Arena-Ortiz ML. 2022. RNA-Seq Analysis on the Microbiota Associated with the White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Different Stages of Development. *Applied Sciences (Switzerland)* 12.

DOI: [10.3390/app12052483](https://doi.org/10.3390/app12052483).

Vandenberghe J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Balladares M, Gomez-Gil B, Calderon J, Sorgeloos P, Swings J. 1999. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2592–2597.

DOI: [10.1128/AEM.65.6.2592-2597.1999](https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2592-2597.1999).

Vargas-Albores F, Martínez-Córdova LR, Hernández-Mendoza A, Cicala F, Lago-Lestón A, Martínez-Porchas M. 2021. Therapeutic modulation of fish gut microbiota, a feasible strategy for aquaculture? *Aquaculture* 544:737050.

DOI: [10.1016/j.aquaculture.2021.737050](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737050).

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:655–671.

DOI: [10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000](https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000).

W

Wabete N. 2005. Etude écophysio-logique du métabolisme respiratoire et nutritionnel chez la crevette péneïde *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Université de Bordeaux I.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5261–5267.

DOI: [10.1128/AEM.00062-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07).

Wang XW, Xu JD, Zhao XF, Vasta GR, Wang JX. 2014. A Shrimp C-type Lectin Inhibits Proliferation of the Hemolymph Microbiota by Maintaining the Expression of Antimicrobial Peptides. *Journal of Biological Chemistry* 289:11779–11790.

DOI: [10.1074/jbc.M114.552307](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.552307).

Wang H, Huang J, Wang P, Li T. 2020a. Insights into the microbiota of larval and postlarval Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) along early developmental stages: a case in pond level. *Molecular Genetics and Genomics* 295:1517–1528.

DOI: [10.1007/s00438-020-01717-2](https://doi.org/10.1007/s00438-020-01717-2).

Wang Y, Wang K, Huang L, Dong P, Wang S, Chen H, Lu Z, Hou D, Zhang D. 2020b. Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome* 8:106.

DOI: [10.1186/s40168-020-00879-w](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00879-w).

Weiss S, Xu ZZ, Peddada S, Amir A, Bittinger K, Gonzalez A, Lozupone C, Zaneveld JR, Vázquez-Baeza Y, Birmingham A, Hyde ER, Knight R. 2017. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5:27.

DOI: [10.1186/s40168-017-0237-y](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y).

Whipps J, Lewis K, Cooke R. 1988. Mycoparasitism and plant disease control. Manchester University Press.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:6578–6583.

DOI: [10.1073/pnas.95.12.6578](https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578).

Wickham H. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

DOI: [ISBN 978-3-319-24277-4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4).

Winogradsky S. 1949. *Microbiologie du sol: problèmes et méthodes*.

Woese CR, Fox GE. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:5088–5090.

DOI: [10.1073/pnas.74.11.5088](https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088).

X

Xiong J, Zhu J, Wang K, Wang X, Ye X, Liu L, Zhao Q, Hou M, Qiuqian L, Zhang D. 2014. The Temporal Scaling of Bacterioplankton Composition: High Turnover and Predictability during Shrimp Cultivation. *Microbial Ecology* 67:256–264.

DOI: [10.1007/s00248-013-0336-7](https://doi.org/10.1007/s00248-013-0336-7).

Xiong J, Wang K, Wu J, Qiuqian L, Yang K, Qian Y, Zhang D. 2015. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:6911–6919.

DOI: [10.1007/s00253-015-6632-z](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6632-z).

Bibliographie

Xiong J, Dai W, Zhu J, Liu K, Dong C, Qiu Q. 2017. The Underlying Ecological Processes of Gut Microbiota Among Cohabiting Retarded, Overgrown and Normal Shrimp. *Microbial Ecology* 73:988–999.

DOI: [10.1007/s00248-016-0910-x](https://doi.org/10.1007/s00248-016-0910-x).

Xiong J, Yu W, Dai W, Zhang J, Qiu Q, Ou C. 2018. Quantitative prediction of shrimp disease incidence via the profiles of gut eukaryotic microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:3315–3326.

DOI: [10.1007/s00253-018-8874-z](https://doi.org/10.1007/s00253-018-8874-z).

Xue M, Wu L, He Y, Liang H, Wen C. 2018. Biases during DNA extraction affect characterization of the microbiota associated with larvae of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ* 6:e5257.

DOI: [10.7717/peerj.5257](https://doi.org/10.7717/peerj.5257).

Y

Yang W, Zheng C, Zheng Z, Wei Y, Lu K, Zhu J. 2018. Nutrient enrichment during shrimp cultivation alters bacterioplankton assemblies and destroys community stability. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156:366–374.

DOI: [10.1016/j.ecoenv.2018.03.043](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.043).

Yang X, Xu M, Huang G, Zhang C, Pang Y, Cheng Y. 2019. Effect of dietary L-tryptophan on the survival, immune response and gut microbiota of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish and Shellfish Immunology* 84:1007–1017.

DOI: [10.1016/j.fsi.2018.10.076](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.076).

Yang CH, MA KY, Chu KH, Chan TY. 2023. Making sense of the taxonomy of the most commercially important shrimps *Penaeus Fabricicus*, 1789 s. l. (Crustacea : Decapoda : Penaeidae), a way forward. *Aquaculture* 563:738955

DOI: [10.1016/j.aquaculture.2022.738955](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738955)

Yates MC, Derry AM, Cristescu ME. 2021. Environmental RNA: A Revolution in Ecological Resolution? *Trends in Ecology & Evolution* 36:601–609.

DOI: [10.1016/j.tree.2021.03.001](https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.03.001).

Yu W, Wu JH, Zhang J, Yang W, Chen J, Xiong J. 2018. A meta-analysis reveals universal gut bacterial signatures for diagnosing the incidence of shrimp disease. *FEMS Microbiology Ecology* 94:1–10.

DOI: [10.1093/femsec/fiy147](https://doi.org/10.1093/femsec/fiy147).

Yukgehnaish K, Kumar P, Sivachandran P, Marimuthu K, Arshad A, Paray BA, Arockiaraj J. 2020. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture* 12:1903–1927.

DOI: [10.1111/raq.12416](https://doi.org/10.1111/raq.12416).

Z

Zeng S, Huang Z, Hou D, Liu J, Weng S, He J. 2017. Composition, diversity and function of intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ* 5:e3986.

DOI: [10.7717/peerj.3986](https://doi.org/10.7717/peerj.3986).

Zhang M, Sun Y, Chen K, Yu N, Zhou Z, Chen L, Du Z, Li E. 2014a. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture* 434:449–455.

DOI: [10.1016/j.aquaculture.2014.09.008](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.008).

Zhang D, Wang X, Xiong J, Zhu J, Wang Y, Zhao Q, Chen H, Guo A, Wu J, Dai H. 2014b. Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status. *Ecological Indicators* 38:218–224.

DOI: [10.1016/j.ecolind.2013.11.002](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.11.002).

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

DOI: [10.1371/journal.pone.0148135](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148135).

Zhang M, Sun Y, Liu Y, Qiao F, Chen L, Liu WT, Du Z, Li E. 2016b. Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with «reverse» salinity preference. *Aquaculture* 454:72–80.

DOI: [10.1016/j.aquaculture.2015.12.014](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.014).

Zhang X, Zhang M, Zheng H, Ye H, Zhang X, Li S. 2020. Source of hemolymph microbiota and their roles in the immune system of mud crab. *Developmental and Comparative Immunology* 102:103470.

DOI: [10.1016/j.dci.2019.103470](https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103470).

Zheng Y, Yu M, Liu J, Qiao Y, Wang L, Li Z, Zhang XH, Yu M. 2017. Bacterial Community Associated with Healthy and Diseased Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Larvae and Rearing Water across Different Growth Stages. *Frontiers in Microbiology* 8:1–11.

DOI: [10.3389/fmicb.2017.01362](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01362).

Zhou J, Ning D. 2017. Stochastic Community Assembly: Does It Matter in Microbial Ecology? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81:1–32.

DOI: [10.1128/MMBR.00002-17](https://doi.org/10.1128/MMBR.00002-17).

Zhou D, Liu S, Guo G, He X, Xing C, Miao Q, Chen G, Chen X, Yan H, Zeng J, Zheng Z, Deng H, Weng S, He J. 2022. Virome Analysis of Normal and Growth Retardation Disease-Affected *Macrobrachium rosenbergii*. *Microbiology Spectrum* 10.

DOI: [10.1128/spectrum.01462-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.01462-22).

Annexes

VIII.1- Annexe 1 – Le séquençage de Sanger

La mise au point du séquençage de Sanger a été initiée par l'élaboration de di-désoxyribonucléotides (ddNTP) consistant en des dNTP sans groupement hydroxyle en position 3' du pentose (Fig. S1). Au cours de l'élongation de l'ADN, l'incorporation d'un ddNTP empêche la formation d'une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide entraînant l'arrêt de la polymérisation. Au cours du séquençage de Sanger, un mélange réactionnel contenant la séquence d'intérêt, une ADN polymérase, des ddNTP radiomarqués et des dNTP en concentration plus importante est utilisé. Au cours de la réplication de la séquence nucléotidique d'intérêt, l'incorporation aléatoire de ddNTP entraîne l'arrêt de l'élongation. Des séquences complémentaires de longueurs variables et dont le dernier nucléotide est radiomarqué sont alors produites. Chaque ddNTP étant radiomarqué de la même manière, il est impossible de les distinguer. Le séquençage de Sanger nécessite donc 4 réactions distinctes, une pour chaque ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Lorsque les réactions sont terminées, une migration sur gel de polyacrylamide par électrophorèse suivie d'une autoradiographie permet de distinguer les poids moléculaires, et donc la longueur, des séquences synthétisées. En effet, la séquence ayant migré le plus loin correspond à la première base séquencée alors que la séquence ayant migré le moins loin correspond à la dernière base séquencée. Il est ainsi possible de déduire la séquence complémentaire de la séquence d'intérêt (Fig. S2).

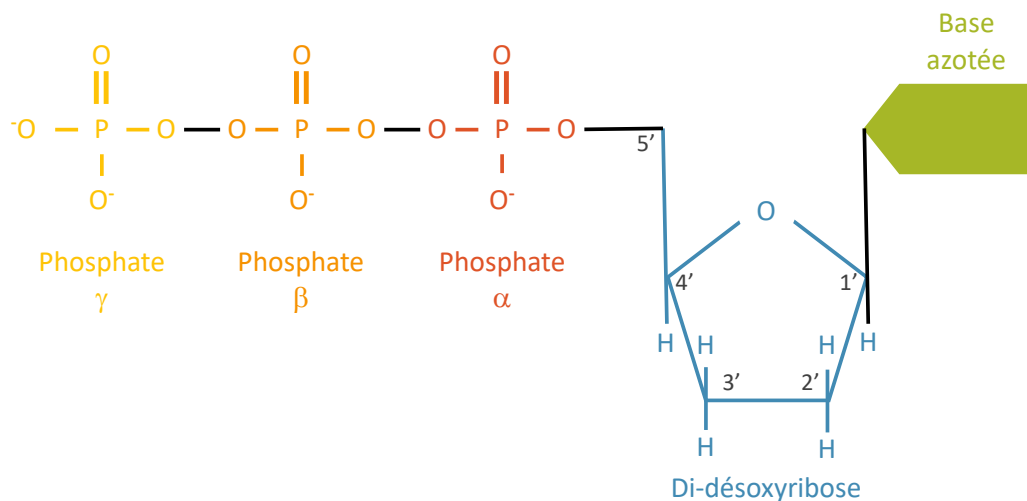


FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 1 – Di-désoxyribonucléotide.

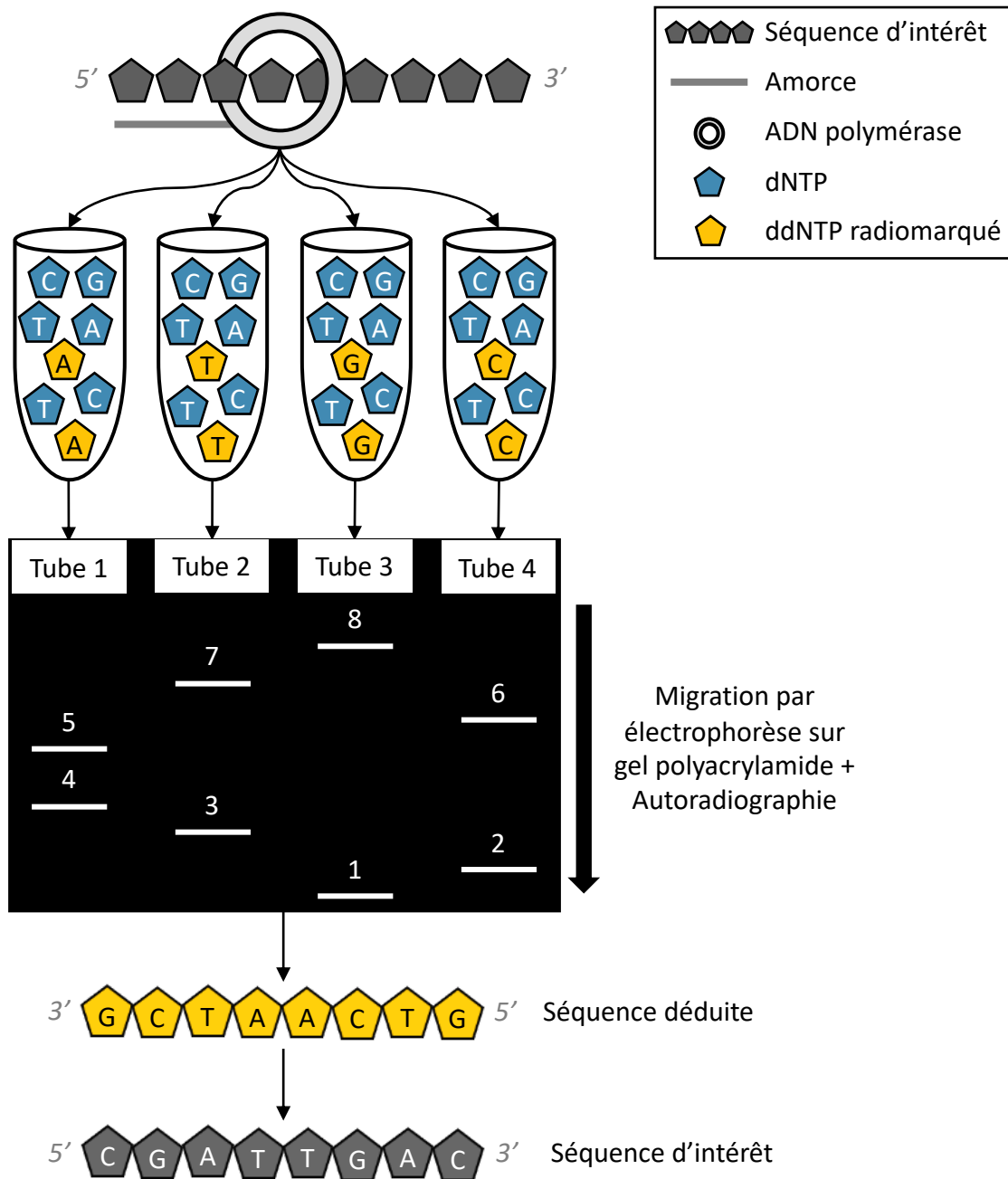


FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 2 – Séquençage de Sanger.

VIII.2- Annexe 2- Le pyroséquençage

Le pyroséquençage se base sur la production de pyrophosphate au cours de la synthèse de l'ADN (Fig. S3). En présence de pyrophosphate, une enzyme appelée ATP sulfurylase transforme l'adénosine phosphosulfate (APS) en adénosine triphosphate (ATP) lui-même transformé en signal lumineux sous l'action de la luciférase en présence de luciférine (Fig. S4). Le pyroséquençage consiste à observer ce signal lumineux après ajout de dNTP afin de déduire la séquence nucléotidique d'intérêt. Pour cela, la séquence d'intérêt est liguée en 5' à un adaptateur complémentaire d'un oligonucléotide fixé à une bille (Fig. S5). Une amplification par PCR permet alors l'hybridation de la séquence d'intérêt sur cette bille. Toutes les billes ainsi recouvertes de la même séquence nucléotidique d'intérêt, sont ensuite chargées sur une plaque contenant des puits dont le diamètre ne permet la fixation que d'une seule bille. Un mélange réactionnel contenant les éléments nécessaires à l'élongation de la séquence nucléotidique ainsi qu'à la transformation du pyrophosphate en lumière est utilisé. Un seul type de dNTP est ajouté à chaque réaction. Lorsqu'un dNTP est incorporé dans un puit, un signal lumineux est produit. Ce dernier est capté par une caméra munie d'un capteur CCD (Charge Coupled Device) relié à un dispositif informatique. Une fois le signal enregistré, les dNTP présents sur la plaque sont éliminés par une enzyme appelée apyrase et un autre dNTP est ajouté. Le processus continue jusqu'au séquençage complet de la séquence d'intérêt. Il est important de noter que le dATP peut être utilisé par la luciférase. Pour éviter les biais expérimentaux, le dATP α S (2'-déoxyadénosine 5'-(α -thio)triphosphate) est utilisé. Il s'agit d'un dATP dont le phosphate en position α est marqué au ^{35}S et qui est exclusivement utilisable par l'ADN polymérase.

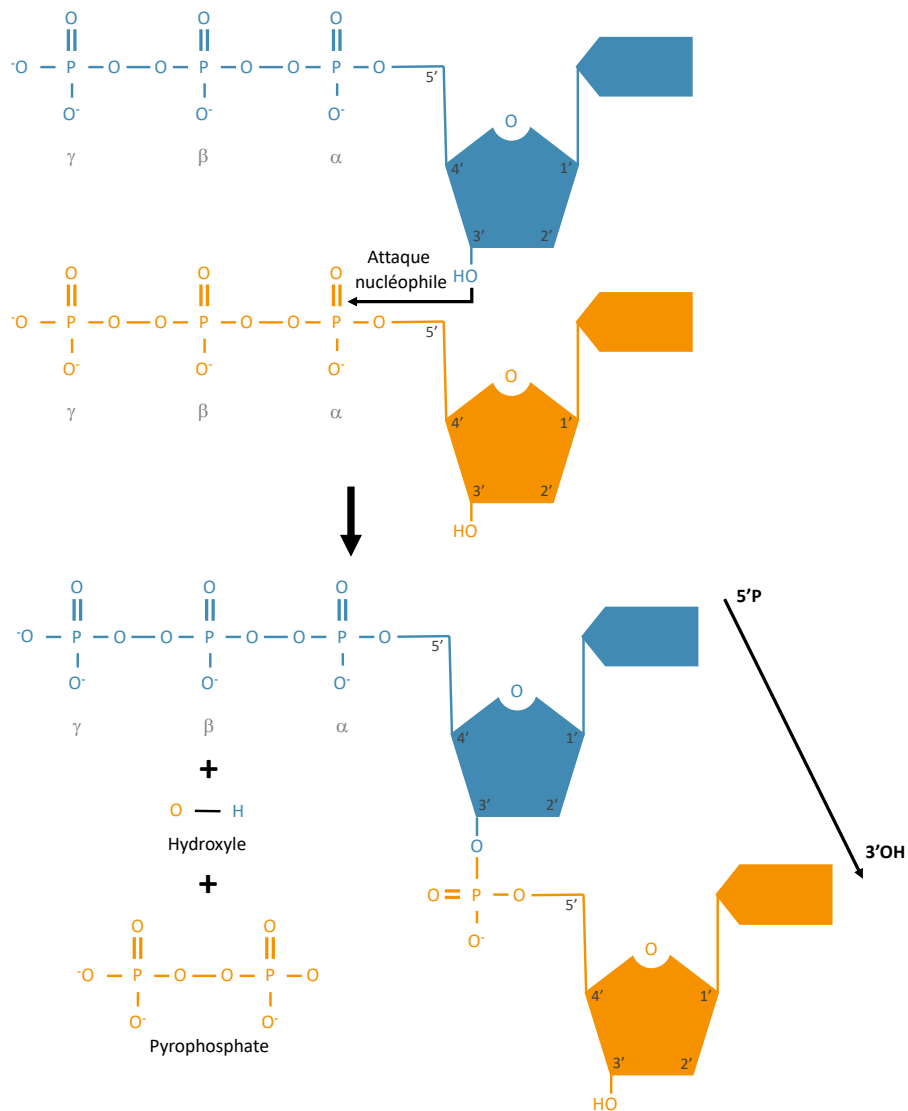


FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 3 – Principe de synthèse des acides nucléiques.

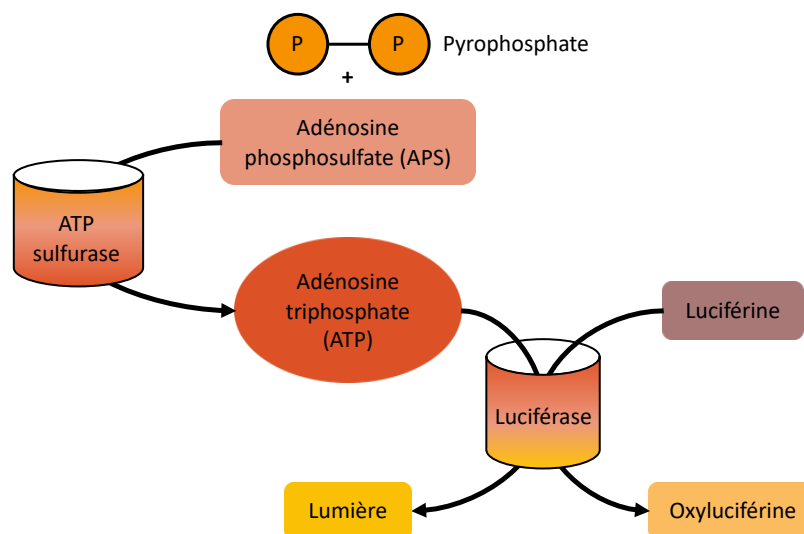


FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 4 – Processus de transformation du pyrophosphate en lumière.

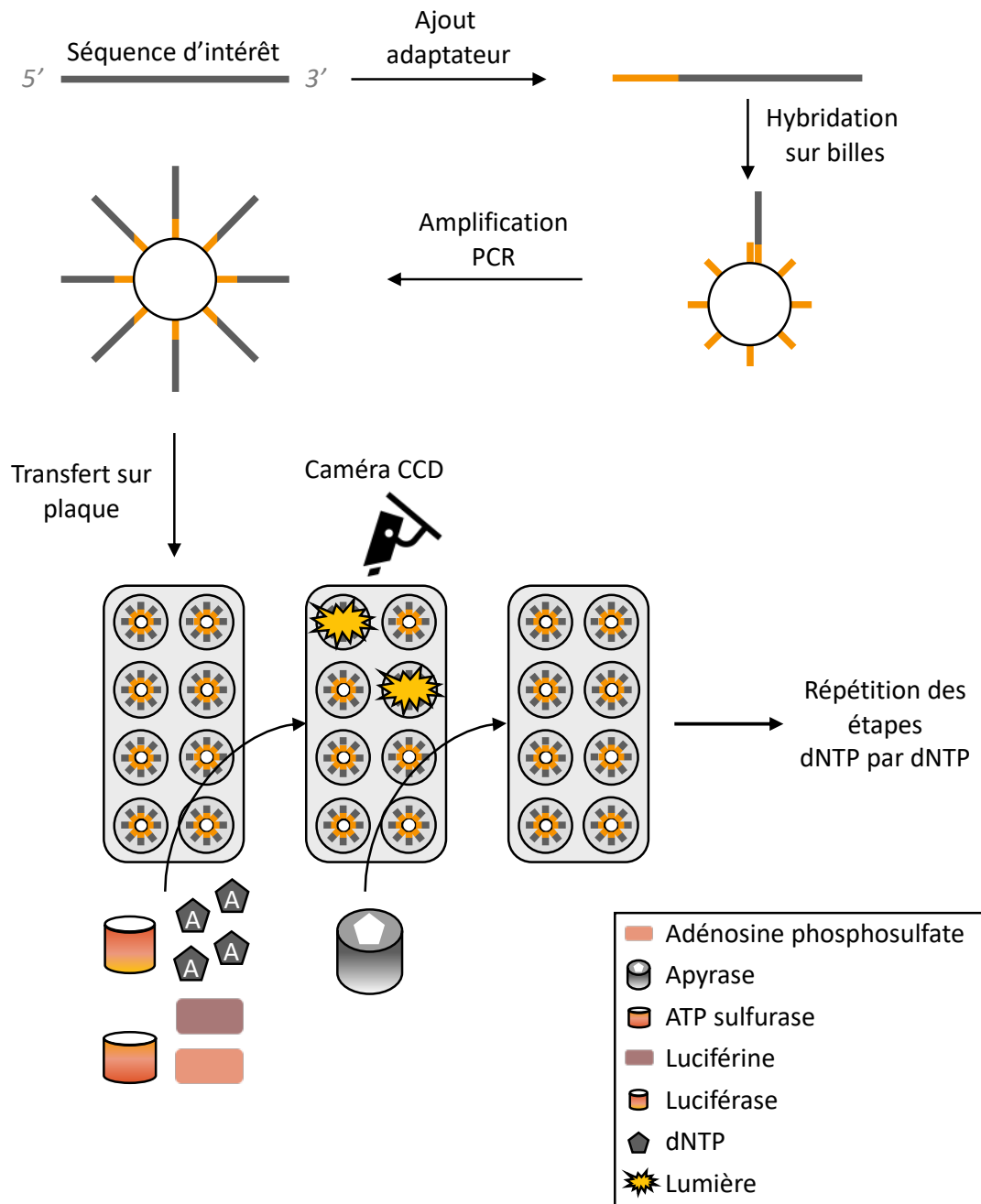


FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 5 – Pyroséquençage 454.

VIII.3- Annexe 3 - Le séquençage IonTorrent

Le séquençage IonTorrent mesure les variations de pH induites par la libération de protons d'hydrogènes qui accompagne la formation de pyrophosphate. Les premières étapes du séquençage IonTorrent sont similaires à celles du pyroséquençage. En effet, elles consistent à hybrider la séquence nucléotidique d'intérêt sur des billes qui sont ensuite placées dans des puits sur une puce. Cette dernière est composée d'une couche sensible aux ions reliée à un CPU (unité processeur) qui mesure les variations de pH. Comme pour le pyroséquençage, les dNTP sont ajoutés les uns après les autres (Fig. S6).

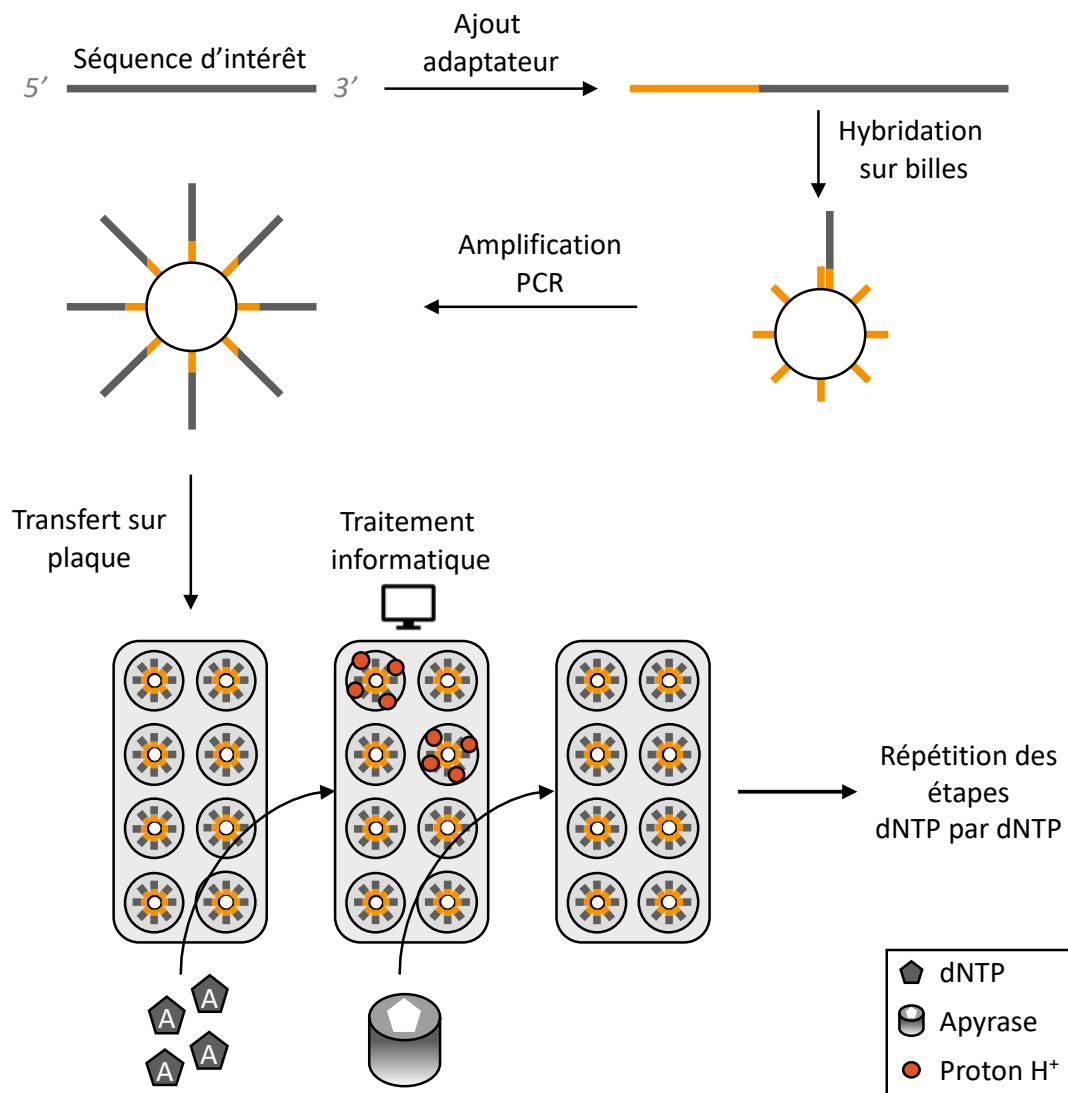


FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 6 – Séquençage IonTorrent.

Appendices

Appendice 1 : Obtention du Prix Jeunes Talents France Fondation L'Oréal-UNESCO Pour les Femmes et la Science (2022)




POSTER 1 – Poster présenté lors des échanges scientifiques organisés dans le cadre de la remise des prix.




META-ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITIES FROM LAGOON SEAWATERS TO SHRIMP HATCHERIES IN RELATION TO ENVIRONMENTAL FACTORS

by
Carolane Giraud

• LEAD-NC, Ifremer & ISEA, UNC • New-Caledonia

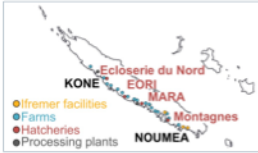
INTRODUCTION

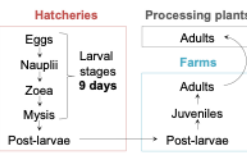


In New-Caledonia, farming of the Pacific blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, is a very important socio-economic industry. However, massive unexplained larval mortalities, occurring in all the hatcheries, are threatening the entire production¹. Many studies have proved that the microbiota plays a key role in the health and the development of the host².

Therefore, these observed mortalities could be explained by a **disruption of the microbiota** associated with shrimp larvae and their environment.

In this context, my thesis project is dedicated to the study of the microbial communities associated with healthy and moribund shrimp larval rearings.





MATERIALS AND METHODS

Daily sample collection during healthy and moribund larval rearings
Pumped natural seawater, rearing water, breeders, eggs, larvae, food

Active microbial diversity analysis

- RNA extractions
- Qiagen RNeasy Power Water kit and minikit
- cDNA retrotranscriptions
- Promega M-MLV, ThermoFisher Second Strand kit
- HiSeq Illumina Sequencing
- 515F/806R primers, V4 region 16S rRNA gene

Water quality analysis

- Phosphate & ammonium concentrations
- Quantitative analysis by colorimetric reaction^{3,4}
- Colored Dissolved Organic Matter profile
- Spectrophotometer absorption spectra⁵
- Temperature, salinity & pH measurements
- Mettler Toledo multiparameter probe pH/Cond 3320

Larval health and quality assessment

- Survival rates
- Growth index

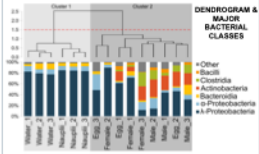
Counts & observations under binocular magnifying glass

Bioinformatics, biostatistics, meta-analysis⁶

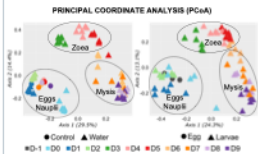
- To analyze evolution of all the considered parameters throughout rearing
- To highlight potential correlations and interactions between parameters
- To identify differential microbial lineages and communities between rearings
- To establish a predictive model to further build a decision support system

EXPECTED RESULTS

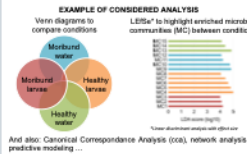
Published results – The establishment of the larval microbiota is influenced by the rearing water and the breeders^{7,8}.



In prep. – The larval and the water microbiotas are influenced by the rearing day and the larval stage.



To do - Meta-analysis of all larval rearings to identify key microbial communities for larval health.



CONCLUSION


Using an **integrated multidisciplinary approach**, my project aims to identify the causes of the larval mortalities occurring in shrimp hatcheries.

My goal is to identify key microbial communities which could be monitored during larval rearing, therefore offering a potential solution.

This project should help to contribute to a more sustainable shrimp farming industry in New-Caledonia and could be applied to other agronomic sectors.

REFERENCES

(1) Pham et al. (2014) DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.04.031 (7) Giraud et al. (2021) DOI:10.7717/peerj.12241
 (2) Cho & Blaser (2012) DOI:10.1038/nrg3182 (8) Giraud et al. (2022) DOI:10.3389/fmicb.2022.886752
 (3) Amino & Kérouel (2004) ISBN:9782844331335
 (4) Holmes et al. (1999) DOI:10.1139/f99-128
 (5) Sadeghi-Nassaj et al. (2018) DOI:10.7717/peerj.4344
 (6) Cornejo-Granados et al. (2018) DOI:10.7717/peerj.5382



Dossier de presse réalisé dans le cadre de la diffusion prix.

SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Carolane Giraud



*Réduire la mortalité des crevettes
en Nouvelle-Calédonie*

60

Doctorante

UNITÉ LACON, ÉCOSYSTÈMES ET AQUACULTURES
DU BASSIN NOUVELLE-CALÉDONIE (LEAD-NC),
PREMIER UMIR 9220 ENTROPÉE
INSTITUT DES SCIENCES EXACTES ET APPLIQUÉES
(SEA), UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE
ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE (EDP)
À L'UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE



Doctorante, Carolane Giraud mène ses recherches au sein de l'unité Lagons, Écosystèmes et Aquaculture Durable de Nouvelle-Calédonie. Dedicée à l'environnement littoral et la biodiversité associée, cette unité développe des compétences en aquaculture de crustacés, de poissons et de micro-algues. Titulaire d'un Master spécialisation Biologie et Bioressources Marines à l'Université de la Sorbonne, cette chercheuse passionnée mène ses recherches à Nouméa, où les nombreuses menaces pesent sur la crevetteculture, constituant un sujet d'étude aussi concret qu'urgent.

Quels sont les enjeux à court et à long termes de vos recherches et leurs applications ?

L'activité crevetteculture est un enjeu socio-économique important en Nouvelle-Calédonie. Malheureusement, les mortalités larvaires en écloserie freinent la production. Mon projet vise à identifier leurs causes, car nous manquons de connaissances sur l'évolution des paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage ainsi que sur la dynamique des communautés microbiennes impliquées.

Au cours de votre parcours, quel a été l'événement déclencheur de votre carrière en science ?

Par mes origines méditerranéennes, je suis passionnée depuis toujours par la mer et sa biodiversité. Au cours de ma scolarité, j'ai développé un intérêt particulier pour les sciences et la compréhension du vivant. J'ai su que je souhaitais faire un métier qui puisse concilier les deux, et me suis donc orientée vers un Master de biologie intégrative avec une spécialisation en biologie et bioressources marines.

Pourquoi les femmes sont-elles si peu nombreuses dans la recherche ?

L'un des plus gros freins est la difficulté d'allier vies professionnelle et personnelle. Lorsque je cherchais des financements de thèse, un ancien chercheur du CNRS m'a demandé pourquoi je n'avais pas fait un enfant illico après mon Master pour être « débarrassée ». Je ne suis malheureusement pas la seule à avoir reçu des remarques déplacées liées au genre, et je trouve injuste que quelque chose d'aussi naturel et biologiquement inchangeable, donner la vie, puisse pénaliser nos carrières.

“ **Le savoir et l'accès
à la connaissance
sont nos meilleurs
alliés pour l'avenir.** ”

61

Appendice 2 : Diffusions scientifiques

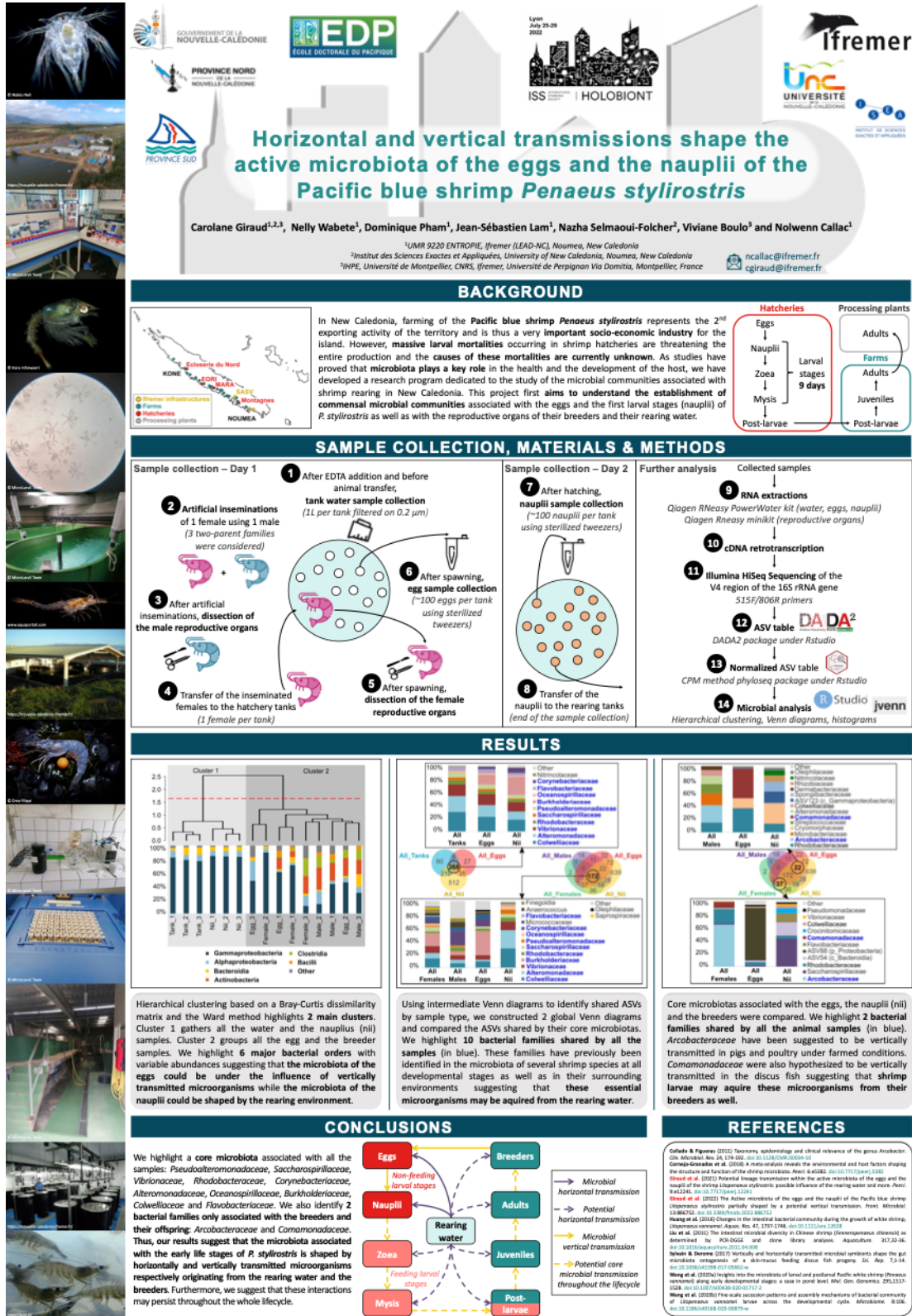
Présentations orales

ÉVÈNEMENT	DATE	LOCALISATION
Rencontres bioinformatiques de l'Ifremer	<i>Août 2022</i>	<i>Tahiti, Polynésie Française</i>
Séminaire laboratoire IHPE	<i>Juillet 2022</i>	<i>Montpellier, France</i>
Doctoriales de l'École Doctorale du Pacifique	<i>Août 2021</i>	<i>Université de la Nouvelle-Calédonie</i>
Doctoriales de l'UMR 5244	<i>Juin 2021</i>	<i>Visioconférence</i>

Posters

ÉVÈNEMENT	DATE	LOCALISATION
Congrès ISS 10 (International Symbiosis Society) & Holobiont 3	<i>Juillet 2022</i>	<i>Lyon, France</i>
Journée des doctorants de l'Ifremer	<i>Janvier 2021</i>	<i>Visioconférence</i>
Doctoriales de l'École Doctorale du Pacifique	<i>Septembre 2020</i>	<i>Université de la Nouvelle-Calédonie</i>

POSTER 2 - Poster présenté lors du congrès ISS 10 (International Symbiosis Society) & Holobiont 3 à Lyon (France) en juillet 2022.



POSTER 3 – Poster présenté lors de la journée des doctorants de l’Ifremer en janvier 2021 ainsi qu’à l’Université de la Nouvelle-Calédonie lors des Doctoriales de l’École Doctorale du Pacifique en septembre 2020.

Projet MicroLarve

Méta-analyses des communautés Microbiennes des eaux du Lagon aux élevages Larvaires de crevettes en lien avec les facteurs Environnementaux

Caroline Giraud^{1,2}, Nolwenn Callac¹, Nazha Selmaoui-Folcher², Nelly Wabete¹, Viviane Boulo³
¹ LEAD-NC, Ifremer Nouvelle-Calédonie | ² IEA, Université de la Nouvelle-Calédonie | ³ IHPE, Ifremer Montpellier, France
 ✉ caroline.giraud1@etudiant.unc.nc

CONTEXTE

L'aquaculture de la crevette bleue du Pacifique (*Litopenaeus stylirostris*) se développe en Nouvelle-Calédonie depuis les années 70. Depuis 2005, le volume annuel de crevettes produites décline. L'une des principales explications de cette diminution est la difficulté d'approvisionner les fermes de production en post-larves issues des écloseries (Figure 1). En effet, des mortalités larvaires importantes sont observées pendant les 10 premiers jours d'élevage jusqu'à devenir un goulot d'étranglement pour la production (Figure 2).

Figure 1 – Répartition des fermes de productions et des écloseries
 L'activité crevetteicole comprend actuellement 18 fermes de production et 4 écloseries (Figure 2). Elle représente une production annuelle de 1500 à 2000 tonnes de crevettes, plusieurs centaines d'emplois et un intérêt économique important.

OBJECTIFS

Figure 3 – Conditions chimiques et biologiques propices à un élevage larvaire

L'écosystème microbien est-il la composante principale pour l'obtention de larves de bonne qualité?

STRATÉGIE ET RÉSULTATS ESCOMPTÉS

Trois axes de recherche → étude des communautés microbiennes des eaux du lagon jusqu'aux élevages larvaires

- AXE 1 – Dynamique des communautés microbiennes de l'eau du lagon
- AXE 2 – Écologie microbienne des microorganismes associés aux élevages larvaires
- AXE 3 – Interactions, prédictions, modélisation

PRÉLEVEMENT D'ÉCHANTILLONS
Larves, eau d'élevage, eau du lagon, nourriture

CHIMIE
Mesures de pH, température et salinité
Dosages de sels nutritifs et de métaux

ZOOTECHE
Survie, indices de croissance

MICROBIOLOGIE
Diversité, abondance et fonction des populations microbiennes actives

BIOINFORMATIQUE, BIostatistiques, MODÉLISATION
Évolutions, corrélations, périodes à risques, bactéries favorables et/ou défavorables

AXE 3
Bioinformatique
Biostatistiques
Méta-analyses

AXE 2
Étude des écloseries

AXE 1
Étude du lagon

Ce projet propose une approche pluridisciplinaire intégrée pour tenter de résoudre les problèmes rencontrés en élevage larvaire par une stratégie de gestion durable des communautés microbiennes.

Les retombées scientifiques issues de cette thèse permettront de préserver l'intérêt économique que représente la crevette bleue du Pacifique en Nouvelle-Calédonie.



Appendices

Appendice 3 – Formations

Formations dispensées par l'École Doctorale du Pacifique

INTITULÉ DE LA FORMATION	DATE	VOLUME HORAIRE
Valorisation de données avec R	26/10/2021	3 heures
Formation Inkscape	14/04/2021 et 14/04/2021	8 heures
Comment rédiger un article scientifique	23/11/2020, 11/12/2020 et 14/12/2020	8 heures
Préparation à la recherche interdisciplinaire	27/08/2020, 08/10/2020 et 26/11/2020	6 heures
Éthique et déontologie de la recherche	18/08/2020 et 25/08/2020	10 heures
Communication et préparation à l'après-thèse	23/06/2020	4 heures
Enseigner dans le supérieur	Du 25/05/2020 au 27/05/2020	20 heures
Formation e-portfolio Mahara	19/05/2020	3 heures
Initiation à l'analyse de données avec le logiciel R	Du 12/02/2020 au 11/03/2020	16 heures

Autres formations

INTITULÉ DE LA FORMATION	ORGANISME	DATE	VOLUME HORAIRE
Métabarcoding	SEBIMER, Ifremer	Septembre et Novembre 2022	30 heures
Génomique comparative	SEBIMER, Ifremer	Septembre 2022	8 heures
Assemblage et annotation de génomes	SEBIMER, Ifremer	Septembre 2022	23 heures
Apprendre à coder avec Python	MOOC Université de Bruxelles	Décembre 2021	12 heures
Initiation aux statistiques avec R	MOOC Université Paris-Sud	Mai 2020	25 heures
Formation à l'utilisation de Datarmor <i>cluster de calcul de l'Ifremer</i>	SEBIMER, Ifremer	Novembre 2020	4 heures

Appendice 4 – Encadrements et enseignements

Encadrements

ÉTUDIANTS	FORMATION	TYPE	DATE	INTITULÉ
Mathilde NYIKEINE Duc Huy Dimitri TRAN Cassandra LAMATAKI	<i>Master1 Méthodes Informatiques Appliquées à la Gestion des Entreprises (Université de la Nouvelle-Calédonie)</i>	<i>Projet tutoré</i>	<i>Mars à mai 2022 (3 mois)</i>	Analyses multivariées sur des données crevetticoles
Claudia WABETE	<i>DEUST1 Géosciences appliquées, mines, eau et environnement (Université de la Nouvelle-Calédonie)</i>	<i>Stage de fin d'année</i>	<i>Décembre 2021 (1 mois)</i>	Étude de la qualité de l'eau au cours des élevages larvaires de crevettes

Enseignements

56 heures de TP de biologie animale dispensées à des étudiants de 1^{ère} année de licence SVT de septembre à octobre 2022 à l'Université de la Nouvelle-Calédonie.

EPS 2022 - Carolane GIRAUD

[EPS] - Etat PRÉVISIONNEL de Service d'Enseignement					
Année : 2022	Enseignant(e) : Carolane GIRAUD (154122)	Obligation statutaire :		56 (H eqTD)	
Enseignant Contractuel	Département : DPT - S.T.				
Statut : CONTRACTUEL DOCTORANT ENSEIGNANT (Doctorant Contractuel)	Obligation de service :		56 (H eqTD)		
COURS	TYPE_AP	H_MAQ ⁽¹⁾	H_CHRG_ENS ⁽²⁾	H_EDT_ENS ⁽³⁾	H_SERV_PREV
68_0009 TP : Biologie Animale 1	TP	180	56	56	56

⁽¹⁾ Nombre d'heures total prévues dans la maquette

⁽²⁾ Nombre d'heures qui vous ont été attribuées sur le(s) EC

⁽³⁾ Nombre d'heures planifiées dans l'Emploi du temps (SuperPlan)

Appendice 5 – Communication auprès du grand public

Presse

Revue de presse Prix Jeunes Talents France Fondation L'Oréal-UNESCO *Pour les Femmes et la Science* :

https://docs.google.com/presentation/d/1es2wL6L1PR6uHYnWzUtPfdMoIVAZhVFpbnDBN8_Hso4/edit#slide=id.g170a74fa78d_1_3

Activités et évènements

VIII.3.1.a- Nuit de la Science 2022

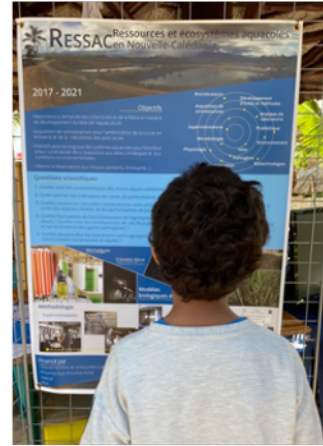
Fabrication d'une escape-box sur le thème de l'aquaculture de la crevette bleue du Pacifique *Penaeus stylirostris*. Activité proposée à la Nuit de la Science de l'Université de la Nouvelle-Calédonie le 16 novembre 2022.



Sources : F. Bavarin, C. Wabete, C. Giraud

VIII.3.1.b- Journée Mondiale des Océans 2021

Animation du stand de la délégation calédonienne de l'Ifremer à la Journée Mondiale des Océans (Ile aux canards, Nouvelle-Calédonie) le 6 juin 2021.



Sources : N. Callac, C. Giraud

Appendice 6 – Articles scientifiques publiés au cours de la thèse mais ne portant pas sur le sujet de thèse

Article 1 – Microbial diversity and activity during the biodegradation in seawater of various substitutes of conventional plastic cotton swab sticks (Jacquin et al. 2021)

DOI : 10.3389/fmicb.2021.604395



ORIGINAL RESEARCH
published: 15 July 2021
doi: 10.3389/fmicb.2021.604395



Microbial Diversity and Activity During the Biodegradation in Seawater of Various Substitutes to Conventional Plastic Cotton Swab Sticks

Justine Jacquin^{1,2}, Nolwenn Callac^{1,3}, Jingguang Cheng¹, Caroline Giraud^{1,3}, Yonko Gorand⁴, Clement Denoual⁵, Mireille Pujo-Pay¹, Pascal Conan¹, Anne-Leila Meistertzheim⁶, Valerie Barbe⁷, Stéphane Bruzard⁵ and Jean-François Ghiglione^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Mechthild Schmitt-Jansen,
Helmholtz Centre for Environmental
Research (UFZ), Germany

Reviewed by:
Gabriela Vázquez-Rodríguez,
Autonomous University of the State
of Hidalgo, Mexico
Christian Lott,
HYDRA Marine Sciences GmbH,
Germany

*Correspondence:
Jean-François Ghiglione
ghiglione@obs-banyuls.fr

Specialty section:
This article was submitted to
Microbiotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 09 September 2020
Accepted: 12 May 2021
Published: 15 July 2021

Citation:
Jacquin J, Callac N, Cheng J,
Giraud C, Gorand Y, Denoual C,
Pujo-Pay M, Conan P,
Meistertzheim A-L, Barbe V,
Bruzard S and Ghiglione J-F (2021)
Microbial Diversity and Activity During
the Biodegradation in Seawater
of Various Substitutes to Conventional
Plastic Cotton Swab Sticks.
Front. Microbiol. 12:604395.
doi: 10.3389/fmicb.2021.604395

¹ CNRS, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, Sorbonne Université, Paris, France, ² Innovation Plasturgie et Composites, Biopole Clermont Limagne, Saint-Beauzire, France, ³ CNRS, UMR 9220 ENTROPIE, Ifremer (LEAD-NC), IRD, Univ Nouvelle-Calédonie, Univ La Réunion, Nouméa, New Caledonia, ⁴ Plateforme EnRMAT, Laboratoire PROMES, Rembla de la Thermodynamique, Perpignan, France, ⁵ UMR CNRS 6027, Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRD), Université de Bretagne-Sud, Lorient, France, ⁶ SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls-sur-Mer, France, ⁷ Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France

The European Parliament recently approved a new law banning single-use plastic items for 2021 such as plastic plates, cutlery, straws, cotton swabs, and balloon sticks. Transition to a bioeconomy involves the substitution of these banned products with biodegradable materials. Several materials such as polylactic acid (PLA), polybutylene adipate terephthalate (PBAT), poly(butylene succinate) (PBS), poly(hydroxybutyrate-valerate) (PHBV), Bioplast, and Mater-Bi could be good candidates to substitute cotton swabs, but their biodegradability needs to be tested under marine conditions. In this study, we described the microbial life growing on these materials, and we evaluated their biodegradability in seawater, compared with controls made of non-biodegradable polypropylene (PP) or biodegradable cellulose. During the first 40 days in seawater, we detected clear changes in bacterial diversity (Illumina sequencing of 16S rRNA gene) and heterotrophic activity (incorporation of ³H-leucine) that coincided with the classic succession of initial colonization, growth, and maturation phases of a biofilm. Biodegradability of the cotton swab sticks was then tested during another 94 days under strict diet conditions with the different plastics as sole carbon source. The drastic decrease of the bacterial activity on PP, PLA, and PBS suggested no bacterial attack of these materials, whereas the bacterial activity in PBAT, Bioplast, Mater-Bi, and PHBV presented similar responses to the cellulose positive control. Interestingly, the different bacterial diversity trends observed for biodegradable vs. non-biodegradable plastics allowed to describe potential new candidates involved in the degradation of these materials under marine conditions. This better understanding of the bacterial diversity and activity dynamics during the colonization and biodegradation processes contributes to an expanding baseline to understand plastic biodegradation in marine conditions and provide a foundation for further decisions on the replacement of the banned single-used plastics.

Keywords: plastisphere, biofouling, plastic biodegradation, single-used plastics, microbial colonization

Article 2 – Evidence of coupled autotrophy and heterotrophy on plastic biofilms and its influence on surrounding seawater (Conan et al. 2022)

DOI : 10.1016/j.envpol.2022.120463

Environmental Pollution 315 (2022) 120463



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpolEvidence of coupled autotrophy and heterotrophy on plastic biofilms and its influence on surrounding seawater[☆]

Pascal Conan^{a,b,*}, Léna Philip^{a,c}, Eva Ortega-Retuerta^a, Charlène Odobel^a, Clélia Duran^a,
 Caroline Pandin^a, Carolane Giraud^{a,d}, Anne-Leila Meistertzheim^c, Valérie Barbe^e,
 Alexandra Ter Hall^f, Mireille Pujo-Pay^a, Jean-François Ghiglione^a

^a Sorbonne Université, CNRS LOMIC - UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, 1 Avenue Pierre Fabre, 66650, Banyuls sur Mer, France

^b Sorbonne Université, CNRS OSU STAMAR - UAR2017, 4 Place Jussieu, 75252, Paris cedex 05, France

^c SAS Plastic@Sea, Sorbonne Université (UPMC), CNRS LOMIC - UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, 1 Avenue Pierre Fabre, 66650, Banyuls sur Mer, France

^d CNRS, UMR 9220 ENTROPIE, Ifremer (LEAD-NC), IRD, Univ Nouvelle-Calédonie, Univ La Réunion, Nouméa, New Caledonia

^e Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91057, Evry, France

^f CNRS, Université de Toulouse, Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), UMR, 5623, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Microplastic
 Plastisphere
 Biogeochemical cycles
 Primary production
 Bacterial production

ABSTRACT

We measured phytoplankton primary production and heterotrophic bacterial activities on microplastics and seawater in the Northwestern Mediterranean Sea during two 3-month spring periods over 2 consecutive years. Microorganisms growing on a 5 mm diameter low density polyethylene films (LDPE; 200 µm thick) faced two contrasting conditions depending on the year. Spring 2018 was characterized by consistent nutrient inputs and bloom development. In spring 2019, nutrient inputs and bloom were low. For the first time, we observed a clear coupling between primary production and heterotrophic prokaryote production on microplastics during both years, but with different intensity between years that reflected the crucial role of the trophic environmental conditions (nutrient supply) in shaping microbial activities on plastics. We found that high primary production on plastics could support the whole (net autotrophy) or the majority of the bacterial carbon demand needed for heterotrophic activities, supplemented by other carbon sources if surrounding waters are highly productive. We propose that microbial activity on plastics influences the microbial community in the surrounding seawater, especially when the environmental conditions are less favorable. An illustrative image of the role of plastics in the environment could be that of an inverter in an electrical circuit that mitigates both positive and negative variations. Our results highlight the potential role of the plastisphere in shaping biogeochemical cycles in the context of increasing amounts of plastic particles in the marine environment.

Résumé

En Nouvelle-Calédonie, l'élevage de la crevette bleue du Pacifique, *Penaeus stylirostris*, a été initiée dans les années 1970 et représente, à l'heure actuelle, une activité socio-économique majeure à l'échelle du territoire. Cependant, depuis 2005, des mortalités larvaires massives non expliquées impactent l'ensemble des éclosiers de l'île et menacent la pérennité des productions. L'eau de mer lagonaire, utilisée pour les élevages, possède des caractéristiques physico-chimiques et des assemblages microbiens susceptibles de varier en fonction de différents facteurs naturels et / ou anthropiques. Or les paramètres environnementaux de l'eau et les communautés microbiennes associées aux élevages influencent la qualité des larves et donc leur survie. Dans ce contexte, cette thèse a eu pour objectif de déterminer si les variations des communautés procaryotiques actives associées aux élevages pouvaient expliquer les mortalités larvaires observées. Les travaux menés ont d'abord mis en évidence l'implication de transmissions verticales et horizontales au cours de la mise en place du microbiote larvaire de *P. stylirostris*. Puis, l'identification d'un core microbien (affiliés aux familles bactériennes *Rhodobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Stappiaceae*, *Alcanivoraceae*, *Litoricolaceae*, *Pseudoalteromonadaceae* et *Alteromonadaceae*), associé à l'ensemble des échantillons d'élevage considérés et initialement présent dans les œufs et les eaux de remplissage des bacs, a suggéré un impact durable de ces transmissions au cours du développement larvaire, et ce indépendamment de l'état de santé des élevages. Une eutrophisation de l'environnement des larves a également été montrée dans tous les élevages soumis ou non à des épisodes de fortes mortalités. Nous avons constaté que cette eutrophisation ainsi que l'ajout d'antibiotique, le développement larvaire et l'état de santé des élevages entraînaient des variations des communautés procaryotiques associées aux élevages larvaires de *P. stylirostris*. Enfin, des biomarqueurs bactériens de la santé (affiliés aux familles *Rhodobacteraceae*, *Bdellovibrionaceae* et *Saprospiraceae* pour les élevages en bonne santé et aux genres *Portibacter*, *Ponticaulis*, *Oceanococcus*, *Turicella*, *P3OB-42* et *Celeribacter* pour les élevages en mauvaise santé) des élevages ont été mis en évidence. À court terme, ces biomarqueurs devraient permettre la mise au point d'outils de détection de type PCR ou qPCR. Cette thèse offre également de nouvelles perspectives de travail quant à une meilleure gestion des communautés microbiennes associées aux élevages notamment par le développement de nouvelles souches probiotiques.

Mots clés : communautés procaryotiques actives, biomarqueurs bactériens, élevages larvaires, crevette bleue du Pacifique *Penaeus stylirostris*, méta-analyse

Abstract

In New-Caledonia, rearing of the Pacific blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, was initiated in the 70s and currently represents a major socio-economic activity for the territory. However, since 2005, massive unexplained larval mortalities are affecting all of the island's hatcheries and are threatening the entire production. The lagoon seawater, used during larval rearings, possesses physico-chemical characteristics and microbial patterns which are likely to vary according to various natural and / or anthropic factors. Yet, water environmental parameters and microbial communities associated with the rearings influence larval quality et thus larval survival. In this context, this project aimed to define if variations of the prokaryotic communities associated with the larval rearings could explain the observed larval mortalities. This work first evidenced vertical and horizontal transmissions involved during the establishment of the larval microbiota of *P. stylirostris*. The identification of a core microbiota (affiliated to bacterial families *Rhodobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Stappiaceae*, *Alcanivoraceae*, *Litoricolaceae*, *Pseudoalteromonadaceae* et *Alteromonadaceae*), associated with all the considered samples and initially present in the eggs and in the reservoir waters, suggests a lasting impact of these transmissions during the larval development regardless of the larval health status. Eutrophication of the rearing water was also highlighted in all the rearings which were exposed or not to mass larval mortalities. We showed that this eutrophication as well as antibiotic addition, larval development and larval health status induced variations of the prokaryotic communities associated with the larval rearings of *P. stylirostris*. Finally, bacterial biomarkers of larval health status were highlighted (affiliated to bacterial families *Rhodobacteraceae*, *Bdellovibrionaceae* et *Saprospiraceae* in healthy rearings and bacterial genera *Portibacter*, *Ponticaulis*, *Oceanococcus*, *Turicella*, *P3OB-42* et *Celeribacter* in unhealthy rearings). These biomarkers should allow short term development of PCR or qPCR type detection tools. This thesis also offers new work perspectives on better management of the microbial communities associated with the larval rearings through new probiotic strain development.

Keywords : active prokaryotic communities, bacterial biomarkers, shrimp larval rearing, Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris*, meta-analysis