



HAL
open science

Effets des rejets d'eaux usées domestiques sur la physiologie et l'écologie des crabes de mangrove, Sesarmidae et Ocypodidae

Dimitri Theuerkauff

► **To cite this version:**

Dimitri Theuerkauff. Effets des rejets d'eaux usées domestiques sur la physiologie et l'écologie des crabes de mangrove, Sesarmidae et Ocypodidae. Biologie animale. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTG081 . tel-02063439

HAL Id: tel-02063439

<https://theses.hal.science/tel-02063439>

Submitted on 11 Mar 2019

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ecophysiologie adaptative

École doctorale GAIA

Unité de recherche MARBEC

Effets des rejets d'eaux usées domestiques sur la physiologie et l'écologie des crabes de mangrove (Sesarmidae et Ocypodidae)

Présentée par Dimitri Theuerkauff

Le 23 novembre 2018

Sous la direction de Jehan-Hervé Lignot,
Elliott Sucré et Georgina Rivera-Ingraham

Devant le jury composé de

Frédéric Sylvestre, Professeur, Université de Namur, Belgique

Montserrat SOLE ROVIRA, Directrice de recherche, CSIC, Barcelona

Yann VOITURON, Professeur des universités, Université de Lyon 1, Lyon

François FROMARD, Directeur de recherche émérite, CNRS, Toulouse

Jehan-Hervé LIGNOT, Professeur des universités, UM, Montpellier

Georgina RIVERA-INGRAHAM, Chercheur invité, Universidad de Sevilla, Seville

Elliott SUCRE, Maître de conférences, Centre Universitaire de Mayotte

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Invité

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

J'avais gardé cette partie pour la fin, tant elle semblait passer comme une lettre à la poste. Cependant, une réflexion sur ces trois merveilleuses dernières années m'a ramené à tant de souvenirs heureux et moins heureux qu'elle fût plus longue que prévu à écrire ! En effet, cette thèse fut une aventure depuis le début, avec des hauts et des bas dont une caractéristique majeure ressort : dans toutes les situations j'ai pu compter sur une multitude de personnes qui m'ont soutenu et encouragé tout au long, que je tâcherai de ne pas oublier ici. Si tel était le cas, je m'en excuse dès à présent et je vous remercie tous.

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail ainsi que les membres de mon comité de suivi Frédéric Silvestre et Rutger De Wit pour le temps qu'ils m'ont consacré ainsi que leurs conseils éclairés.

Le début de cette thèse remonte au mois d'avril 2015, en plein stress de fin de master et d'incertitudes sur l'avenir, un sujet de l'école doctorale Sibaghe (Gaia aujourd'hui) attire mon attention mais dommage ce n'est pas trop ma spécialité ! Quelques discussions, les amis me motivent et je tente ma chance : j'arrive ainsi à décrocher un coup de téléphone qui sera le début d'une aventure humaine et intellectuelle avec la première personne que je tiens à remercier ici : mon directeur de thèse le Pr. **Jehan-Hervé Lignot**. Merci de m'avoir accordé ta confiance et ton soutien depuis ce jour et tout au long de ces trois années. Tu m'as fait découvrir l'univers de l'expérimentation animale, de l'écophysiologie et plus particulièrement de l'osmorégulation. Ton aide a été un outil précieux dans la réussite de ce travail, au travers de tes conseils, relectures et ta motivation sans faille qui n'ont eu que faire des 8000 km nous séparant pourtant la plus grande partie du temps. Tes missions à Mayotte furent toutes un réel plaisir, que ce soit dans la satisfaction des expériences menées avec ton expertise que ta touche d'humour, toute autant agréable à l'oral qu'à l'écrit. Merci également pour l'accueil et la découverte de Montpellier et son arrière-pays, merci à toute la famille et particulièrement à Joanna pour son aide rédactionnelle. Merci également de m'avoir familiarisé avec les congrès scientifiques, que ce soit dans mes capacités à manier powerpoint et l'accent belgo-anglais que le levé de coude.

Je tiens également à remercier tout autant **Elliott Sucré** et **Georgina Rivera-Ingraham** qui m'ont également accompagné tout au long de ce travail, formant avec Jehan-Hervé une équipe encadrante aussi efficace qu'humaine. Merci Gina de m'avoir fait découvrir le monde du stress oxydatif, de la paillasse et des microplaques. Je tiens à te remercier pour ton investissement dans ce projet, dont la réussite doit beaucoup à tes explications, commentaires et conseils

toujours avisés que ce soit en laboratoire qu'au niveau de mon questionnement scientifique. Ta motivation, ta précision et ton optimisme à toute épreuve m'ont permis de rendre le travail de laboratoire aussi efficace qu'intéressant, je n'aurais jamais pensé m'extasier autant devant une droite parfaite avant d'apprendre à mesurer la SOD ! Merci Elliott Sucré pour ton accueil à Mayotte, ta présence et ton soutien m'ont permis d'avoir confiance en moi et dans le travail effectué au Centre Universitaire de Mayotte. Merci pour tes conseils et ton aide tout au long de ce travail, ainsi que pour la confiance que tu m'as accordée puis le début de cette aventure. Merci de m'avoir fait découvrir cet incroyable milieu qu'est la mangrove et ses petits ingénieurs que sont les crabes de mangrove mais aussi la faune du lagon.

Derrière cette véritable équipe encadrante, je tiens également à remercier mon collègue de bureau mais aussi acteur de la réussite de cette thèse, le technicien de laboratoire Yann Mercky. Ton aide et ta participation furent des éléments clés dans la réussite des expériences mais ta présence fut également à la source d'un univers de travail positif et agréable humainement. Je le remercie également pour les travaux effectués pendant son stage de master, qui ont permis de lancer les bases de cette thèse, ainsi que le travail des stagiaires et de l'ATER Jonathan Roques qui y ont également contribué.

Je tiens à remercier Marc Bouvy de m'avoir accueilli au sein de l'école doctorale GAIA, ainsi que toute son équipe. Je souhaite également remercier la direction et toute l'équipe de MARBEC pour son accueil. Je tiens également à remercier tous les membres de l'ancienne équipe AEO de Montpellier, pour leur accueil, leur aide technique et les discussions scientifiques et autres que nous avons eues: Guy Charmantier, Evelyse Grousset, Emilie Farcy, Catherine Lorin-Nebel, Patricia Cucchi, Eva Blondeau-Bidet, ainsi que la team de doctorants et stagiaires de M2 2016 Khalid, Masroor, Aude, Marie, Guillaume, Alexandre.

Je tiens ensuite à remercier également toute l'équipe du Centre Universitaire, et particulièrement son directeur Aurélien Siri pour son accueil aussi bien au sein du Centre Universitaire que chez lui lors de mon arrivée, me régaland de sa gastronomie provençale d'origine italienne. Merci à l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé le long de cette thèse, et avec qui j'ai pu interagir scientifiquement ou non : Eva, Claire, Thomas, Esmeralda, Ridjal, Jean-Paul, Nagathe, Moussa, Mouzouri, Ali, Hafidhou, Mathieu, Bénédicte et bien d'autres...

Ce projet n'aurait également jamais été possible sans les idées originales de l'équipe du laboratoire d'Ecolab qui ont développé le site unique de Malamani : merci pour cette idée géniale et tous les travaux effectués ainsi que pour les discussions très intéressantes que nous

avons pu avoir lors de nos rencontres. Je tiens ainsi à remercier François Fromard, Cécile Capdeville, Jean-Luc Rols, Josephine Leflaive et le reste de l'équipe d'Ecolab de Toulouse qui s'est impliquée dans le projet. Ce projet n'aurait pas pu être mis en place sans le soutien du SIEAM (syndicat d'Eaux et d'Assainissement de Mayotte), et plus particulièrement du travail de Kissimati Abdallah. Merci Kissimati pour ton accueil et ton aide, ainsi que dans ton investissement dans la réussite du projet de Malamani.

Bien sûr, je tiens également à remercier tous les stagiaires que j'ai encadré ou non au cours de ma thèse et qui ont participé à la fois à la réussite de nos travaux qu'à me permettre de peaufiner mon rôle d'encadrant. Merci Mathilde, Sophia, Quentin, Ludovic, Margot et tous les étudiants de L3 à qui j'ai eu le plaisir de faire découvrir le laboratoire (Roinikou, Ali, Ahmed, Kamardine, Laïtissia, Rahabati,...).

Je n'aurais pas pu mener à bien cette thèse de la même manière sans le soutien de mes supers colocos Priscilla, Anne-Claire & co. Merci pour tout ce que nous avons partagé, les hauts et les bas mais surtout beaucoup de rires, chants et de joie. Merci de m'avoir soutenu tout ce temps, jusqu'au tréfonds de Mamoudzou ou encore pendant cette longue période de rédaction, la maison resta un havre de repos mais aussi de réconfort et de fête, CGT forever.

Marahaba à Mayotte et à tous ses habitants, pour son cadre de vie exceptionnel et l'accueil chaleureux de ses habitants. Merci pour tous ces sourires, services et discussions, je ne pense pas qu'il y ait un endroit sur Terre où l'auto-stop marche aussi bien !

Outre mes super colocos, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai rencontré à Mayotte, et avec qui j'ai vécu d'autres aventures en dehors de la thèse le long de ces 3 années, me permettant de maintenir ma santé mentale : Julien², Chloé, Constance, Jérémie, Dimitri, Kevin, Raff, Bibi, Lucie, Céline, Barry, Vincent², Soazig, Tatiana, Steven, Claire, Quentin, Alexis, Victor, Jonathan, Manu, Fanny, Amaury... ainsi que tous les copain/copines que j'ai eu le plaisir de revoir à mes retours (ou à Mayotte !!) et qui m'ont soutenu également : Christopher, Ivan, Pierre, Loris, Federico, Stéphane, Gilles & la team 11, Ludovic, Jonathan, Régine et Maité, Laureline², Jennifer, Katia, Maelle, Fashion, ...

Enfin, je tiens également à remercier Yves Scailteur, son dévouement dans le partage de sa passion pendant 5 années de cours de Biologie qui sont certainement les bases ayant permis l'aboutissement de cette thèse. Je tiens aussi à remercier les enseignants qui, par la qualité de leur cours et leur passion pour leur domaine et leur pédagogie m'ont permis d'apprendre mais surtout de comprendre pendant les 5 autres années d'études supérieures. Un merci particulier à

David Nerini et Jean-Christophe Poggiale qui m'ont redonné le goût des mathématiques et m'ont encouragé à poursuivre en thèse.

Finalement, je remercie infiniment ceux sans qui je ne serais jamais parvenu jusqu'ici : je parle évidemment de l'ensemble de la famille qui m'ont encouragé et soutenu tout le long de cette thèse. Merci Papa, Maman, Oli & Laura, Céline, Papy, Isabelle & Fabio, Paolo et Chiara.

*Une pensée également à ceux qui ont aussi fait la personne que je suis aujourd'hui
mais qui ne sont plus là...*

Table des matières

Chapitre 1: Problématique.....	17
1.1 Utilisation de la mangrove comme outil de bioremédiation.....	18
1.2 Le projet Malamani de bioremédiation par les eaux usées.....	20
1.2.1 Historique du projet.....	20
1.2.2 Résultats des études antérieures	23
1.2.3 Résultats concernant la macrofaune	24
1.3 Objectifs et outils déployés.....	27
Chapitre 2: Etat de l'art et méthodologie	30
2.1 Les mangroves.....	31
2.1.1 Les services écosystémiques des mangroves	33
2.1.2 Les mangroves et l'environnement de Mayotte	34
2.2 Les crabes de mangrove : diversité et phylogénie	37
2.2.1 Les Ocypodidae.....	39
2.2.2 Les Sesarmidae.....	40
2.3 Les crabes et leur rôle d'espèce ingénieur de la mangrove	41
2.3.1 Alimentation.....	42
2.3.1.1 Consommation des feuilles	42
2.3.1.2 Consommation des propagules	44
2.3.1.3 Consommation des microorganismes du sédiment.....	45
2.3.2 Bioturbation.....	46
2.4 Eléments d'écologie des crabes de mangrove	50
2.4.1 Distribution.....	50
2.4.2 Prédateurs	53
2.4.3 Comportement.....	53
2.4.4 Reproduction et développement.....	54
2.5 Notions de physiologie des crabes de mangrove.....	57
2.5.1 Respiration	57
2.5.2 Respiration bimodale.....	59
2.5.3 L'osmorégulation	64
2.5.3.1 Principes.....	64
2.5.3.2 Les organes, tissus et cellules	68
2.5.4 Stress oxydatif.....	69
2.5.4.1 Les espèces réactives de l'oxygène (EROs).....	69

2.5.4.1	Les défenses antioxydantes	70
2.5.4.2	Les dommages	73
2.6	Méthodologie déployée pour répondre aux objectifs de la thèse	76
2.6.1	Ecologie : suivi de la densité de terriers de crabe autour de la zone de rejet et de la salinité après rejet.....	76
2.6.2	Collecte des individus et stabulation	78
2.6.3	Etude du stress osmotique	80
2.6.4	Effets écotoxicologiques des eaux usées.....	81
Chapitre 3:	Ecophysiologie de l'osmorégulation des crabes de mangrove.....	85
3.1	Introduction	86
3.2	Salinity variation in a mangrove ecosystem: a physiological investigation to assess potential consequences of salinity disturbances on mangrove crabs.....	87
3.3	Synthèse des résultats et tolérance à la salinité de <i>Parasesarma guttatum</i>	104
Chapitre 4:	Effets des eaux usées en milieu contrôlé.....	110
4.1	Introduction	111
4.2	Effet des eaux usées domestiques sur le crabe de mangrove <i>Neosarmatium meinerti</i> 113	
4.2.1	Introduction	113
4.2.2	Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: Integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species.....	114
4.2.3	Conclusion.....	128
4.3	Effets des eaux usées domestiques sur le crabe de mangrove <i>Tubuca urvillei</i>	130
4.3.1	Introduction	130
4.3.2	Résultats et discussion.....	131
4.4	Effets des eaux usées domestiques sur le crabe de mangrove <i>Parasesarma guttatum</i> 135	
4.4.1	Introduction	135
4.4.2	Résultats et discussion.....	135
4.5	Comparaison des trois espèces	144
4.5.1	Physiologie comparée	144
4.5.1.1	Métabolisme.....	144
4.5.1.2	Osmorégulation.....	147
4.5.1.3	Balance oxydative	150
4.5.2	De l'écosystème au laboratoire et vice versa	153
Chapitre 5:	Effets des rejets des eaux usées <i>in situ</i> : « caging » et suivi environnemental par cartographie 157	
5.1	Introduction	158

5.2	Wastewater bioremediation by mangrove ecosystem impacts crab ecophysiology: <i>in situ</i> experiment	160
5.3	Conclusion et poursuite de l'étude <i>in situ</i>	175
5.4	Du laboratoire aux conditions naturelles : perspectives et conclusion	178
Chapitre 6: Discussion générale et perspectives		182
6.1	Du biomarqueur à la population	183
6.2	Les eaux usées : une charge de micro-organismes pathogènes ?	185
6.3	La disparition des Ocypodidae, une question d'éthologie?	186
6.4	Du crabe de mangrove à l'écosystème	187
6.5	Conséquence à long terme et optimisation du processus	190
6.6	Des effets observés dans le faciès à <i>Cerriops</i> à plus grande échelle	192
6.6.1	Les différents faciès	192
6.6.2	Autres mangroves.....	194
6.6.3	La nature du rejet.....	195
6.7	De la branchie aux autres organes	197
6.7.1	La glande antennaire	197
6.7.2	L'hépatopancréas	198
6.7.3	Le poumon.....	199
6.8	De la physiologie à la conservation	200
Chapitre 7: Synthèse et conclusion générale.....		203
Chapitre 8: Bibliographie		209

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine-5'-diphosphate
C	carbone
CAT	catalase
CO ₂	dioxyde de carbone
Com.	communication
Cu	cuivre
ddl	degré de liberté
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
ED	eau douce
EM	eau de mer
EqH	équivalent-habitant
EROs	espèces réactives de l'oxygène
ES	eau saumâtre
EU	eau(x) usée(s)
F	statistique du test de Fisher
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	fer oxydé/réduit
G6Pase	glucose-6-phosphatase
GPX	glutathion peroxydase
GSSG/GSH	glutathion oxydé/réduit
H ⁺	ion hydrogène
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
ind	individu
MDA	malondialdéhyde
Mn	manganèse
MO	matière organique
mOsm	milliosmole
MS	variance
N	azote
NADH	nicotinamine adénine dinucléotide
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
NOEC	plus forte concentration testée sans effet observé (No Observed Effect Concentration)
O ₂	dioxygène
obs.	observation
OH·	radical hydroxyle
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxylase
pers.	personnel(le)
PO	pression osmotique

ppt	quantité de grammes de sels secs dissous dans un kg d'eau de mer (part per thousand)
ROS	voir EROS (reactive oxygen species)
RR	taux respiratoire (respiration rate)
S	soufre
SIEAM	syndicat intercommunal d'eau et d'assainissement de Mayotte
SMR	taux métabolique standard (standard metabolic rate)
SOD	superoxyde dismutase
TBARS	acide thiobarbiturique (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)
Zn	zinc

Lexique

Apoptose	processus par lequel les cellules déclenchent leur mort
Bimodal	concerne les animaux qui peuvent respirer dans l'air ou dans l'eau
Biomarqueur	caractéristique biologique mesurable liée à un processus normal ou non
Bioturbation	remaniement des sols ou de sédiments par des organismes vivants
Butte	monticule de sédiment entourant les racines de palétuviers
Drain	zone d'écoulement des eaux entre les buttes
Fitness	capacité d'un individu à se reproduire
Hémolymphe	liquide circulatoire des arthropodes (rôle analogue au sang)
Hormétique	caractérise des agents toxiques dont l'effet délétère n'est fonction de la dose qu'à partir d'une quantité seuil, alors qu'ils ont un effet bénéfique avant celui-ci
Indice de diversité de Shannon	indice permettant de mesurer la diversité spécifique, c'est-à-dire le nombre d'espèces et la répartition des individus au sein de ces espèces
Ingénieur (de l'écosystème)	espèce qui modifie directement ou indirectement la disponibilité des ressources des autres espèces
Mégalope (stade)	nom donné au dernier stade larvaire ou premier stade post-larvaire chez certains décapodes
Métabolisme basal	correspond aux besoins en énergie dit « incompressibles », c'est-à-dire sans lesquels un organisme ne peut maintenir ses fonctions vitales
Néoglucogénèse	formation de glucose à partir des précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate ou encore les acides aminés
Osmolalité	mesure de la concentration d'une solution exprimée en nombre d'osmoles par kilogramme de solvant
Osmolarité	mesure de la concentration d'une solution exprimée en nombre d'osmoles par litre de solvant
Osmoles	nombre de mole de particules effectivement en solution
Raphé	axe vasculaire de la branchie portant un ensemble de ramification
Recrutement (larvaire)	désigne l'installation de nouveaux individus ayant terminé leur stade de vie planctonique
Taux métabolique standard	voir métabolisme basal
Zoé (stade)	stade larvaire planctonique des crabes caractérisé par une locomotion thoracique

Liste des figures

Figure 1 : Localisation de l'île de Mayotte dans le canal du Mozambique, sud-ouest de l'Océan Indien.	19
Figure 2 : Evolution de la population de Mayotte de 1958 à 2017 (INSEE, 2017).....	21
Figure 3 : Evolution du site de Malamani depuis 2008 : changement des parcelles impactées (blanc puis rouge) en septembre 2015 afin d'analyser la résilience de certaines zones anciennement impactées (2008 à 2016). Les parcelles témoins sont représentées en jaune. La disposition des nouvelles parcelles est perpendiculaire à la pente.	23
Figure 4 : Résultats obtenus sur la macrofaune par Capdeville et al. (2018) dans la zone à <i>Cerriops</i> témoin (T) et impactée (I). Les espèces sont présentées ci-dessous.	25
Figure 5 : Dominance spécifique des Sesamidae sur les Ocypodidae dans la zone à <i>Cerriops</i> témoin (T) et impactée (I).	26
Figure 6 : Modèle conceptuel de la propagation des effets écotoxicologiques à partir des niveaux biologiques inférieurs jusqu'à l'échelle de l'écosystème et influence de leurs effets à l'échelle correspondante. Ce diagramme permet de cibler les niveaux d'intérêt en fonction de l'objectif de protection des espèces et de l'environnement. Modifié d'après Baird et al. (2007a).....	29
Figure 7 : Répartition des mangroves au niveau mondial. D'après Giri et al. (2011).	31
Figure 8 : Carte de Mayotte avec la localisation des mangroves recensées en 2011. D'après Jeanson et al. (2014).....	35
Figure 9 : Schéma et photographies représentant la succession des 4 principales espèces de palétuviers de la mangrove de Malamani, d'amont vers l'aval : <i>Avicennia marina</i> , <i>Cerriops tagal</i> , <i>Rhizophora mucronata</i> et <i>Sonneratia alba</i>	36
Figure 10: Arbre phylogénétique des Eubrachyura d'après Lifemap (de Vienne, 2016)	38
Figure 11 : Arbre phylogénétique des Ocypodidae. Les cases grises ne sont pas des crabes violonistes.	40
Figure 12 : Arbre phylogénétique simplifié des Grapsoidea présents dans la mangrove de Malamani.	41
Figure 13 : Photographies illustrant la récolte et l'enfouissement d'une feuille de palétuvier par <i>Neosarmatium meinerti</i> dans son terrier (A-E).....	43
Figure 14 : <i>Neosarmatium meinerti</i> entraînant une propagule de <i>Cerriops tagal</i> dans son terrier.....	45
Figure 15 : Crabes violonistes (<i>T. urvillei</i>) se nourrissant à la surface du sédiment.	46
Figure 16 : Représentation schématique des mécanismes par lesquels les crabes de mangrove influencent les réactions biogéochimiques. Modifié d'après Kristensen (2008), Gutiérrez et Jones (2006) et Herteman (2010).	47
Figure 17 : Exemple de la distribution de l'oxygène dans le sédiment avec ou sans la présence d'espèces bioturbatrices, d'après Pischedda et al. (2008). A : contrôle sans organismes, B : <i>Cyclope neritea</i> (ne construit pas de structure), C et D : <i>Neireis diversicolor</i> , E : <i>Neireis virens</i>	48
Figure 18 : Schéma (A) et photos de moulages (B) de terriers de crabe violonistes (1) et de Sesamidae (2). A : modifié de Kristensen (2008), B de Bartolini et al. (2011) et C de Herteman (2010).	49
Figure 19 : Synthèse des différents rôles ingénieurs des Sesamidae et Ocypodidae. MO (matière organique).....	51
Figure 20 : Distribution des différentes espèces de crabe dans la mangrove de Malamani. D'après Hartnoll (1975) et les données de Bouchard et al. (2013), Herteman (2010) et des observations personnelles.	52
Figure 21 : Photographie d'un terrier de <i>T. urvillei</i> ouvert (A) et fermé (B)	54
Figure 22 : Combat entre deux crabes violonistes (<i>T. urvillei</i>).	54
Figure 23 : Représentation du cycle de vie général des crabes de mangrove. Modifié d'après Peer et al. (2015).....	55

Figure 24 : Stades zoé de <i>Neosarmatium meinerti</i> . A, B, C, D, E : 1 ^{ère} , 2 ^{ème} , 3 ^{ème} , 4 ^{ème} et 5 ^{ème} stade zoé. Barre d'échelle : 0,2 mm. D'après Lago (1989).	56
Figure 25 : Moulage d'un terrier de <i>N. meinerti</i> juvénile au sein d'une galerie adulte, modifié d'après Emmerson (2001).	56
Figure 26 : Représentation schématique des principales étapes de la respiration. La barre grise représente l'épithélium respiratoire.	57
Figure 27 : Représentation de la cavité branchiale d'un décapode brachioure (A) et des principales structures branchiales (B) en coupe transversale (au-dessus) et en vue latérale (en dessous). (at) arthrobranchie, (pd) podobranchie, (e) épipodite, (dt) dendrobranchie, (tb) trichobranchie, (pb) phyllobranchie. Modifié d'après McLaughlin (1983).	58
Figure 28 : Vue transversale au niveau de la cavité branchiale d'un crabe.	59
Figure 29 : Représentation schématique des différentes adaptations à la respiration aérienne chez les crabes à poumons lisses (A), à poumon évaginé (B) et invaginé (C). La première ligne représente une coupe transversale à travers la cavité branchiale et la deuxième la circulation de l'hémolymphe depuis le vaisseau afférent (a) puis dans les lacunes et ensuite le vaisseau efférent (e). Lumière du poumon (L), Membrane accessoire vascularisée (m), le point noir de C' représente un sac aérien. D'après Farrelly et Greenaway (1993).	61
Figure 30 : Schéma de la circulation de l'hémolymphe chez un crabe bimodal modifié d'après Taylor et Greenaway (1984).	61
Figure 31 : Reconstruction 3D du poumon branchiostégite de <i>Gelasimus vocans</i> en vue dorsale. Les sinus efférents sont en jaune et les afférents en blanc. D'après Paoli et al. (2015).	62
Figure 32 : Représentation des adaptations à la respiration bimodale chez <i>Mictyris longicarpus</i> . (A) Schéma d'une section verticale de la chambre branchiale montrant sa division en 2 parties par la membrane épibranchiale. Le branchiostégite (vu du côté du lumen, B) est un faux poumon vascularisé (schéma, D) dont le sinus sous la carapace comprend de nombreux sacs aériens (C). La membrane épibranchiale (E) est également un faux poumon vascularisé (schéma, G) dont les cellules épithéliales (F) forment des jonctions avec les cellules du tissu conjonctif formant la structure permettant les échanges gazeux (F). Photo C : sac aérien (A), cuticule externe (C), cellule pilier (P), sinus sous-cutané (Sc). Schéma D : épipodite (E), veine pulmonaire (PV), vaisseaux afférent verticaux (1 et 2), vaisseau afférent dorsal (3), encoche dorsale (DN). Photo E : partie postérieure du système afférent (P), partie de vaisseau afférent (A). Photo F : cellule de l'épiderme (E), cellule du tissu conjonctif (CT), hémocoèle (H). Schéma G : vaisseau afférent dorsal (DAV), vaisseau afférent médian (MAV). D'après Farrelly et Greenaway (1987).	63
Figure 33 : Concept de la relation entre le métabolisme aérobie et la température chez les organismes bimodaux : constant dans l'air (ligne bleue) mais croissant dans l'eau (orange). T _c : température critique. D'après Fusi et al. (2016b).	64
Figure 34 : Courbes d'osmorégulation : évolution de l'osmolalité de l'hémolymphe en fonction de l'osmolalité du milieu environnant. Les organismes peuvent être osmoconformeurs (1), hyper-iso-osmorégulateurs (2), hyper-iso-osmorégulateurs en eau douce (2') ou hyper-hypo-osmorégulateurs (3). Iso : ligne d'isosmoticité. D'après Lignot et Charmantier (2015). L'intersection entre la courbe d'osmorégulation et la ligne d'isosmoticité est appelé point isosmotique.	65
Figure 35 : Dessin d'observation d'une cellule épithéliale (d'après André Beaumont et Pierre Cassier, modifié).	69
Figure 36 : Stress oxydatif dû à un déséquilibre entre la quantité d'EROs et les antioxydants. CYP450 cytochrome P450, SOD superoxyde dismutase, GSH glutathione, GPX glutathion peroxydase. Modifié d'après Roberts et al. (2015).	74
Figure 37 : Processus de la peroxydation lipidique : initiation (1), formation du radical peroxy lipidique (2), propagation (3) et terminaison (4). D'après Ayala et al. (2014).	75
Figure 38 : Réactions du radical hydroxyle OH [•] avec les bases pyrimidines. D'après Evans et al., 2004.	76

Figure 39 : Représentation de la localisation des quadrats de 4 transects dans la mangrove de Malamani (avant le changement de parcelle).	77
Figure 40 : Comptage du nombre de terriers de crabe dans un quadrat d'1 m ²	77
Figure 41 : Photographie de la zone de rejet montrant la complexité de la topographie du sédiment (A). Les eaux usées s'écoulent au niveau de drain (B, rouge) entre de nombreuses buttes.	78
Figure 42 : Arrière mangrove de Malamani (A) et d'Ironi Be (B) à marée basse.	79
Figure 43 : Centre Universitaire de Mayotte, CUFR (A), salle d'élevage et circuits fermés recyclés avant les travaux de rénovations de juillet 2016 (B) et après (C).	80
Figure 44 : Schéma des différents temps et milieux d'expositions ayant permis l'étude de l'osmorégulation chez <i>N. meinerti</i> et <i>T. urvillei</i> . L'eau isosmotique correspond à une eau dont l'osmolalité est égale à celle de l'hémolymphe (voir Figure 34, 750 et 820 mOsm·kg ⁻¹ pour <i>N. meinerti</i> et <i>T. urvillei</i> respectivement). Eau de mer (EM), eau douce (ED), espèces réactives de l'oxygène (EROs), espèces réactives de l'azote (ERNs)	82
Figure 45 : Schéma expérimental des expositions aux eaux usées menées sur <i>N. meinerti</i> (A), <i>T. urvillei</i> et <i>P. guttatum</i> (B). Les encadrés rouges correspondent aux protocoles expérimentaux et les encadrés bleus correspondent aux paramètres physiologiques étudiés. Eau de mer (EM), eau douce (ED), eaux usées (EU).....	83
Figure 46 : Courbe d'osmorégulation et de mortalité de trois espèces de crabe de mangrove : <i>T. urvillei</i> (bleu/violet), <i>P. guttatum</i> (vert) et <i>N. meinerti</i> (rouge).....	104
Figure 47 : Photographies de lamelles branchiales antérieures (A) et postérieures (B) de <i>P. guttatum</i> . Epaisseur de l'épithélium des branchies postérieures (5, 6 et 7) de <i>P. guttatum</i> (C) et immunomarquage de la NKA de sa sixième branchie (D). Les lamelles des branchies antérieures sont déformées et l'épithélium n'est pas visible sur toute sa longueur et n'a donc pas été mesuré ni utilisée pour l'immunomarquage de la NKA.....	106
Figure 48 : Observations au microscope électronique à balayage de branchies postérieures de <i>P. guttatum</i> en eau douce (A) et eau de mer (B).	106
Figure 49 : Photographies au MEB de la cavité branchiale de <i>P. guttatum</i> montrant les branchies et le poumon cutané (A) et la surface lisse de ce poumon (B). Photographies des coupes histologiques du poumon cutané au niveau des replis de <i>P. guttatum</i> après coloration au Trichrome de Masson (C : grossissement x20, D : grossissement x40). Branchie (Br), Poumon (P).	107
Figure 50 : Consommation d'oxygène de <i>P. guttatum</i> après (A) transfert de l'eau de mer vers l'eau douce (bleu) et l'eau de mer (contrôle, vert) et (B) respiration aérienne après 2h d'exposition à l'eau douce (ED) et l'eau de mer (EM).	108
Figure 51 : Schéma des modifications histopathologiques induites par l'exposition aux eaux usées au niveau de la branchie postérieure de <i>N. meinerti</i> (A). Cette réduction de l'épithélium osmorégulateur est encore plus importante au niveau du pôle apical et médian de la branchie et principalement du côté distal. Schéma rappelant les différents axes branchiaux (B).	129
Figure 52 : Consommation en oxygène de <i>T. urvillei</i> déplacé de l'eau de mer en eau de mer (vert), en eau douce (bleu) et en eaux usées (rouge) pendant deux heures (A) et après cette exposition dans l'air (B). Les astérisques représentent des différences significatives (p<0,05).	131
Figure 53 : Pressions osmotiques (A) et activité de la NKA branchiale (B) de <i>Tubuca urvillei</i> après 5h en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Branchies antérieures (A) et postérieures (P).	133
Figure 54 : Production d'EROs dans l'hémolymphe (A) et activité de la catalase branchiale (B) après 5h d'exposition en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Branchies antérieures (A) et postérieures (P).	134
Figure 55 : Consommation en oxygène de <i>P. guttatum</i> déplacé de l'eau de mer en eau de mer (vert), en eau douce (bleu) et en eaux usées (rouge) pendant deux heures (A) et après cette exposition dans l'air (B). Les astérisques représentent des différences significatives (p<0,05).	138

Figure 56 : Consommation en oxygène des branchies antérieures (A) et postérieures (B) après une exposition de 5h en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Les lettres représentent des différences significatives ($p < 0,05$).....	140
Figure 57 : Pressions osmotiques de l'hémolymphe (A) et activité de la NKA branchiale (B) de <i>P. guttatum</i> après 5h en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Branchies antérieures (A) et postérieures (P).	141
Figure 58 : Production d'EROs dans l'hémolymphe (A), activité de la SOD (A) et de la catalase branchiale (C) après 5h d'exposition en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Branchies antérieures (A) et postérieures (P).	142
Figure 59 : Modèle de l'évolution de la quantité d'EROs durant l'hypoxie puis l'anoxie chez les organismes pratiquant une préparation au stress oxydatif. Modifié d'après Welker et al. (2013).	143
Figure 60 : Comparaison du métabolisme (consommation en O_2) après un passage de l'eau de mer à l'eau de mer (vert), eau douce (bleu) et eaux usées (rouge) pendant 2h, suivi du métabolisme aérien après la fin de cette exposition.	147
Figure 61 : Synthèse des variations des différents biomarqueurs après passage en eau douce par rapport à l'eau de mer (bleu) et en eaux usées par rapport à l'eau douce (rouge) chez <i>Neosarmatium meinerti</i> , <i>Tubuca urvillei</i> et <i>Parasesarma guttatum</i>	149
Figure 62: Schéma représentant le lien entre stress oxydatif et osmorégulation : l'osmorégulation est un processus coûteux en ATP, induisant ainsi une importante respiration mitochondriale qui est à l'origine de la production des EROs tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les biomarqueurs mesurés sont représenté en gras. Modifié d'après Rivera-Ingraham et al. (en prép.).....	152
Figure 63 : Schéma conceptuel montrant la différence entre une immersion par une marée haute et par les eaux usées : les terriers seront inondés (les crabes violonistes devraient ne pas avoir le temps de boucher leur terrier, hypothèse à vérifier) mais de nombreuses buttes seront émergées et pourront servir de refuge face aux eaux usées.	153
Figure 64 : Corrélacion entre l'osmolalité (salinité) et le nombre de terriers de crabe autour de la zone de rejet. Les points dont l'osmolalité est inférieure à celle de l'eau de mer ($\approx 950 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$) sont sous l'influence du rejet.	158
Figure 65 : Résultats sur les communautés de crabes obtenus par Capdeville et al. (2018) entre 2012 et 2014 dans la parcelle témoin (CA) et la parcelle impactée (IA). Les valeurs de densité de crabe ont été obtenues à partir de quadrats fixes positionnés mi buttes-mi drain.	176
Figure 66 : Evolution de la salinité dans l'eau interstitielle (en $\text{mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$, A) et de la densité de terriers de crabe (B) depuis mars 2015. Les couleurs rouges représentent les valeurs basses et les vertes les valeurs élevées. Les points représentent un exemple des transects effectués qui ont servis à l'interpolation par triangulation. Barre d'échelle : 10m.	178
Figure 67 : Différentes approches d'études pour mesurer la toxicité de produits chimiques et leurs effets sur la vie aquatique. Si l'on augmente la pertinence de l'étude par rapport à la réalité environnementale, la standardisation et la spécificité de l'étude diminue inévitablement. Les biomarqueurs ont l'intérêt de pouvoir faire le pont en étant éventuellement spécifique à un polluant. Modifié d'après Connon et al. (2012).	181
Figure 68 : Schéma rappelant le changement de la zone de rejet en septembre 2015 (A) et l'évolution pendant 24 mois après ce changement de la densité de crabes (A) et de l'indice de diversité de Shannon (B). Les couleurs correspondent aux zones de la figure A : zone jamais impactée (vert foncé), zone anciennement impactée (résilience, vert clair), zone impactée depuis 2008 (rouge), zone impactée depuis septembre 2015 (orange). Modifié d'après Capdeville (2018). Les lettres représentent des différences significatives entre zones par date ($p < 0,05$).	191
Figure 69 : Corrélacion des variations du niveau de la nappe dans deux faciès différents (sans rejet) : <i>Cerriops</i> et <i>Rhizophora</i> . Les oscillations de la nappe sont corrélées aux oscillations de la marée, avec une influence proportionnelle au coefficient de marée. La nappe d'eau du faciès à	

<i>Rhizophora</i> , qui est plus bas, est soumis plus souvent et plus fortement à l'influence de la marée que le faciès à <i>Cerriops</i> . D'après Herteman (2010).	194
Figure 70 : Activité des trois enzymes digestives : protéase, trypsine et chymotrypsine chez des <i>Neosarmatium meinerti</i> mâles exposés à l'eau douce (contrôle, vert), à une eau enrichie en ammonium (orange), et aux eaux usées (rouge). Données obtenues par Diana Martínez-Alarcón (manuscrit en préparation).	199
Figure 71 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les biomarqueurs chez <i>N. meinerti</i> (1), <i>T. urvillei</i> (2) et <i>P. guttatum</i> (3). Seule la consommation d'O ₂ montre une réponse différente aux eaux usées entre les 3 espèces étudiées.....	206
Figure 72 : Schéma des modifications physiologiques observées (en vert et rouge ce qui n'a pas et ce qui a été altéré, respectivement) à l'échelle cellulaire des branchies dues aux rejets d'eaux usées domestiques et les autres processus cellulaires directement liés qui pourraient également être modifiés. Des biomarqueurs de ces processus sont proposés en orange. ARN messenger (ARNm), 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8-oxodG), Cytochrome C (CytC), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (NKA), malondialdéhyde (MDA).	207

Chapitre 1: Problématique

1.1 Utilisation de la mangrove comme outil de bioremédiation

Depuis une vingtaine d'années, plusieurs études ont démontré l'efficacité des palétuviers de la mangrove comme une solution alternative à l'épuration des eaux usées domestiques et ainsi servir d'outil de bioremédiation (Boonsong et al., 2003; Leung et al., 2016; Tam and Wong, 1996a; Wickramasinghe et al., 2009; Wong et al., 1997; Ye et al., 2001). Ce type de phytoremédiation utilise des organismes vivants pour dégrader des contaminants nocifs pour l'environnement présents dans des milieux pollués (sols, eaux, ...). Cela permet ainsi de transformer ces contaminants en composés non toxiques. Ce procédé innovant peut être appliqué au niveau des mangroves puisque les palétuviers peuvent absorber un excédent de nutriments (Reef et al., 2010) et accumuler des métaux (Analuddin et al., 2017; Birch et al., 2015; Nguyen et al., 2017; Richter et al., 2016). Ils peuvent aussi immobiliser d'autres polluants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les polybromodiphényléthers dans des plaques de fer formées sur leurs racines (Farzana et al., 2016; Pi et al., 2017) mais aussi des antibiotiques (Li et al., 2016; Liu et al., 2016).

L'utilisation de la mangrove comme moyen d'épuration est envisagée dans de nombreux pays tels que la Chine, la Thaïlande, l'Inde, la Tanzanie, le Kenya (Jitthaisong et al., 2012; Lee et al., 2014; Li et al., 2011; Ouyang and Guo, 2016; Turcios and Papenbrock, 2014; Wong et al., 1997; Yang et al., 2008). Ouyang et Guo (2018) ont ainsi montré à partir du témoignage de 64 experts qu'il s'agit du meilleur moyen de traitement des eaux usées domestiques en l'absence de stations de traitements. C'est également le cas pour les eaux usées aquacoles (Ouyang and Guo, 2016).

C'est dans ce cadre qu'un projet pilote d'assainissement basé sur les capacités épuratrices de la mangrove a été mis en place fin 2006 à Mayotte, île volcanique de 374 km² (îlots compris) située dans le canal du Mozambique dans l'archipel des Comores (Figure 1).

Ce projet expérimental a permis de suivre et d'analyser les réponses de différents compartiments biotiques au niveau de différents étages de la mangrove et donc de faciès de végétation. Cependant, si on se focalise sur la question de l'impact des eaux usées sur sa macrofaune et plus précisément sur les crabes, à partir des résultats obtenus dans le cadre du projet ou issus de la littérature récente issue d'autres zones géographiques, on s'aperçoit que les résultats sont contradictoires (Amaral et al., 2009a; Bartolini et al., 2009; Cannicci et al., 2009; Capdeville et al., 2018; Fusi et al., 2016a; Penha-Lopes et al., 2009b, 2009a; Yu et al.,

1997). Or, les crabes de mangrove sont connus pour avoir un rôle majeur dans le fonctionnement de l'écosystème mangrove. En effet, ces derniers creusent d'importantes galeries souterraines, et sont qualifiés d'ingénieurs de l'écosystème du fait de leur activité bioturbatrice. La construction de ces structures biogéniques permet l'infiltration des eaux usées dans le sédiment, rendant ainsi possible les processus de bioépuration en relation avec les palétuviers et conditionnant donc *in fine* la bioremédiation.

Dans ce contexte, le travail de doctorat détaillé dans ce manuscrit fait état d'une étude qui se focalise sur différentes espèces de crabe de mangrove présentes dans le canal du Mozambique au niveau de l'île de Mayotte. Des données fondamentales en écophysiologie de l'osmorégulation et métabolique ont été collectées expérimentalement, permettant ensuite d'évaluer les réponses écotoxicologiques de ces organismes suite à des expositions à des eaux usées domestiques en condition expérimentale et sur le terrain. Il s'agira ainsi d'étudier certaines fonctions physiologiques clés de l'homéostasie telles que l'osmorégulation, la balance énergétique et le stress oxydatif.

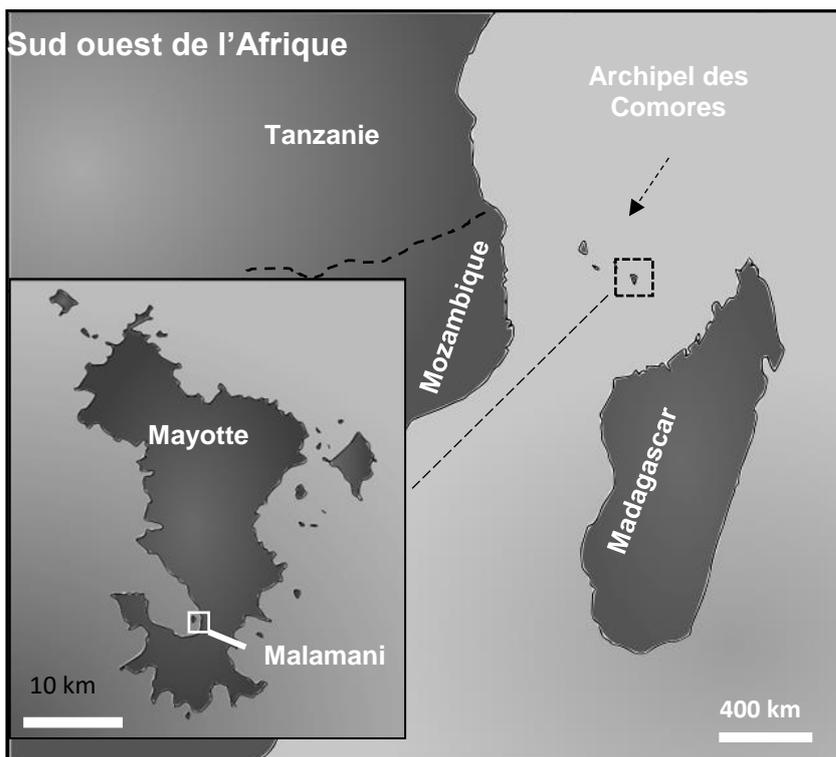


Figure 1 : Localisation de l'île de Mayotte dans le canal du Mozambique, sud-ouest de l'Océan Indien.

1.2 Le projet Malamani de bioremédiation par les eaux usées

1.2.1 Historique du projet

Aujourd'hui, une grande partie des eaux usées de Mayotte s'écoule librement et sans réel traitement préalable dans l'immense lagon qui l'entoure, environnement riche en biodiversité et fragile (Thomassin et al., 2011). Mayotte connaît en effet des difficultés pour le traitement de ses eaux usées, en particulier les eaux usées domestiques en raison de l'explosion démographique (plus forte densité de France avec 685 hab/km², Figure 2) et des problèmes économiques, techniques, fonciers et environnementaux qui en découlent. Ainsi, le problème d'assainissement est immense car les systèmes de traitement sont aujourd'hui déficients : manque de stations d'épuration, dysfonctionnement des stations existantes, problèmes de raccordement des habitations au réseau, etc. (Sturma, 2013). De plus, les méthodes conventionnelles de traitement des eaux usées sont particulièrement coûteuses et difficiles à mettre en œuvre dans un contexte tropical insulaire, éloigné de la métropole. La sensibilité particulière des milieux récepteurs à Mayotte (lagons, sous-sols, rivières) est également une des difficultés majeures rencontrée pour la réalisation des systèmes d'assainissement (Gourbesville and Thomassin, 2000). La directive européenne sur les eaux résiduaires urbaines de 2005 impose des obligations de collecte et de traitement des eaux usées à Mayotte suite à sa départementalisation en 2011 et à sa qualification de région ultrapériphérique européenne en 2014. Les échéances de raccordement ont été fixées au 31 décembre 2020 pour les agglomérations de plus de 10 000 équivalent-habitant¹ (directive 2013/64/UE du 17 décembre 2013). Ainsi plusieurs stations d'épuration sont en cours de construction ou sont déjà opérationnelles dans ces communes (Mamoudzou, Petite Terre, Koungou, Sada, Tsingoni et Dembéni). Pour le 31 décembre 2027, c'est également les agglomérations de moins de 10 000 équivalent-habitant qui devront être raccordées. Il apparaît dès lors urgent d'étudier des systèmes plus appropriés aux nombreux villages disséminés autour de l'île.

¹ Un équivalent-habitant (EqH) est une unité de mesure permettant de quantifier la charge polluante d'eaux usées reçue par une station de traitement. Elle prend en compte l'occupation des habitants mais aussi la présence d'établissement scolaire, bureaux, camping, etc. et les pondèrent. En France, l'article R2224-6 du Code général des collectivités territoriales définit 1 EqH par une charge organique biodégradable ayant une demande biologique en oxygène (DBO) en 5 jours de 60 g d'oxygène par jour. La DBO étant la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder les matières organiques par voie biologique.

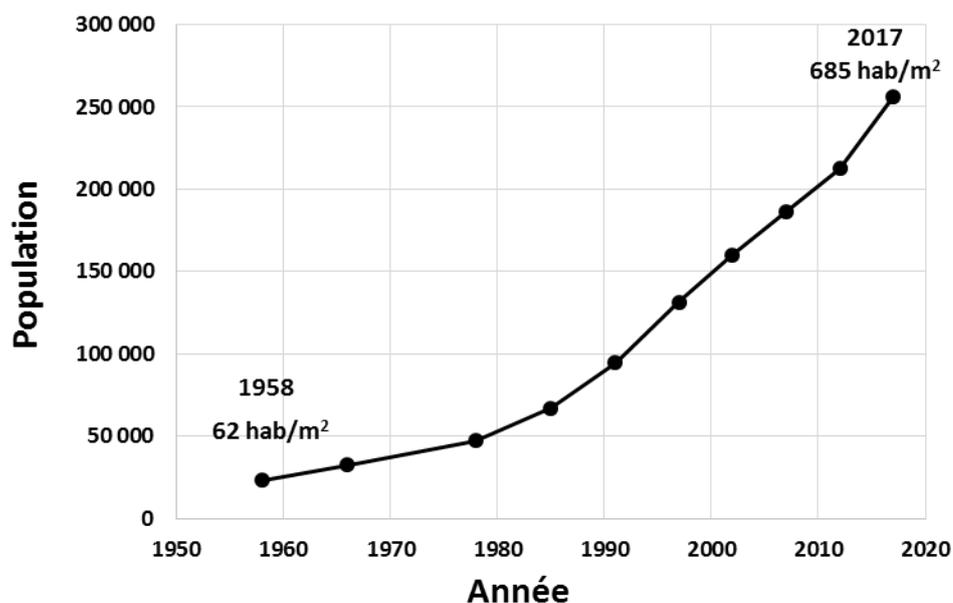


Figure 2 : Evolution de la population de Mayotte de 1958 à 2017 (INSEE, 2017).

A Mayotte, la compétence sur l'assainissement est exercée depuis 1998 par le Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte (SIEAM) en lieu et place des communes de l'Archipel. La première démarche de protection de l'île et de son lagon consiste donc à traiter les eaux usées de manière efficace, afin de préserver durablement la qualité des écosystèmes dans leur globalité, et particulièrement le lagon et ses récifs coralliens. Parallèlement à l'amélioration des stations d'épuration classiques (STEP), le SIEAM étudie depuis plusieurs années la mise en place de techniques de traitement des eaux usées domestiques alternatives, considérées comme plus adaptées au contexte mahorais : lagunage², filtres plantés³, biodisques⁴.

² **Le lagunage** est un processus d'autoépuration se déroulant spontanément dans les étendues d'eau. Il consiste en une série de bassins artificiels ou étangs imperméabilisés dans lesquels les eaux usées sont déversées. Les microorganismes y dégradent la matière organique et la transforment en éléments minéraux.

³ **Les filtres plantés** sont des systèmes de traitement des eaux usées utilisant des plantes, du substrat et des microorganismes au sein d'une zone humide artificielle.

⁴ **Les biodisques** sont des supports à microorganismes épurateurs qui sont partiellement immergés dans l'effluent à traiter et animés d'un mouvement de rotation pour assurer mélange et l'alternance de métabolisme anaérobie (immersion) et aérobie (émersion).

Ainsi, une collaboration entre le SIEAM, le laboratoire Ecolab (CNRS et Université de Toulouse) (depuis 2006) et le CUFM de Mayotte (depuis 2014) a été mise en place afin d'analyser les capacités épuratrices de la mangrove sur un site pilote de Mayotte. Le site qui a été choisi est celui de Malamani situé dans la baie de Chirongui. Il reçoit les eaux usées domestiques du village de Malamani depuis 2008, soit environ 250 EqH (Capdeville, 2018). Un bassin tampon régule le débit d'émission des effluents vers la mangrove. Les conditions de stockage y sont anaérobies et le temps de séjour maximal est de 24h. Une cuve fermée sert ensuite à réduire la vitesse du flux entrant et favorise un écoulement laminaire de l'eau au sein

Mayotte est le département de France le plus densément peuplé après l'île de France, pourtant le traitement des eaux usées est encore très inadapté, malgré la proximité de l'un des plus beaux lagons au monde

d'un décanteur-digesteur. Celui-ci permet de réduire de 50 % les quantités de matières en suspension (MES).

Les eaux usées prétraitées sont ensuite stockées dans un bassin tampon avant d'être déversées dans la mangrove de manière contrôlée : elles sont ensuite conduites en mangrove une fois par 24 heures, soit toutes les 2 marées basses afin d'éviter une saturation trop rapide du milieu. Elles sont rejetées dans différentes parcelles (10 m³ par parcelle) au moyen de tuyaux perforés, par aspersion lente (pendant une heure), afin de favoriser l'infiltration dans le sédiment. La dynamique des rejets est programmée sur une année en fonction du régime des marées (systèmes de débitmètres, pompes, vannes, tableaux de contrôle). Sur le site, 4 parcelles de 675 m² chacune ont été délimitées pour l'expérimentation (Figure 3) : 2 parcelles recevant les eaux usées dans 2 faciès distincts de la mangrove, respectivement dominées par les palétuviers *Ceriops tagal* (partie amont de la mangrove) et *Rhizophora mucronata* (partie centrale), et 2 parcelles témoins équivalentes. Une cinquième parcelle a été mise en place dans un deuxième temps, destinée à recevoir les excédents d'eaux usées importants en saison des pluies, du fait de l'imparfaite étanchéité du réseau de collecte des eaux usées. Chaque parcelle reçoit 10 m³ d'eaux usées par 24 heures, l'excédent étant rejeté dans la 5^{ème} parcelle. En septembre 2015, les parcelles de rejets ont été modifiées afin de pouvoir étudier la résilience de l'écosystème mangrove (Figure 3).

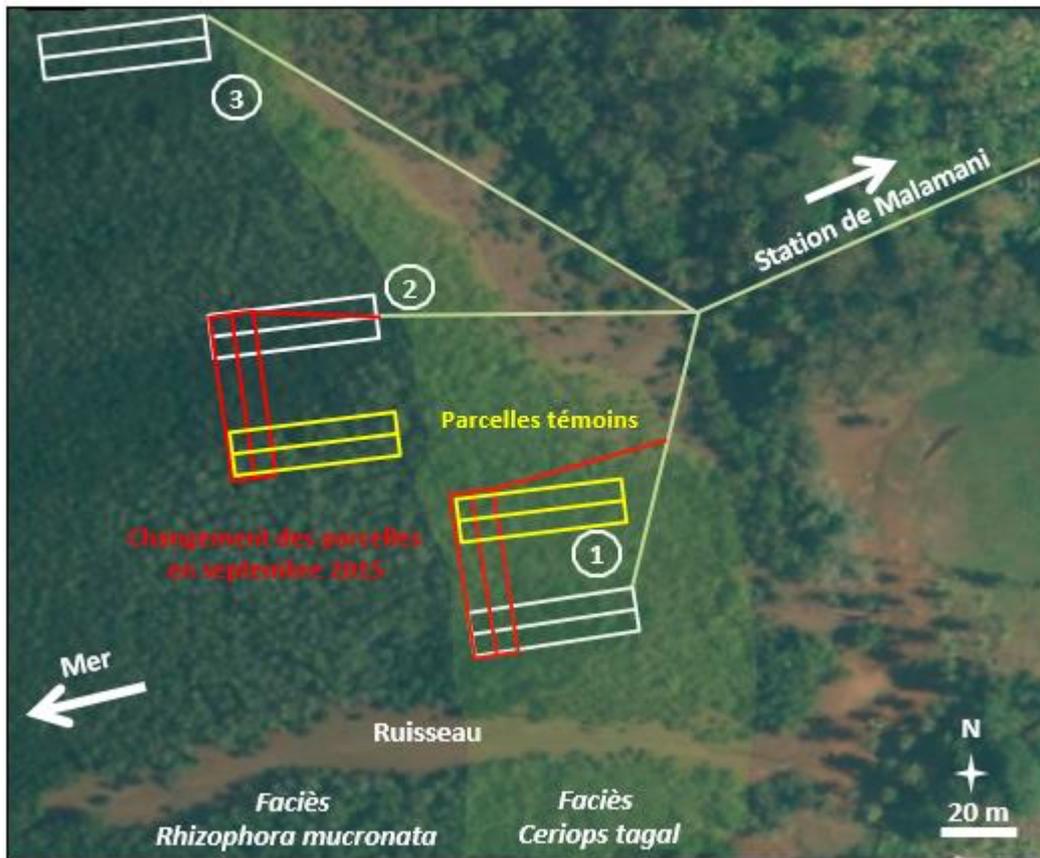


Figure 3 : Evolution du site de Malamani depuis 2008 : changement des parcelles impactées (blanc puis rouge) en septembre 2015 afin d’analyser la résilience de certaines zones anciennement impactées (2008 à 2016). Les parcelles témoins sont représentées en jaune. La disposition des nouvelles parcelles est perpendiculaire à la pente.

1.2.2 Résultats des études antérieures

Dans un premier temps, un état initial du milieu a été réalisé de 2006 à 2008 sous la forme d’une étude structurale et fonctionnelle de la mangrove de Malamani prenant en compte les quatre compartiments indissociables de cet écosystème : végétation, sédiment, eau, faune (crabes).

Dans les parcelles impactées par les eaux usées, il a été observé (Bouchez et al., 2013; Capdeville et al., 2018; Herteman, 2010; Herteman et al., 2011) :

- une augmentation significative de l’efficacité photosynthétique des palétuviers (mesures *in situ* d’échanges gazeux) ;
- une augmentation significative de la concentration en pigments chlorophylliens ;
- une augmentation des surfaces foliaires et de la croissance des rameaux ;

- une augmentation de la productivité (mesures en continu des chutes de litières depuis le début de l'expérimentation) ;
- une fermeture progressive de la canopée.
- une modification des communautés microbiennes

L'ensemble de ces résultats révèle clairement une augmentation de la croissance des palétuviers. De plus, les parcelles impactées sont ainsi parfaitement visibles en vue aérienne, marquées par une coloration verte foncée (due à l'augmentation de la concentration en pigments chlorophylliens) qui se distingue de la couleur verte plus claire de la végétation témoin. Par ailleurs, des expérimentations utilisant de l'azote marqué ^{15}N ont permis de démontrer que les eaux usées, après infiltration dans le sédiment, sont au moins en partie absorbées par la végétation et que l'azote est utilisé par les palétuviers. Dans la configuration actuelle du système, on évalue à 50 % le taux de rétention par la végétation de l'azote excédentaire apportée par les eaux usées.

D'autre part, des analyses *in situ* et en laboratoire, ont démontré que le phosphore excédentaire est fixé dans les horizons moyens des sédiments, et ne circule pas dans la nappe.

1.2.3 Résultats concernant la macrofaune

Les résultats obtenus d'octobre 2014 à avril 2014 ont montré une diminution de la diversité des crabes présents au niveau des parcelles recevant les eaux usées mais aucun effet de ces décharges sur la densité en crabe n'a été observé (Capdeville et al., 2018 ; Figure 4). Cela suggère que certaines espèces ont pu profiter de la chute en effectif de populations d'autres espèces. Les crabes de mangrove sont particulièrement importants, du fait de leur rôle d'ingénieur de l'écosystème (voir §2.3), ce qui les rend également important vis-à-vis du processus de bioremédiation. En effet, c'est grâce à leurs terriers que les eaux usées vont pouvoir s'infiltrer dans le sédiment et ils augmentent considérablement la surface d'échange entre le sédiment et les eaux usées, la rendant davantage disponible aux microorganismes et aux racines de palétuviers.

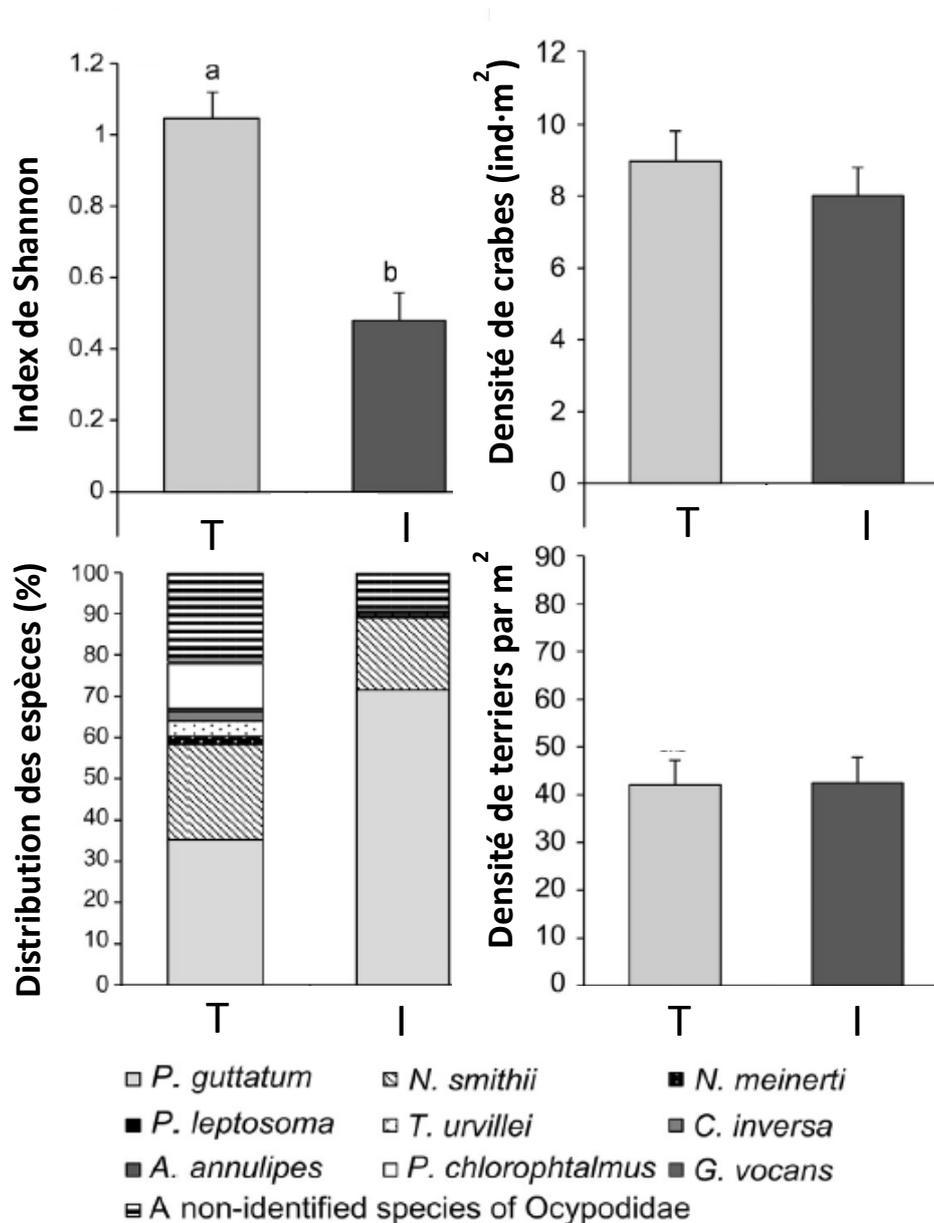


Figure 4 : Résultats obtenus sur la macrofaune par Capdeville et al. (2018) dans la zone à *Ceriops* témoin (T) et impactée (I). Les espèces sont présentées ci-dessous.

Une modification similaire de la répartition des crabes et une diminution de la richesse spécifique ont été observées dans une mangrove australienne également soumise à un gradient d'eaux usées traitées (Wear et Tanner, 2007). Des effets indésirables ont également été observés sur les crabes de mangrove, tels qu'une diminution de la survie dans un mésocosme de mangrove en Tanzanie exposé aux eaux usées (Penha-Lopes et al., 2009a). Cependant, une plus grande diversité des crabes Ocypodidae (crabes violonistes) et Sesarmidae (crabes au mode de vie terrestre et dont certains sont même arboricoles) a été observée en réponse aux eaux usées

dans les mangroves périurbaines du Kenya et du Mozambique (Cannicci et al., 2009) et dans une mangrove urbaine en Thaïlande (Wickramasinghe et al., 2009).

Les crabes de la mangrove de Malamani appartiennent à deux groupes : les Sesarmidae qui se nourrissent de feuilles et les Ocypodidae qui sont détritivores. Plus de 10 espèces de crabe ont été décrites. Les Sesarmidae sont : *Parasesarma guttatum* (Milne-Edwards, 1869), *Neosarmatium smithii* (Milne-Edwards, 1853), *Neosarmatium meinerti* (De Mann, 1887) et *Parasesarma leptosoma* (Hilgendorf, 1869). Les Ocypodidae sont : *Tubuca urvillei* (Milne Edwards, 1852), *Cranuca inversa* (Hoffmann, 1874), *Austruca annulipes* (Milne Edwards, 1837), *Paraleptuca chlorophthalmus* (Milne Edwards, 1837), *Gelasimus vocans* (Linnaeus, 1758) et une autre espèce encore non identifiée. Le groupe des Sesarmidae est largement dominant, représentant en moyenne $60,2 \pm 4,2$ % des individus dans la zone à *Cerriops tagal* non impactée (Figure 5). Cette proportion est significativement plus élevée dans la zone de mangrove impactée avec $89,7 \pm 5,8$ % de Sesarmidae. La diversité α des crabes, basée sur l'indice de diversité de Shannon, a été significativement réduite par la décharge en eaux usées ($p = 0,0005$) (Figure 4).

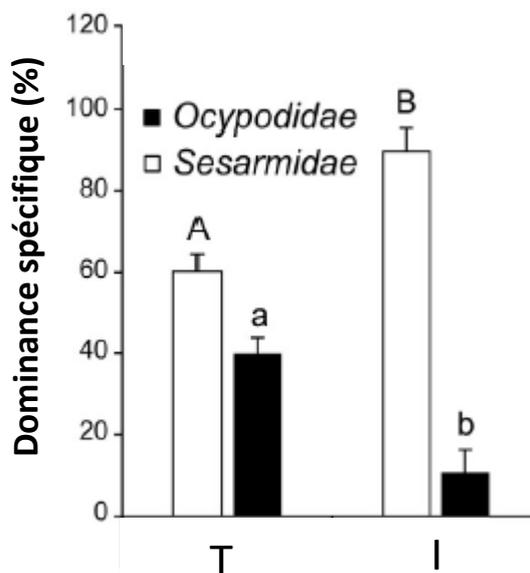


Figure 5 : Dominance spécifique des Sesarmidae sur les Ocypodidae dans la zone à *Cerriops* témoin (T) et impactée (I).

La zone témoin est dominée par trois espèces principales : *P. guttatum* ($35,3 \pm 4,5$ % des individus), *N. smithii* ($23,1 \pm 4,4$ %) et une espèce non identifiée d'Ocypodidae ($21,6 \pm 2,0$ %).

Les décharges en eaux usées ont induit une plus forte dominance de *P. guttatum* dans la zone impactée, ses proportions atteignant $71,5 \pm 7,2$ % des individus. Cela s'est accompagné d'une diminution de presque toutes les espèces observées dans la zone touchée, et d'une disparition complète de *G. vocans* et *P. leptosoma* dans la zone impactée. Ainsi, 3 espèces seront ciblées dans cette thèse : un Sesarmidae

(*Neosarmatium meinerti*) et un Ocypodidae (*Tubuca urvillei*) dont la fréquence diminue, et un autre Sesarmidae (*P. guttatum*) qui est la seule espèce à tirer profit de ce rejet.

1.3 Objectifs et outils déployés

L'objectif principal de l'étude est d'évaluer les effets des eaux usées domestiques sur la physiologie de différentes espèces de crabe de mangrove à l'échelle individuelle. L'étude vise ainsi à acquérir des connaissances fondamentales sur l'écophysiologie de trois espèces ingénieuses permettant d'évaluer quels sont les biomarqueurs les plus pertinents dans le cadre écotoxicologique de notre étude d'impact.

Trois espèces seront étudiées : une espèce de Sesarmidae (*Neosarmatium meinerti*) et une d'Ocypodidae (*Tubuca urvillei*) dont les populations sont négativement impactées par le rejet (cf ci-dessus) et la seule espèce dont les effectifs augmentent au niveau de la zone de rejet : *Parasesarma guttatum* (Sesarmidae).

Les biomarqueurs sont des outils importants pour mesurer les effets sublétaux provoqués par un stress chez les organismes (Forbes et al., 2006; Monserrat et al., 2007). Ils sont mesurés directement au niveau des cellules, tissus ou de l'organisme entier à partir d'individus exposés à un stress. Ils peuvent représenter des altérations moléculaires, biochimiques, cellulaire et physiologiques (Hugget et al., 1992) mais également comportementales (Monserrat et al., 2007). Parmi eux, certains sont dits spécifiques, tels que les métalloprotéines vis-à-vis des métaux lourds (Wu et al., 2016) tandis que d'autres sont plus globaux tels que le stress oxydatif et/ou la réponse antioxydante. Ces biomarqueurs non spécifiques permettent de caractériser des zones polluées dans lesquelles un polluant ou un cocktail de polluants est présent (Monserrat et al., 2007).

Les biomarqueurs indiquent un dysfonctionnement au niveau cellulaire, d'un organe ou de l'organisme entier. Ils peuvent donc fournir un signal précurseur du déclin de la santé et/ou de la performance d'un organisme et ainsi avoir des répercussions à plus grande échelle, par exemple, au niveau de la population (Figure 6).

Dans le cadre de cette étude, l'intérêt premier a été d'étudier la santé des individus exposés aux eaux usées ainsi que d'évaluer leurs performances physiologiques. C'est donc à ce niveau d'intégration de la réponse au stress que se focalise l'étude en prenant aussi en compte le suivi de la population mais cette fois-ci avec un indice vis-à-vis de la communauté (étude de la densité des terriers de crabe).

Il est à noter que peu de biomarqueurs sont actuellement suffisamment bien maîtrisés pour établir les conséquences d'un stress environnemental (Forbes et al., 2006). Ceci est notamment dû aux multiples interactions avec d'autres facteurs environnementaux (ex : paramètres abiotiques). Il convient, dès lors, de déployer un ensemble large de biomarqueurs permettant ainsi de couvrir le champ d'effets potentiels (Van der Oost et al., 2003).

Comme les eaux usées domestiques exposent les individus non seulement à de nombreux polluants, mais aussi à un stress osmotique (baisse de l'osmolalité du milieu aquatique qui est ainsi proche de celle de l'eau douce), l'**osmorégulation** a donc été une fonction physiologique clé ciblée dans notre étude. En effet, celle-ci est effectuée au niveau des branchies qui sont également une voie d'entrée majeure pour les polluants. Cela est dû à leur grande surface d'échange, la présence d'un épithélium fin et leur spécialisation dans les échanges ioniques. L'**histopathologie** est également un outil efficace pour étudier la santé d'un organisme à l'échelle des tissus (Hinton et al., 1992). Les techniques histologiques permettent aussi l'étude de l'osmorégulation, notamment en analysant la localisation des principaux transporteurs membranaires (ex : NKA), et sont complémentaires aux techniques de biochimie (ex : activités enzymatiques).

Les eaux usées domestiques ayant une composition variable et instable au cours du temps, l'analyse du **stress oxydatif** est particulièrement appropriée dans ces analyses écotoxicologiques. En effet, le stress oxydatif n'est pas un marqueur spécifique d'un polluant et a été utilisé avec succès dans de nombreuses études de terrain visant à caractériser l'impact de cocktails complexes de polluants chez des invertébrés (Monserrat et al., 2007). Ainsi, l'utilisation de la balance redox a déjà été validée dans différentes études afin d'identifier les effets de différents types d'eaux usées (Gagné et al., 2006; Joakim Larsson et al., 2002; MCGOVARIN et al., 2018; Neri-Cruz et al., 2015; Oakes and Van Der Kraak, 2003; Oropesa et al., 2016; Sturve et al., 2008). De plus, la fonction d'osmorégulation requière une forte demande en énergie et donc en ATP, ce qui nécessite la présence de nombreuses mitochondries au niveau des sites osmorégulateurs (voir §2.5.3). Or, c'est au niveau de la mitochondrie que sont produites majoritairement les espèces réactives de l'oxygène (voir §2.5.4). Ce couplage osmorégulation et stress oxydatif permet donc d'établir une analyse plus élargie des conséquences des rejets réguliers d'eaux usées domestiques dans la mangrove sur la physiologie des crabes présents dans cet écosystème. Enfin, des **biomarqueurs énergétiques** ont aussi été utilisés tels que la respiration branchiale et celle de l'individu entier. Ces données

physiologiques sont classiquement utilisées en écotoxicologie, notamment pour l'analyse des effets induits par des expositions à des 'cocktails' de polluants (Sokolova et al., 2012).

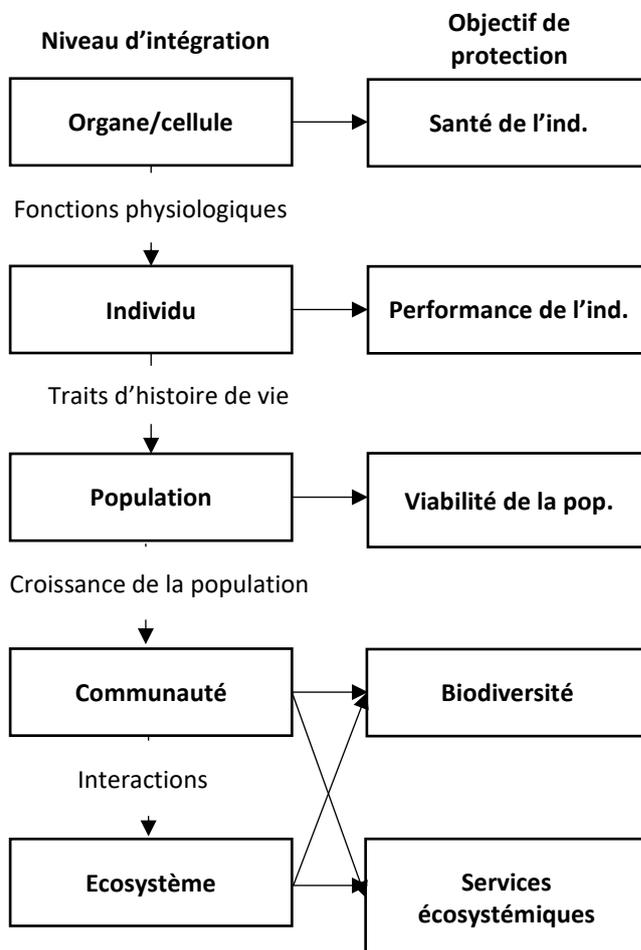


Figure 6 : Modèle conceptuel de la propagation des effets écotoxicologiques à partir des niveaux biologiques inférieurs jusqu'à l'échelle de l'écosystème et influence de leurs effets à l'échelle correspondante. Ce diagramme permet de cibler les niveaux d'intérêt en fonction de l'objectif de protection des espèces et de l'environnement. Population (pop.), individu (ind.). Modifié d'après Baird et al. (2007a).

Chapitre 2: Etat de l'art et méthodologie

2.1 Les mangroves

Les mangroves correspondent à des forêts en milieu côtier principalement dans les régions tropicales et subtropicales situées à des latitudes comprises entre 30°N et 30°S. Ces forêts se développent dans des zones intertidales entre la mer et la terre, dans des lagunes, estuaires ou deltas. Leur distribution semble délimitée par les principaux courants et un isotherme de 20°C pour l'eau en hiver (Alongi, 2009). Cet écosystème particulier est composé de différentes espèces de palétuviers qui poussent dans des conditions difficiles avec de fortes salinités, des températures élevées et dans des zones à fort balancement des marées.

D'après Giri et al. (2011), la surface totale des mangroves autour du globe est de 137,760 km² réparties à travers 118 pays et territoires tropicaux (Figure 7). Cela représente 0,7 % de la surface totale occupée par les forêts tropicales. On retrouve les mangroves principalement en Asie (42 % de la surface totale), Afrique (20 %), Amérique du Nord et Centrale (15 %), Océanie (12 %) et Amérique du Sud (11 %). De plus, 75 % de ces mangroves se concentrent dans seulement 15 pays.



Figure 7 : Répartition des mangroves au niveau mondial. D'après Giri et al. (2011).

Les palétuviers sont les seuls arbres capables de pousser en milieu salé. Ces arbres ou arbustes tropicaux halo-résistants présentent des caractéristiques particulières permettant des stratégies de survie adaptées aux fortes contraintes environnementales (sol mou, instable et pauvre en oxygène ; submersion temporaire et répétée par l'eau salée lors des marées). Certains palétuviers (ex : le palétuvier rouge) ont un système racinaire aérien en forme d'échasses (rhizophores) qui leur permet de respirer et d'être ancrés dans le sédiment. Les racines imperméables fortement subérisées, agissent comme un mécanisme d'ultra-filtration pour

éliminer le sel du milieu. D'autres, comme les palétuviers blancs et gris, possèdent des excroissances au niveau de leurs racines (pneumatophores) qui se dressent à la verticale au-dessus du sol et des eaux pour assurer la respiration de la plante même lorsque ses racines sont submergées par les marées. Pour éviter les pertes en eau, les palétuviers peuvent contrôler l'ouverture de leurs stomates mais aussi l'orientation de leurs feuilles. L'eau de la végétation contient également très peu de sels (90 à 97 % en moins de sel dans la sève que l'eau dans laquelle les racines se trouvent). Tout le sel qui rentre dans la plante s'accumule dans les pousses et est concentré dans de vieilles feuilles qui servent alors de stockage dans les vacuoles des cellules végétales. Les palétuviers blancs (ou gris) peuvent aussi sécréter le sel par l'intermédiaire de glandes à sel à la base des feuilles et qui sont ainsi couvertes de cristaux blancs de sel.

Ces mangroves sont menacées et sont donc protégées. En effet, chaque année une perte de 1 à 2 % de la surface globale (perte estimée à 35 % entre 1980 et 2000) occupée par ces forêts est observée (Duke et al., 2007). Cette perte de surface et de diversité peut être expliquée par différents facteurs, pour la plupart liés à des activités anthropiques. En effet, les zones côtières où sont présentes les mangroves, sont soumises à une forte expansion démographique et touristique (Alongi, 2008; Giri et al., 2011). Les mangroves sont donc détruites pour laisser place à des habitations, des zones d'aquaculture ou d'agriculture (Polidoro et al., 2010). De toutes ces menaces, l'aquaculture est considérée comme la plus importante pour les 10-15 prochaines années, avec une demande en produits de la mer en constante expansion.

Le changement climatique risque aussi de fortement impacter les zones de répartition des mangroves, notamment à cause de l'augmentation de la température et de la montée des eaux. Avec la remontée des eaux, les espèces présentes dans les mangroves seraient forcées de rentrer plus à l'intérieur des terres, or, la structure et la composition des sols limitent fortement cette avancée, la mangrove étant limitée à des zones réduites (Ellison, 2015; Gilman et al., 2008). De plus, les zones de mangrove reçoivent, via les eaux de ruissellement, une forte charge organique et de nombreux polluants issus d'activités industrielles ou urbaines (Lesirma, 2016; Lovelock et al., 2014), ce qui pourrait avoir un impact sur la faune et la flore locale. Au Cameroun, une étude a démontré la présence de nombreux composés chimiques (Sterols, DDT) et de métaux lourds dans les sédiments de la mangrove à la suite d'une pollution anthropique (Fusi et al., 2016a). Ces composés semblent impacter négativement les organismes macrobenthiques avec une diversité de cette macrofaune du sol qui diminue. Or, les écosystèmes de mangrove offrent de nombreux services écosystémiques comme l'absorption de large quantité de nutriments des

eaux de ruissellement, ce qui protège d'autres écosystèmes adjacents (récif corallien, lagune etc.). Cela a notamment été observé en Floride par MacDonell et al. (2017). Une perte de diversité et de surface de ces mangroves limiterait donc les services rendus par cet écosystème.

2.1.1 Les services écosystémiques des mangroves

Les mangroves offrent de nombreux services écosystémiques et sont du fait de leur structure, considérées comme un puit de carbone. Elles conservent le carbone autochtone et piègent le carbone allochtone (Donato et al., 2011). Si les mangroves ne couvrent que 0,5 % des côtes mondiales, elles contribuent, cependant, pour 10 à 15 % du stockage de carbone des côtes (Alongi, 2014). La plupart de ce carbone est séquestré par la sédimentation de boues riches en carbone (Chmura et al., 2003) qui dépend de l'étage intertidal (Alongi et al., 2005) et qui est fortement dépendante également des échanges avec l'océan via les cycles de marées (Dittmar et al., 2006). Mais cette séquestration est aussi fortement liée aux activités de la macrofaune et plus particulièrement des crabes via la bioturbation et l'alimentation (cf. §2.3.1). De plus, les mangroves occupent la fonction de nurserie, les juvéniles de nombreuses espèces aquatiques trouvant refuge entre les racines des palétuviers (Nagelkerken et al., 2000). La faible profondeur et la forte turbidité de ce milieu limite donc la présence de prédateurs et favorise donc les stades juvéniles vulnérables dans d'autres milieux. Enfin, la forte présence de matière organique apporte une source alimentaire non négligeable pour les juvéniles (Lee, 2008; Nagelkerken et al., 2008). La partie aérienne sert d'habitat aux oiseaux et insectes, les racines et le sol pour des éponges, crabes, poissons etc. (Nagelkerken et al., 2008). Cette forte abondance en espèces (de poissons notamment) rend un service écosystémique direct aux populations humaines habitant en bord de mangrove, ces dernières pouvant chasser et pêcher pour obtenir des ressources alimentaires. Les mangroves possèdent aussi un rôle de tampon entre la terre et la mer. En effet, la présence de végétation permet de diminuer la puissance du vent lors de tempêtes venues de la mer (atténuation de 20 % par 100 m de mangrove) selon Mazda et al. (1997) ainsi que d'atténuer la force des vagues et la vitesse de montée des eaux. Il a même été démontré que la mangrove protège les côtes contre les tsunamis (Alongi, 2008; Dahdouh-Guebas et al., 2005b; Danielsen et al., 2005). D'autre part, la mangrove protège également les écosystèmes adjacents (herbiers, récifs coralliens) contre l'apport de matière organique (Lee et al., 2014) et de l'envasement grâce au maintien de matière au sol (Lee, 2008). Outre l'apport de matière organique venant des bassins versants, sa principale source dans la mangrove provient de la litière des palétuviers et de leurs racines. En effet, la contribution des détritiques des épiphytes,

macroalgues et microphytobenthos est généralement faible suite à une production primaire restreinte par limitation de la lumière de la canopée (Alongi, 1994)

La fonction protectrice de la mangrove rend donc un véritable service écosystémique de manière indirecte, en protégeant, les zones habitées proches des mangroves d'événements météorologiques violents. Cela permet d'éviter le fort coût associé à la réhabilitation post événement dramatique. Dans de nombreux pays la question se pose sur la valeur réelle de la protection offerte par la mangrove (Barbier, 2016). En effet, il pourrait être préférable d'un point de vue économique de maintenir la mangrove en bon état, voire de la replanter. Le coût des opérations de maintien et de restauration serait en effet plus faible que les dégâts engendrés par des tempêtes en zone où la mangrove a disparu.

2.1.2 Les mangroves et l'environnement de Mayotte

Mayotte est constituée de deux îles volcaniques principales : Grande Terre et Petite Terre ainsi qu'une trentaine de petits îlots d'origine volcanique ou corallienne, entourées par l'un des plus grands lagons du monde (1500 km²) et protégées par une barrière de corail de 157 km de circonférence. En plus de sa taille, sa diversité biologique est également remarquable, abritant de nombreuses espèces de coraux, poissons, mollusques, mammifères marins (dont le célèbre dugong, Ordre des Sirenia) et constitue également une zone de nourricerie pour les tortues marines (Chabanet, 2002; Kiszka et al., 2007; Letourneur, 1996; Pusineri and Quillard, 2008; Taquet et al., 2006). L'écosystème corallien du lagon de Mayotte étant très sensible aux eaux usées (Pastorok and Bilyard, 1985; Wear and Thurber, 2015), il apparaît d'autant plus important de trouver une solution alternative au rejet des eaux usées dans le lagon.

Les mangroves de Mayotte couvrent 1,9 % de la surface de l'île (Figure 8), soit 703 ha (Jeanson et al., 2014). Elles sont constituées par 7 espèces de palétuviers (Thongo, 2016), qui colonisent des zones selon les caractéristiques du sol. Ainsi, du front de mer à l'arrière mangrove, on les retrouve selon une succession, qui peut varier entre les mangroves à sol vaseux (fond de baie) et celles à fond rocheux (littoral). Ainsi, la mangrove de fond de baie de Malamani, à sol vaseux est principalement constituée par une succession de 4 espèces de palétuviers (Herteman, 2010) représentée dans la Figure 9 : *Avicennia marina*, *Ceriops tagal*, *Rhizophora mucronata* et *Sonneratia alba*.

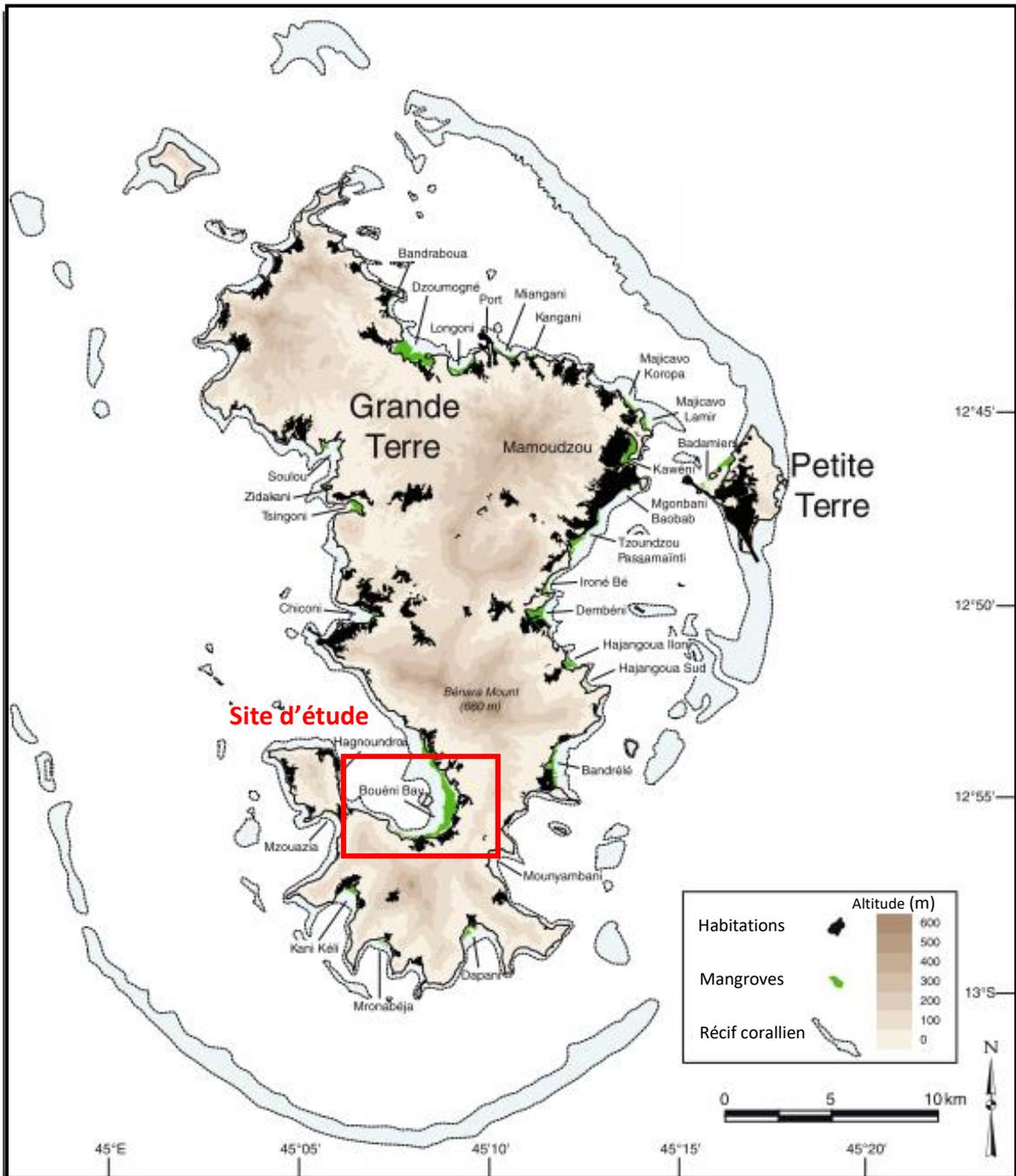


Figure 8 : Carte de Mayotte avec la localisation des mangroves recensées en 2011. D'après Jeanson et al. (2014).

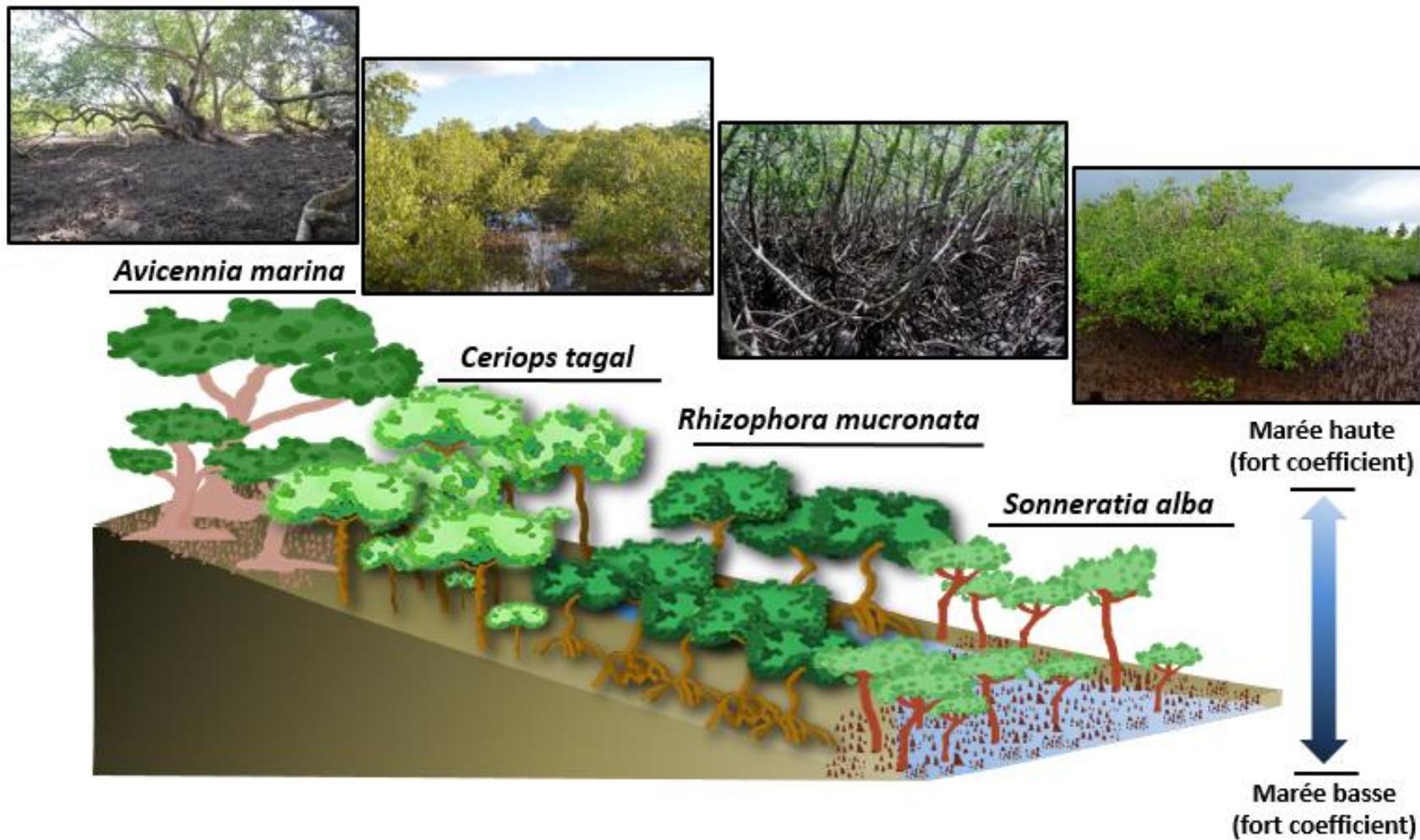


Figure 9 : Schéma et photographies représentant la succession des 4 principales espèces de palétuviers de la mangrove de Malamani, d'amont vers l'aval : *Avicennia marina*, *Ceriops tagal*, *Rhizophora mucronata* et *Sonneratia alba*.

Comme toutes les mangroves, elle abrite une faune spécifique riche et diversifiée (Nagelkerken et al., 2008). Au-dessus de l'eau, les palétuviers abritent de nombreuses espèces d'oiseaux, d'insectes, de mammifères, de reptiles et de champignons. Sous l'eau, les racines sont le support de nombreux épibiontes (tuniciers, éponges, algues, bivalves) et ses anfractuosités permettent le refuge d'espèces mobiles : crustacés (crevettes, crabes) et poissons. Le sédiment quant à lui abrite une méiofaune également riche : copépodes, nématodes, turbellariés, etc., mais peu d'études fournissent des données sur les communautés de la méiofaune à l'échelle de l'espèce, à l'exception des copépodes (Nagelkerken et al., 2008). Mais le sédiment abrite également plusieurs espèces de crabe qui y creusent d'importants terriers, agissant ainsi en ingénieurs de l'écosystème mangrove (voir ci-dessous).

2.2 Les crabes de mangrove : diversité et phylogénie

Les Eubrachyura (les 'vrais crabes') constituent l'infra-ordre des crustacés décapodes. En 2014, ils comprenaient 38 superfamilles, 104 familles, 1401 genres et 7188 espèces (Schram and Castro, 2015) et de nombreuses espèces sont encore régulièrement découvertes. La figure 10 représente le positionnement phylogénétique à partir de Lifemap (de Vienne, 2016) de ces différentes superfamilles au sein des Eubrachyura.

Position phylogénétique des Eubrachyura :

- Animalia
 - Arthropoda
 - Crustacea
 - Multicrustacea
 - Malacostraca
 - Eumalacostraca
 - Eucarida
 - Decapoda
 - Pleocyemata
 - Brachyura
 - Eubrachyura

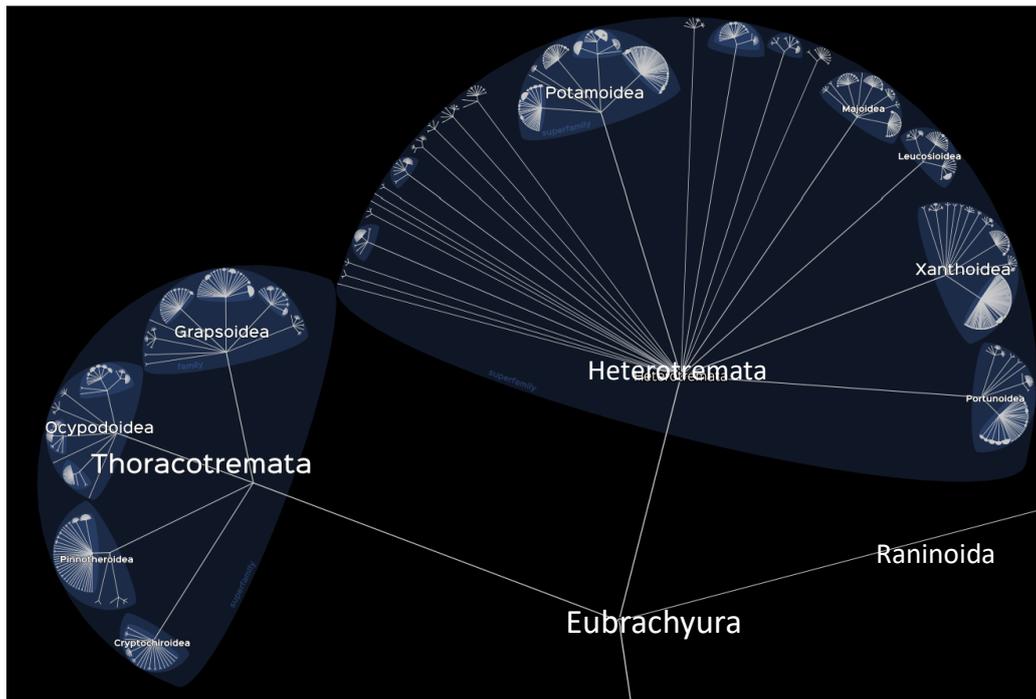


Figure 10: Arbre phylogénétique des Eubrachyura d’après Lifemap (de Vienne, 2016)

Ils sont caractérisés par une large carapace protégeant l’entièreté du céphalothorax et un pléon réduit replié sous le thorax. A Mayotte, ce sont 42 espèces de crabe qui ont été répertoriées à ce jour dont 22 espèces dans les mangroves (Bouchard et al., 2013). Parmi celles-ci, au moins 14 espèces ont été observées dans la mangrove de Malamani (Bouchard, 2009; Bouchard et al., 2013; Mercky Yann, 2015; pers. obs.) et qui appartiennent principalement à la famille des Sesarmidae (super-famille des Grapsoidea) et des Ocypodidae (super-famille des Ocypodoidae) (Tableau 1).

Tableau 1 : Espèces de crabe observées dans la mangrove de Malamani

| | |
|---|---|
| <p>Grapsoidea</p> <p>Gecarcinidae</p> <p><i>Cardisoma carnifex</i> (Herbst, 1796)</p> <p>Sesarmidae</p> <p><i>Parasesarma guttatum</i> (A. Milne Edwards, 1869)</p> <p><i>Parasesarma leptosoma</i> (Hilgendorf, 1869)</p> <p><i>Neosarmatium meinerti</i> (De Man, 1887)</p> <p><i>Neosarmatium smithii</i> (H. Milne Edwards, 1853)</p> <p><i>Sesarmops impressus</i> (H. Milne Edwards, 1837)</p> <p>Varunidae</p> <p><i>Pseudohelice subquadrata</i> (Dana, 1851)</p> | <p>Portunoidea</p> <p>Portunidae</p> <p><i>Scylla serrata</i> (Forsskål, 1775)</p> <hr/> <p>Ocypodoidea</p> <p>Ocypodidae</p> <p><i>Tubuca urvillei</i> (H. Milne Edwards, 1852)</p> <p><i>Paraleptuca chloropthalmus</i> (H. Milne Edwards, 1852)</p> <p><i>Austruca annulipes</i> (H. Milne Edwards, 1837)</p> <p><i>Cranuca inversa</i> (Hoffman 1874)</p> <p><i>Gelasimus vocans</i> (Linnaeus, 1758)</p> <p>Macrophthalmidae</p> <p><i>Macrophthalmus (Mareotis) depressus</i> (Rüppel, 1830)</p> |
|---|---|

2.2.1 Les Ocypodidae

La famille des Ocypodidae (Figure 11) est largement répandue dans le monde entier au niveau des zones tropicales (Crane, 1975). Elle a été récemment organisée en 3 sous-familles : Gelasiminae, Ocypodinae et Ucidinae (Shih et al., 2016) avec un total de 13 genres comprenant 131 espèces dont 102 dénommées ‘crabes violonistes’ (Rosenberg, 2014). Cette dernière appellation concerne donc un groupe paraphylétique. Ils habitent la zone intertidale sur des sédiments meubles, particulièrement à proximité des mangroves et prés-salés et peuvent

atteindre de très fortes densités (Skov et al., 2002; Skov and Hartnoll, 2001). De plus, ils sont considérés comme espèces ingénieurs de l'écosystème (Kristensen, 2008).

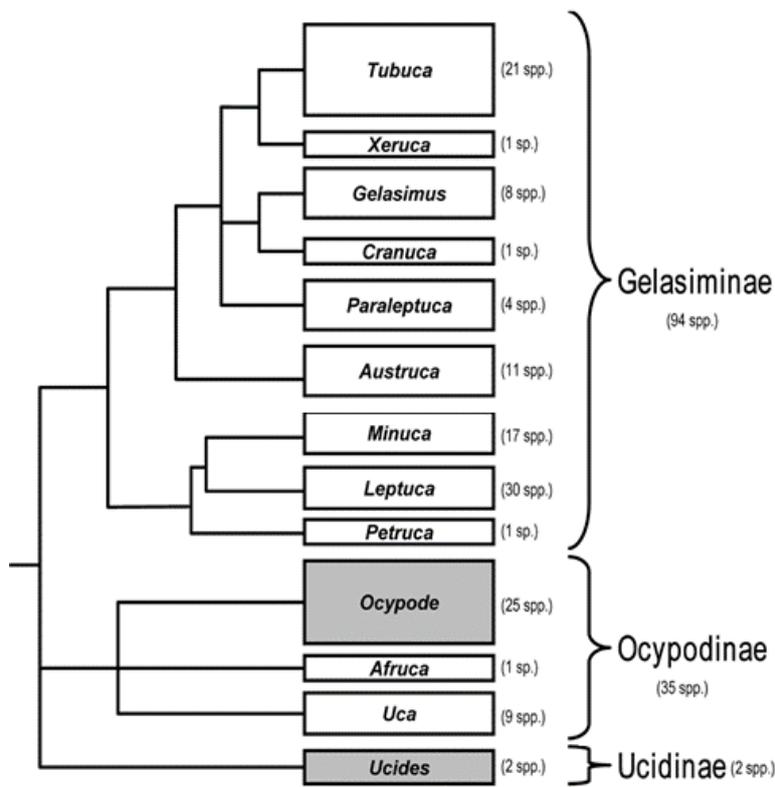


Figure 11 : Arbre phylogénétique des Ocypodidae. Les cases grises ne sont pas des crabes violonistes.

2.2.2 Les Sesarmidae

Cette famille appartient au groupe des Grapsoidea et comprend plus de 250 espèces. Bien que largement étudiée aussi bien par l'approche morphologique que moléculaire (Schubart et al., 2006), la taxonomie de cette famille est encore largement remise en question. Par exemple, le genre *Perisesarma* - *Parasesarma* vient d'être réorganisé : la plupart des espèces du genre *Perisesarma* est combiné au genre *Parasesarma* et les « vrais » *Perisesarma* sont à présent dénommés *Guinearma* (Shahdadi and Schubart, 2018). Il apparaît dès lors difficile de présenter un arbre phylogénique clair mais la Figure 12 propose un arbre phylogénique simplifié pour les espèces retrouvées dans la mangrove de Malamani.

Il est à noter que *Neosarmatium meinerti* a été récemment divisé en 4 espèces distinctes dans l'Océan Indien : *N. africanum*, *N. meinerti*, *N. asiaticum* et *N. australiense* (Ragionieri et al., 2012, 2010). Cependant, il n'est pas possible de distinguer morphologiquement les spécimens présents à Mayotte. Ils peuvent être attribués à *N. meinerti* ou à *N. africanum*. Dès lors, les

individus collectés sont supposés appartenir à *N. meinerti* en attendant confirmation via une analyse génomique (Bouchard et al., 2013)⁵. La bibliographie concernant *N. meinerti* pouvant être attribuée à *N. asiaticum* et *N. australiense* sera analysée avec précaution.

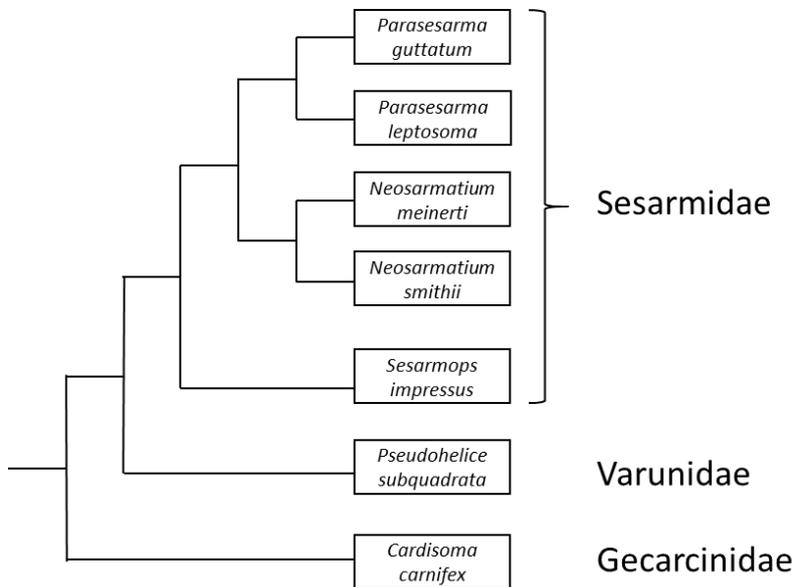


Figure 12 : Arbre phylogénétique simplifié des Grapsoidea présents dans la mangrove de Malamani.

2.3 Les crabes et leur rôle d'espèce ingénier de la mangrove

Une espèce est dite « ingénier de l'écosystème » si elle modifie directement ou indirectement la disponibilité des ressources (qualité, quantité, distribution,...) des autres espèces (Jones et al., 1997, 1994). Deux catégories d'espèces ingénier ont été proposées :

- Autogènes : modifient leur environnement par leur propre structure (ex : corail)
- Allogènes : modifient leur environnement en transformant de la matière (vivante ou non) d'un état physique à un autre, que ce soit par voie mécanique ou tout autre moyen (ex : macrofaune creusant des terriers).

Pour la deuxième catégorie, il faut noter que l'espèce en question ne doit pas faire partie du flux d'énergie et de matière (qui relèvent du réseau trophique), mais impacte ces flux. Par exemple, les sardines sont à la base du régime alimentaire de nombreux prédateurs et leur stock a donc un rôle majeur dans les écosystèmes hauturiers, mais elles ne sont pas ingénier car ce rôle

⁵ Suite à la soutenance de thèse, les résultats de l'analyse génomique des spécimens de *Neosarmatium meinerti* retrouvés à Mayotte ont infirmé cette hypothèse, ceux-ci devant être attribués à *Neosarmatium africanum* (Lapo Ragoneri, com. pers., décembre 2018). Pour plus de clarté dans le manuscrit, le terme de *N. meinerti* sera toutefois maintenu dans cette publication.

fait partie intégrante du flux d'énergie au sein du réseau trophique. Une espèce ingénieuse n'est pas synonyme d'espèce clé de voûte, cette dernière étant définie par son contrôle sur la structure des communautés, son absence induisant des changements massifs dans la diversité et le fonctionnement de l'écosystème (Paine, 1969). Cependant, ce contrôle implique souvent l'action d'espèces ingénieuses (Smith III et al., 1991).

Les Sesarmidae et Ocypodidae sont des ingénieurs de l'écosystème mangrove via leur alimentation et leurs activités bioturbatrices qui modifient la structure physique, les cycles biogéochimiques du sédiment, ainsi que la composition florale et microbienne, changeant ainsi la disponibilité des ressources pour les autres organismes (Andreetta et al., 2014; Cannicci et al., 2008; Kristensen, 2008; Lee, 1998). Ce sont donc des ingénieurs allogènes.

2.3.1 Alimentation

Le régime alimentaire des crabes va induire des modifications majeures de l'écosystème mangrove via la consommation des feuilles (Figure 13) et des propagules d'une part (Sesarmidae) et la consommation du microbenthos d'autre part (Ocypodidae), et ce, en lien avec la bioturbation.

2.3.1.1 Consommation des feuilles

Les Sesarmidae sont les principaux consommateurs de la litière en mangrove (Dahdouh-Guebas et al., 1999; Lee, 2008), mais leur influence est très variable selon l'espèce et la localisation géographique et/ou au sein même de la mangrove (Cannicci et al., 2008). En moyenne, c'est 70 à 100 % de la litière qui est ainsi consommée (Lee, 2008, 1998; Micheli et al., 1991), dont une grande partie est consommée dans les terriers (Figure 13E), produisant des pelotes fécales enrichies en carbone, augmentant ainsi la séquestration du carbone (voir Bioturbation).

En effet, une même espèce peut avoir différentes préférences alimentaires et sa position dans tel ou tel faciès modifie son influence. Dahdouh-Guebas et al (1997) ont montré que le contenu stomacal de *Neosarmatium meinerti* contient plus de 90 % de fragments de feuilles de palétuvier, sans préférence d'espèce, le reste étant composé de petits crustacés et insectes. De manière générale, les feuilles représentent au moins 85 % des contenus stomacaux des Sesarmidae (Dahdouh-Guebas et al., 1999) qu'ils vont ainsi retirer de la surface du sol (voir §2.3.2). *Parasarma guttatum*, par contre, consomme généralement les feuilles là où elles sont tombées (Gillikin and Schubart, 2004) et ne les déplace qu'occasionnellement jusqu'à son abri (cette espèce ne creuse pas de terrier).



Figure 13 : Photographies illustrant la récolte et l'enfouissement d'une feuille de palétuvier par *Neosarmatium meinerti* dans son terrier (A-E).

Ainsi, *Neosarmatium meinerti* n'a pas de préférence alimentaire entre les différentes espèces de palétuvier (Dahdouh-Guebas et al., 1997).

De nombreux auteurs ont pointé un paradoxe dans le régime alimentaire de ces crabes. En effet, les feuilles de palétuvier ne pourraient pas combler les besoins nutritionnels à elles seules du fait de leur faible palatabilité, de leur richesse en tannin, et surtout de leur manque en nutriments, avec un ratio C:N qui excède largement 17 (Skov and Hartnoll, 2002) et qui est plutôt proche des 100 (Cannicci et al., 2008; Kristensen et al., 1995).

Giddins et al. (1986) ont proposé que les crabes collent les feuilles au sédiment dans leurs terriers pour permettre la solubilisation des tannins et augmenter leur comestibilité : c'est l'hypothèse du « leaf-ageing ». De plus, l'activité microbienne diminue le ratio C:N pendant la décomposition (Cundell et al., 1979). De nombreux éléments ont indirectement étayé cette hypothèse : la préférence des crabes pour les feuilles sénescents, avec moins de tannins ou encore, une meilleure croissance avec ces dernières et, bien sûr, la présence de feuilles dans les terriers (Camilleri, 1989; Micheli, 1993; Robertson, 1986). Cependant, Skov et Hartnoll (2002) ont montré que le ratio C:N des feuilles retrouvées dans les terriers de *N. meinerti* et *P. guttatum* n'est pas différent de celui des feuilles sénescents. Ils posèrent alors l'hypothèse que ces crabes complètent leurs besoins en azote à partir d'autres sources que les feuilles. Cependant, les dernières études contredisent cette hypothèse. Bui et Lee (2014) ont montré via une analyse isotopique, qu'ils assimilent bien cette nourriture de mauvaise qualité, soulignant une capacité physiologique inédite qui mériterait davantage d'investigations. De même, Harada et Lee (2016) ont montré que *Neosarmatium trispinosum* consomme directement les feuilles dans son terrier et que le carbone des palétuviers est dominant dans son alimentation. Cependant, il doit s'agir d'une alimentation carencée en azote, le sédiment retrouvé dans le tractus digestif ne pouvant pas suffire à ses besoins. Thongtham et Kristensen (2005) avaient déjà montré que le carbone issu des feuilles est suffisant pour supporter la croissance des crabes, mais que l'azote doit être obtenu à partir d'autres sources, probablement par l'ingestion occasionnelle de tissus animaux riches en azote, l'apport par les bactéries et les macroalgues n'étant pas suffisant. Cet azote pourrait être stocké sous forme d'urate intracellulaire comme c'est le cas chez certains Gecarcinidae (Linton and Greenaway, 1997; Linton et al., 2017).

De plus, certaines espèces de crabe sont arboricoles et peuvent directement consommer les feuilles fraîches dans la canopée (Fratini et al., 2005; Matillano et al., 2018). C'est le cas de *Parasarma leptosoma* (Cannicci et al., 1996a, 1996b; Vannini and Ruwa, 1994), dont la densité peut atteindre jusqu'à 300 crabes par palétuvier rouge (*Rhizophora mucronata*). Ces crabes peuvent alors consommer de 50 à 60 % des feuilles de la canopée.

2.3.1.2 Consommation des propagules

Les Sesarmidae consomment également des propagules (Figure 14) avec, comme pour les feuilles, des préférences variables selon l'espèce et la localisation (Smith III, 1987). Par exemple, Clarke et Kerrigan (2002) ont mesuré des taux allant de 22 à 100 % selon l'espèce de palétuvier consommée. Ces choix peuvent être partiellement liés à des différences nutritionnelles et à la concentration en tannins, et vont être un facteur important du succès de

germination des propagules (Alongi, 2009; Cannicci et al., 2008; Van Nederveelde et al., 2015). Les propagules posées horizontalement sur le sédiment sont consommées plus rapidement que celles enchâssées dans le sédiment pendant les premières heures, mais après 24 h, 85 % de l'ensemble des propagules sont généralement consommées par *Neosarmatium meinerti* (Daoudouh-Guebas et al., 1997). Cependant, ce crabe présente une nette préférence pour les propagules immatures et seules les plus matures persistent après plusieurs jours.



Figure 14 : *Neosarmatium meinerti* entraînant une propagule de *Ceriops tagal* dans son terrier.

En conséquence, les crabes de mangrove ont un rôle primordial dans la régénération et la distribution des espèces de palétuvier (Cannicci et al., 2008; Lindquist and Carroll, 2004) et est encore plus déterminant dans les zones défrichées (Daoudouh-Guebas et al., 1998). Il est également intéressant de noter que s'ils constituent un facteur important du succès de régénération des palétuviers, la replantation de propagules de mangrove dans les zones dégradées permet également de restaurer les communautés de la macrofaune (Gorman and Turra, 2016), soulignant une résilience importante de cet écosystème.

2.3.1.3 Consommation des microorganismes du sédiment

Les Ocypodidae se nourrissent principalement du biofilm (Figure 15) périphytique⁶ (Hootsmans et al., 1993) et de celui présent à la surface du sédiment (Bouillon et al., 2004; Crane, 1975). Ils saisissent le sédiment en utilisant leur petite pince et en la plaçant dans la cavité buccale au niveau de laquelle les particules sont triées et ingérées (microalgues, nématodes, bactéries,...). Le reste est roulé en boules irrégulières qui sont déposées sur la surface du sédiment à intervalle régulier (Bouillon et al., 2002; Crane, 1975). La sélection de la nourriture se fait par sédimentation des particules lourdes et inorganiques au fond de la cavité

⁶ Qui vit sur un support végétal

buccale alors que la matière organique flotte dans l'eau provenant de la cavité branchiale et est ingérée. Celle-ci dépend de l'espèce considérée et des conditions environnementales (Meziane et al., 2002).



Figure 15 : Crabes violonistes (*T. urvillei*) se nourrissant à la surface du sédiment.

Ce biofilm est responsable d'une faible proportion de la production primaire (<14 %) dans la plupart des mangroves due à la limitation de la lumière par la canopée (Alongi, 2009), mais contribue à une fraction importante d'apport d'azote organique dans la chaîne alimentaire (C:N ~ 7-10 contre 100 pour la litière).

La consommation de ces microorganismes se fait sur quelques millimètres, mais le remodelage du sédiment affecte jusqu'à 2 cm de profondeur les éléments sensibles à l'oxydoréduction tels que le fer et le soufre (Kristensen and Alongi, 2006). Ainsi, ces 2 premiers centimètres de sédiment contiennent beaucoup de formes oxydées (35 à 230 % plus de Fe^{3+} par exemple) grâce à ce turnover continu des crabes violonistes. Ce procédé pourrait même être partiellement dû à l'enfoncement des pattes pendant leur déplacement, et se produirait donc également pendant les autres activités (maintenance du terrier, reproduction,...). Les crabes violonistes vont ainsi structurer la distribution des microorganismes et leurs activités dans le sédiment (Kristensen, 2008).

2.3.2 Bioturbation

La bioturbation dans les environnements aquatiques comprend par définition tous les transports de particules, de sédiment et/ou d'eau par des organismes qui, ainsi, modifient directement ou indirectement la nature du sédiment (Kristensen et al., 2012). Elle inclut donc la maintenance des terriers et leur ventilation éventuelle et va jouer un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'écosystème. De nombreuses espèces de crabe des mangroves creusent des terriers dans le sédiment (Kristensen, 2008). Ridd (1996) estime ainsi que dans chaque km^2 de mangrove, un

volume de 1000 à 10000 m³ d'eau environ circule dans les terriers à chaque cycle de marée, soit 0,3 à 3 % du volume d'eau circulant dans la mangrove. Ces valeurs dépendent de nombreux facteurs tels que le volume total des terriers, le nombre et la taille des ouvertures et l'amplitude de marée. Cependant, ces chiffres présentent l'avantage de montrer l'importance de ces structures dans la circulation de l'eau, permettant d'évacuer le sel excrété au niveau des racines de manière plus efficace que par diffusion à travers le sédiment (Alongi, 2009). Cette bioturbation va augmenter la couche sédiment-air jusqu'à 400 % et ainsi augmenter l'oxygénation du sédiment, avec pour conséquence, de modifier les procédés microbiens et géochimiques (Kristensen and Kostka, 2013). La bioturbation des crabes induit, de plus, un effet sur la biogéochimie du sédiment en modifiant sa topographie et la distribution des tailles de particules, les conditions redox et la matière organique (Mouton and Felder, 1996).

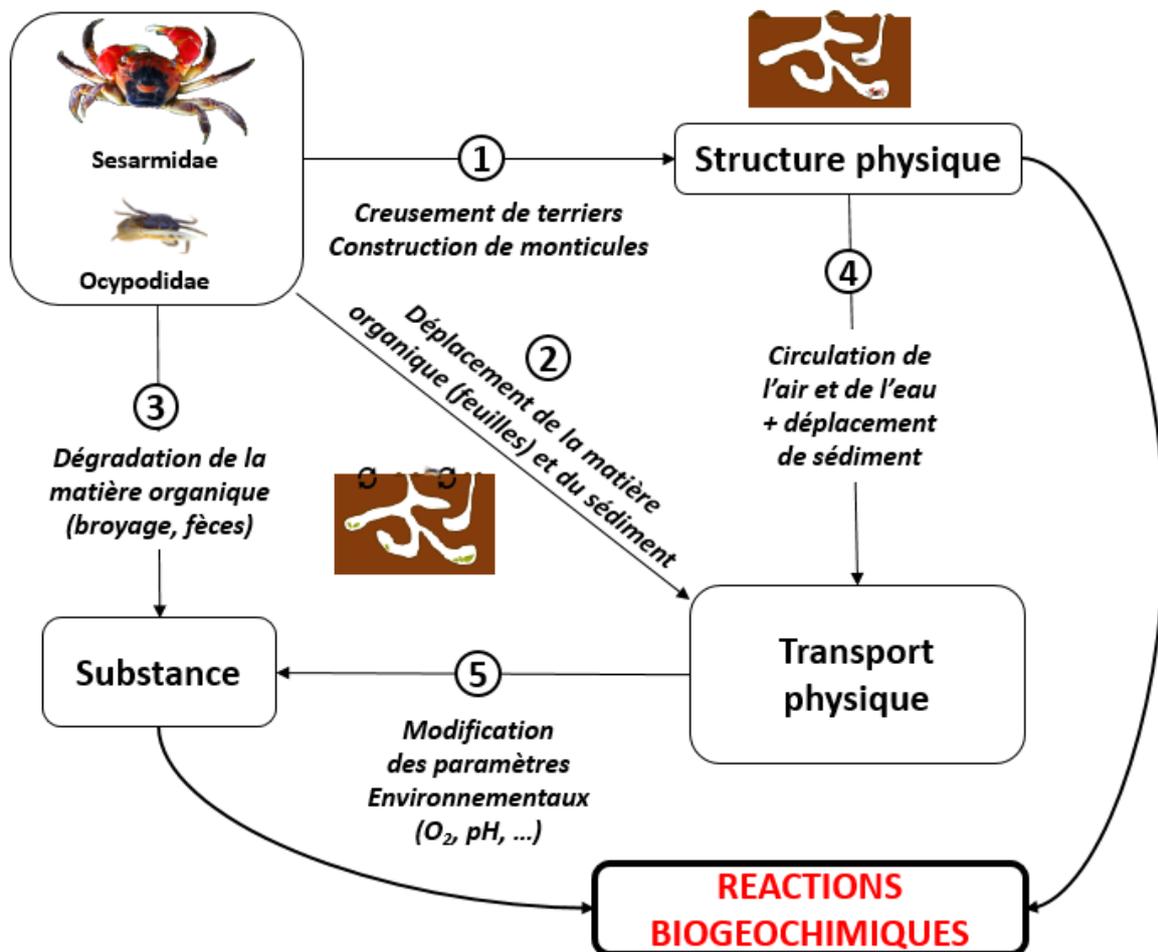


Figure 16 : Représentation schématique des mécanismes par lesquels les crabes de mangrove influencent les réactions biogéochimiques. Modifié d'après Kristensen (2008), Gutiérrez et Jones (2006) et Herteman (2010).

La plupart des crabes de mangrove creusent des terriers, avec des formes et des profondeurs qui dépendent de l'espèce, du faciès de végétation et du sédiment. La présence de plusieurs espèces bioturbatrices va ainsi augmenter l'hétérogénéité du sédiment en relation avec la complexité des structures de leurs terriers (Figure 17). Ces structures servent de refuge contre la prédation et des conditions environnementales défavorables ainsi qu'au stockage de nourriture (Giddins et al., 1986; Kristensen, 2008).

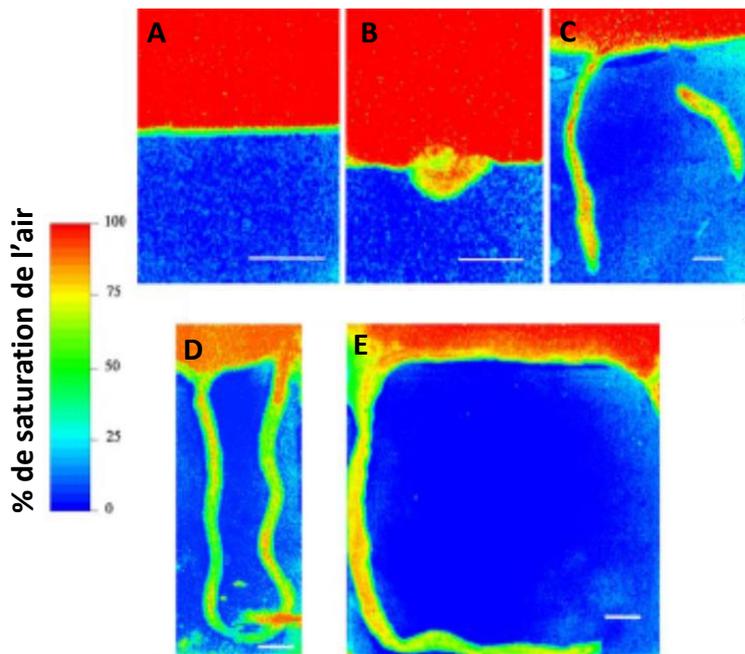


Figure 17 : Exemple de la distribution de l'oxygène dans le sédiment avec ou sans la présence d'espèces bioturbatrices, d'après Pischedda et al. (2008). A : contrôle sans organismes (résolution: 570 x 570 μm), B : *Cyclope neritea* (ne construit pas de structure, résolution: 610 x 610 μm), C et D : *Neireis diversicolor* (résolution: 500 x 500 μm et 790 x 790 μm), E : *Neireis virens* (résolution: 770 x 770 μm).

Les Sesarmidae peuvent creuser des terriers (Figure 18A2, B2) jusqu'à 2 m de profondeur, et y emmener de la matière organique dont ils se nourrissent (feuilles, propagules,...) (Dahdouh-Guebas et al., 1997; Emmerson and McGwynne, 1992; Sousa and Dangremond, 2011). Ils sont ainsi responsables de la consommation ou de l'enfouissement d'une large partie de la litière. Cette contribution est très variable et ne peut être généralisée (Cannicci et al., 2008). Par exemple, *N. africanum* consomme de 43 à 100 % de la litière d'*Avicennia marina* (Emmerson and McGwynne, 1992; Olafsson et al., 2002). Ainsi, Robertson et Daniel (1989) ont montré que seulement 24 à 25 % de la litière est exportée vers l'océan grâce aux Sesarmidae. Cette matière organique, dont la fraction de carbone assimilée (environ 30 à 50 %) est variable mais étonnamment faible (Bui and Lee, 2014; Giddins et al., 1986; Harada and Lee, 2016), échappe alors à la marée (Lee, 2008) et améliore la rétention du carbone dans le sédiment (Gutiérrez et al., 2006; Kristensen et al., 2008). Les Sesarmidae agissent ainsi en broyeurs, et leurs

excréments sont enrichis en azote et appauvris en tannins, et contiennent jusqu'à 70 fois plus de bactéries que les feuilles sénescents (Werry and Lee, 2005), ce qui en fait une meilleure source de nourriture pour les décomposeurs secondaires tels que les amphipodes (Lee, 1997). Les Sesarmidae améliorent ainsi le stockage du carbone dans le sol et devraient être considérés comme une composante importante dans la stratégie contre le réchauffement climatique (Andreetta et al., 2014).

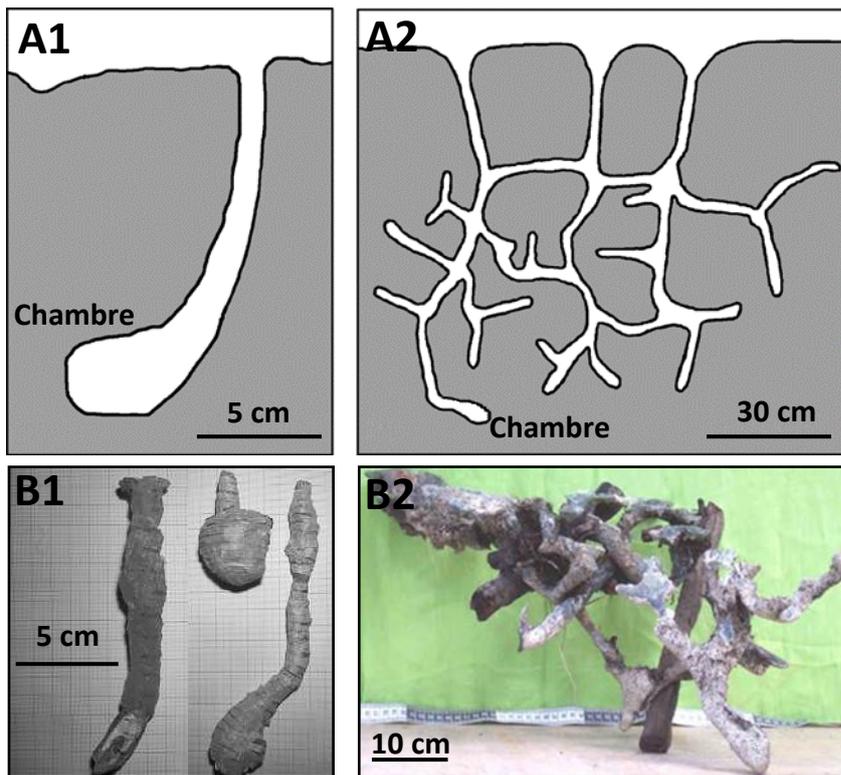


Figure 18 : Schéma (A) et photos de moulages (B) de terriers de crabe violonistes (1) et de Sesarmidae (2). A : modifié de Kristensen (2008), B de Bartolini et al. (2011) et C de Herteman (2010).

Tout comme les Sesarmidae, les Ocypodidae creusent des terriers pour se protéger (Figure 18). Leur morphologie est cependant plus simple et n'augmente la surface air-sédiment que d'environ 1 % (contre 150-380 % pour les Sesarmidae). En revanche, leur abondance est telle (10 à 500 par m² contre 0,2 à 10 par m² pour les Sesarmidae) que leurs activités bioturbatrices sont comparables et considérables (Kristensen, 2008; Skov et al., 2002).

Ni les Sesarmidae, ni les Ocypodidae ne ventilent leurs terriers. Seuls leurs mouvements de va-et-vient provoquent un léger flux d'air. Ce transport est même limité pour les Ocypodidae qui ferment leurs terriers pendant l'immersion afin de garder de l'air pour respirer et éviter l'effondrement du terrier (De la Iglesia et al., 1994).

2.4 Eléments d'écologie des crabes de mangrove

2.4.1 Distribution

La standardisation des données est difficile, ce qui est entre autre dû à la multitude de protocoles utilisés (Skov et al., 2002). Les études montrent une variabilité importante à petite échelle, soulignant l'hétérogénéité complexe de l'écosystème mangrove (Hartnoll et al., 2002). A grande échelle, Hartnoll et al. (2002) ont montré qu'il n'y a pas de variation en nombre d'individus sur un gradient longitudinal, mais que la biomasse totale des crabes augmente du nord au sud sur la côte est de l'Afrique, du Kenya à l'Afrique du sud. Ainsi, la biomasse est plus importante au niveau de l'équateur et diminue vers le pôle sud, en opposition avec la loi de Bergmann⁷ qui concerne les organismes endothermes. Au sein de ce même gradient, les auteurs observèrent également un changement au niveau de la communauté des crabes : les Ocypodidae sont dominants au niveau des tropiques, mais cette dominance diminue vers les pôles jusqu'à s'inverser en Afrique du sud. Ces différences de communautés impliquent des fonctionnements différents de l'écosystème, les deux familles ayant un rôle ingénieur légèrement différent (Figure 19).

A l'échelle d'une mangrove, les crabes de mangrove se distribuent en fonction des différents étages de végétation (Berry, 1963; Frusher et al., 1994; Hartnoll, 1975; Hartnoll et al., 2002; Macnae and Lalk, 1962; Sasekumar, 1974). Ainsi, les Grapsidae occupent davantage le haut de mangrove (faciès *Avicennia* et *Ceriops*) et les Ocypodidae la partie médiane (faciès *Ceriops* et *Rhizophora*) (Hartnoll et al., 2002). De nombreux facteurs environnementaux ont été étudiés pour justifier cette distribution : la disponibilité de la nourriture, les caractéristiques du sédiment, la disponibilité de l'eau interstitielle, la densité de la canopée, la hauteur de marée, les monticules de sédiments, la pénétrabilité du sol, ainsi que la température de la surface du sol (Nobbs and Blamires, 2016, 2015; Salgado-Kent and McGuinness, 2010). La granulométrie du sédiment est généralement considérée comme le facteur clé de la distribution des différentes espèces. Cependant, ce facteur à lui seul n'est pas suffisant pour expliquer la distribution. Par exemple, *N. meinerti* est uniquement présent sous la canopée, malgré sa préférence pour un substrat dur et sec (Micheli et al., 1991) alors que la préférence des Ocypodidae pour les zones

⁷ La règle de Bergmann est un concept en zoologie, qui prédit que les animaux endothermes auront tendance à avoir une masse corporelle plus importante dans les climats froids que ceux provenant d'une région chaude

ensoleillées et bien drainées (sèche à marée basse) est bien connue (Hartnoll, 1975; Koch et al., 2005; Litulo, 2005; Takeda et al., 1996). A Malamani, cette zonation sur un gradient est bien observable (Figure 20), tout comme la préférence des Ocypodidae pour les zones ensoleillées.

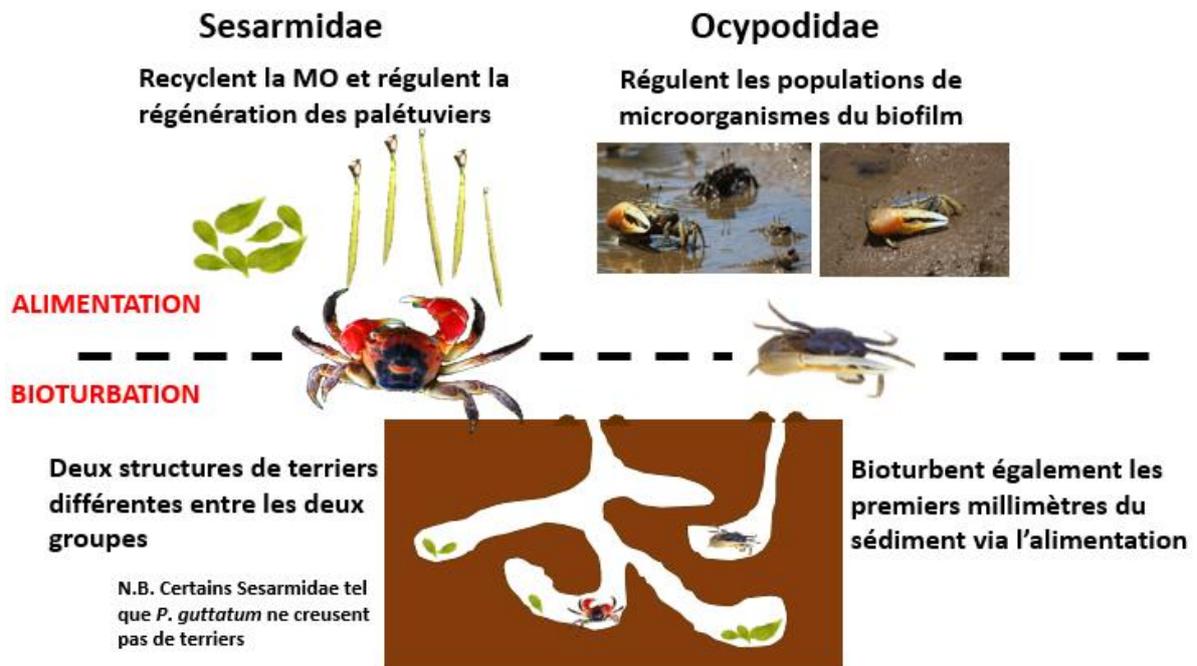


Figure 19 : Synthèse des différents rôles ingénieurs des Sesarmidae et Ocypodidae. MO (matière organique).

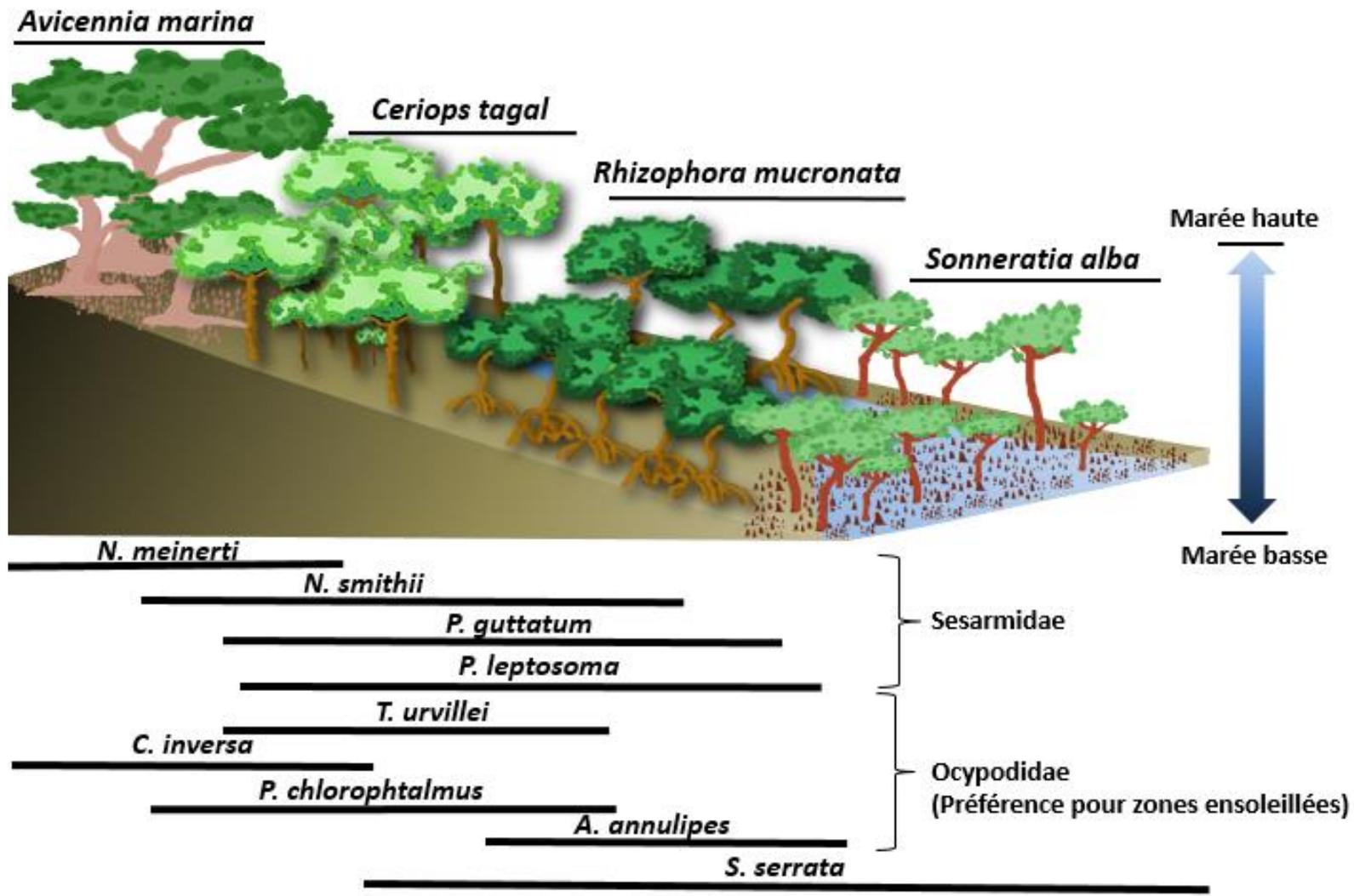


Figure 20 : Distribution des différentes espèces de crabe dans la mangrove de Malamani. D'après Hartnoll (1975) et les données de Bouchard et al. (2013), Herteman (2010) et des observations personnelles.

2.4.2 Prédateurs

Les prédateurs des crabes de mangrove sont principalement les poissons à marée haute (Wilson, 1989) et les oiseaux à marée basse (Boshe, 1982). Ainsi, Sheaves et Molony (2000) ont confirmé que plusieurs espèces telles que le mérrou Malabar *Epinephelus malabaricus* se nourrissent intensément de Sesarmidae adultes. Les larves et les juvéniles sont soumis à davantage de prédation, par les poissons également mais aussi les crabes adultes. Il existe ainsi une forte prédation intraspécifique (cannibalisme) et interspécifique (Kneib et al., 1999; Morgan, 1992; Ventura et al., 2008).

2.4.3 Comportement

Les crabes bioturbateurs vont partager leur temps entre l'alimentation, la reproduction et l'entretien du terrier (Nordhaus et al., 2009). Lorsqu'ils sont menacés, ils se réfugient rapidement au sein de leur terrier (Berti et al., 2008; Cannicci et al., 1999; Crane, 1975; Warren, 1990) et en ressortent après une durée variable selon l'espèce et les conditions environnementales (humidité,...). Quant à *P. guttatum* qui ne creuse pas de terrier, il fuit à vive allure dans 83 % des cas lorsqu'il est menacé et ré-émerge des crevasses dans lesquelles il se réfugie après environ deux minutes (Gillikin and Schubart, 2004; Hartnoll, 1975).

Les Ocypodidae bouchent l'entrée de leur terrier avant l'immersion par la marée montante (Crane, 1975; De la Iglesia et al., 1994; Fusi et al., 2015; Knopf, 1966), comme c'est le cas pour *T. urvillei* (Figure 21). Plusieurs raisons ont été avancées : la principale est qu'ils éviteraient l'immersion afin de garder de l'air pour respirer et éviter l'effondrement du terrier (De la Iglesia et al., 1994). En effet, ils rebouchent leur terrier systématiquement à marée haute en piégeant un bulle d'air dans leur terrier. Lors d'une expérience en mésocosme dans laquelle le cycle des marées a été modifié (12h :12h), *Austruca annulipes* et *Cranuca inversa* se sont rapidement adaptés et ont bouché leur terrier en rythme avec le cycle des marées (De la Iglesia et al., 1994). Certaines espèces de crabe violoniste telles que *Heloeccius cordiformis* bouchent également leurs terriers la nuit pour se protéger des prédateurs (Warren, 1990; Warren and Underwood, 1986). Ce comportement a également un rôle majeur au moment de la reproduction. Si des observations de copulations en surface existent pour quelques espèces, il semble qu'en règle générale la femelle choisisse le mâle et s'installe dans son terrier, avant que ce dernier le rebouche et féconde la femelle sous le sol (Christy and Salmon, 1984) ;

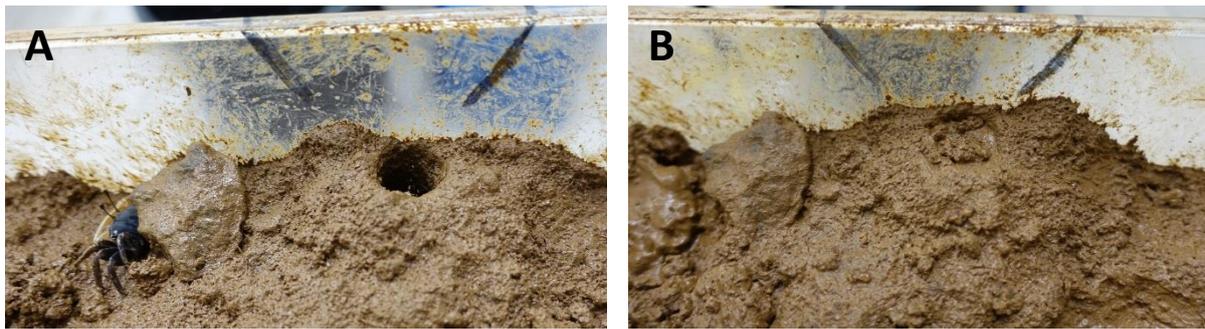


Figure 21 : Photographie d'un terrier de *T. urvillei* ouvert (A) et fermé (B)

Une autre particularité des Ocypodidae est l'utilisation de sa pince qui est surdimensionnée. En effet, il est aisé d'observer la forte dissymétrie entre ses deux pinces, l'une d'elle étant démesurée par rapport à l'autre. Cette pince est un organe sexuel qui a un rôle lors de la parade nuptiale pour séduire la femelle, qu'il agite frénétiquement pour former des cercles (Allen and



Figure 22 : Combat entre deux crabes violonistes (*T. urvillei*).

Levinton, 2014; Christy and Salmon, 1984; Yamaguchi, 2001) mais également dans d'importants combats (Figure 22) qui ont lieu pour la défense de leur territoire (Hyatt and Salmon, 1978; Wada, 1993). Cette agressivité est telle que le transport de ces crabes doit se faire dans des boîtes individuelles pour éviter tout risque de lésion, voire de mortalité.

2.4.4 Reproduction et développement

Les crabes de mangrove ont tous un cycle assez semblable et sont toujours inféodés au milieu marin par leur développement larvaire pélagique. Ils libèrent leurs larves pendant la nuit (Papadopoulos et al., 2002) lors des grandes marées avec un cycle d'approximativement 14 jours (Emmerson, 1994; Skov et al., 2005) afin qu'elles soient transportées vers les eaux océaniques qui assureront leur dispersion. Ils se reproduisent ainsi toute l'année, mais avec des pics pendant l'été (Emmerson, 1994). Au cours de leur vie océanique, les larves vont se

développer et passer par un nombre de stades zoé déterminé (2 à 5 selon l'espèce) ayant chacun une capacité différente de migration verticale dans la colonne d'eau.

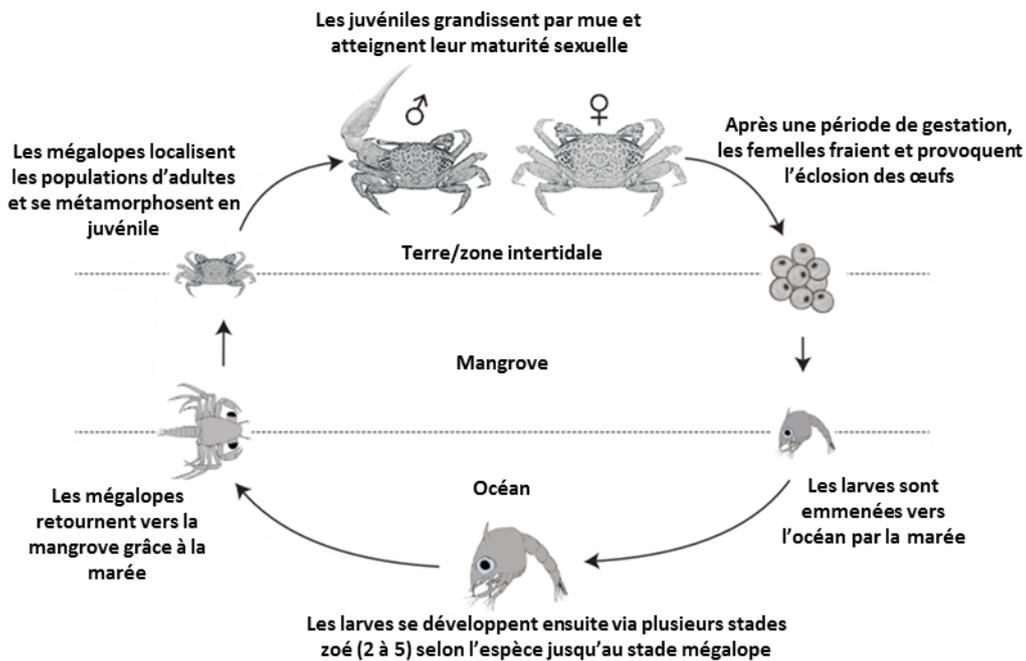


Figure 23 : Représentation du cycle de vie général des crabes de mangrove. Modifié d'après Peer et al. (2015).

Par exemple, le développement larvaire de *N. meinerti* (Figure 24) comprend 5 stades zoé et dure environ 25 jours. (Pereyra Lago, 1989). Ces migrations verticales vont permettre aux larves de suivre différents courants, de maintenir une certaine capacité à se guider dans les eaux océaniques (Queiroga and Blanton, 2005) et ainsi permettre de coloniser un habitat adéquat lors de leur dernier stade larvaire : le stade mégalope.

Lors de ce recrutement larvaire, les larves migrent vers la mangrove probablement guidée par des indices chimiques et physiques tels que la salinité (Brodie et al., 2005; Islam et al., 2002) et s'aident à nouveau des mouvements de marée (Tankersley and Forward, 1994). Dans la mangrove, les mégalopes flottent en surface pendant la marée haute et s'accrochent au sédiment avant la marée basse pour éviter de retourner vers l'océan. Elles se métamorphosent en juvénile lorsque 2 stimuli sont rassemblés : présence de sédiment et d'adultes (O'Connor, 1991). La localisation exacte du lieu de recrutement est toutefois flexible car leur stade adulte est mobile (O'Connor, 1993). Ils grandiront alors jusqu'à atteindre la maturité après plusieurs cycles de mues et le cycle pourra recommencer.

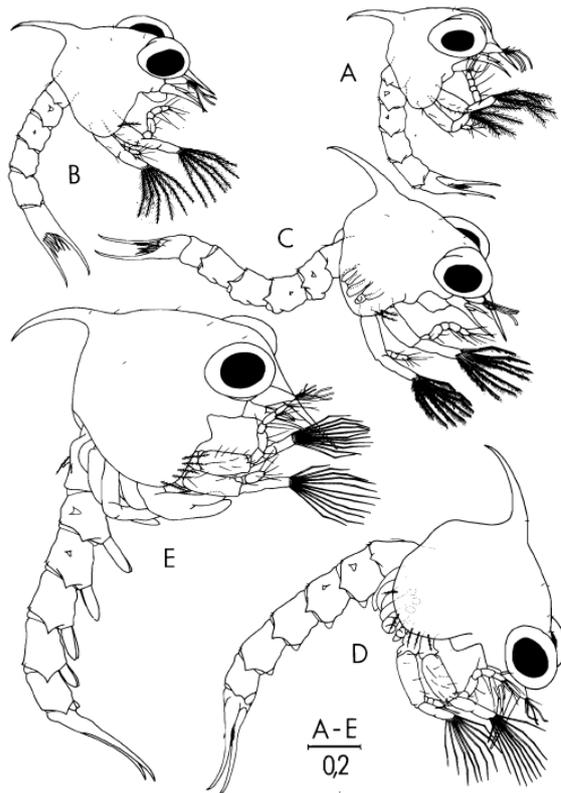


Figure 24 : Stades zoé de *Neosarmatium meinerti*. A, B, C, D, E : 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} stade zoé. Barre d'échelle : 0,2 mm. D'après Lago (1989).

Le crabe *N. meinerti*, qui habite la plus haute partie de la mangrove a une spécificité au niveau

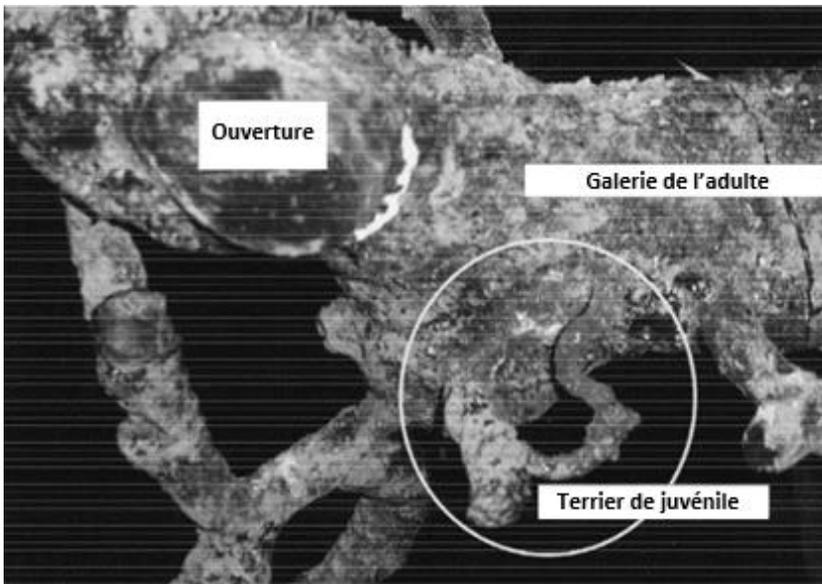


Figure 25 : Moulage d'un terrier de *N. meinerti* juvénile au sein d'une galerie adulte, modifié d'après Emmerson (2001).

du recrutement des juvéniles : ceux-ci creusent leur terrier dans le terrier d'un adulte (Figure 25), et bénéficient ainsi d'un refuge dans une zone qui n'est pas souvent inondée par la marée et où le sédiment peut être très solide (Emmerson, 2001). Ils bénéficient ainsi des feuilles stockées par les adultes, et d'un abri face à la prédation interspécifique par les adultes (Kneib et al., 1999).

2.5 Notions de physiologie des crabes de mangrove

2.5.1 Respiration

Tous les organismes aérobies ont besoin d'un accès à l'oxygène et doivent le transporter du milieu extérieur vers toutes leurs cellules tout en évacuant le dioxyde de carbone produit (Figure 26). Ces flux de gaz suivent par diffusion les gradients de pression partielle successifs de ces gaz chez les organismes les plus simples (par exemple unicellulaires) et/ou plus complexes (les organismes pluricellulaires). Ces derniers peuvent, par exemple, utiliser un système circulatoire et des pigments respiratoires qui fixent l'O₂ au niveau d'organes spécialisés dans les échanges gazeux : les branchies et les poumons. Ces organes disposent d'un épithélium fin permettant d'optimiser les échanges gazeux. L'efficacité de ces échanges dépend de plusieurs facteurs tels que la nature et l'épaisseur de l'épithélium, le débit d'eau (d'air) ventilé, les pressions partielles de part et d'autre de l'épithélium, le débit du système circulatoire et la capacitance du liquide interne (sang, hémolymphe,...). La capacitance varie selon la solubilité des gaz et de la présence de pigments respiratoires (Maina, 1998). Ces échanges peuvent être quantifiés par différentes équations dont la complexité dépend de l'espèce étudiée (Piiper, 1982).

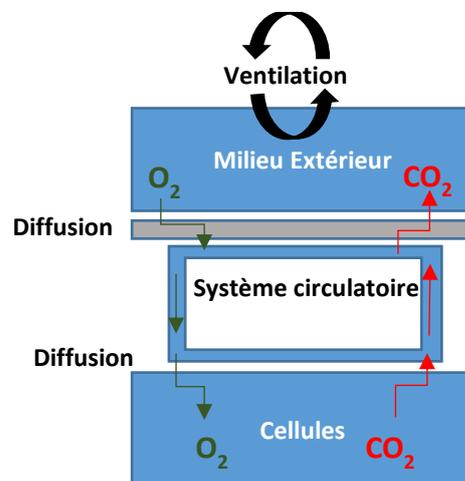


Figure 26 : Représentation schématique des principales étapes de la respiration. La barre grise représente l'épithélium respiratoire.

Pour maintenir la pression partielle en O₂ dans ses fluides en cas de diminution de la concentration extérieure ou en cas d'augmentation de la consommation des cellules (due à un stress par exemple), les animaux peuvent augmenter la ventilation de leurs organes respiratoires. Ainsi, des chémorécepteurs sensibles à l'oxygène ont été mis en évidence y compris chez les crustacés (Forgue et al., 1992; Massabuau et al., 1980; Taylor, 1982). En cas

de stress, la tolérance des organismes peut être prédite en utilisant des biomarqueurs énergétiques (Sokolova et al., 2012).

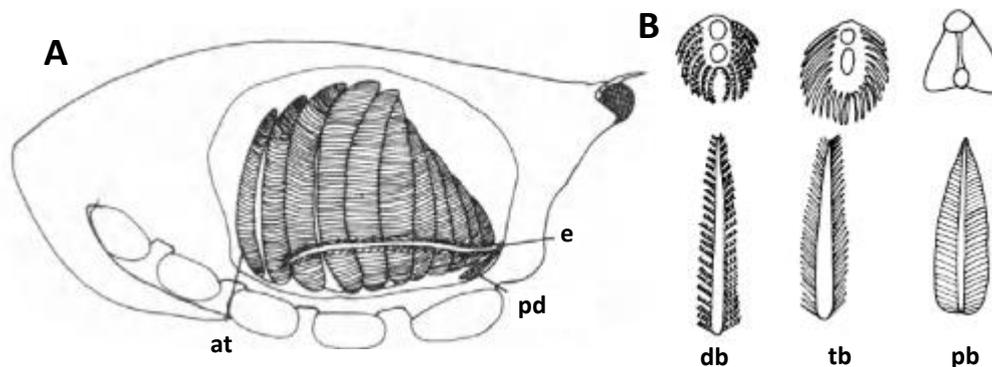


Figure 27 : Représentation de la cavité branchiale d'un décapode brachioure (A) et des principales structures branchiales (B) en coupe transversale (au-dessus) et en vue latérale (en dessous). (at) arthrobranchie, (pd) podobranchie, (e) épipodite, (dt) dendrobranchie, (tb) trichobranche, (pb) phyllobranchie. Modifié d'après McLaughlin (1983).

Chez les crustacés, les différents types de branchies sont classées en fonction de leur degré d'amplification de surface et de leurs structures (Charmantier et al., 2009; Freire et al., 2008). Ainsi, on trouve :

- les phyllobranchies (lamelles plates, larges comme des feuilles et disposées en deux rangées) se retrouvent chez les crustacés brachyours, les caridés et quelques anomours,
- les trichobranches (filaments branchiaux de forme tubulaire composé d'un axe central avec de nombreux filaments latéraux) sont présentent chez les écrevisses et les langoustes,
- les branchies de type dendrobranchies (lamelles ressemblant à des feuilles et divisées en fins filaments ramifiés) caractérisent les crevettes pénéides et les sergestoïdes (Freire et al., 2008).

Les branchies sont identifiées également en fonction de leur positionnement (Figure 28). Ainsi, les podobranchies sont attachées aux coxopodites et peuvent être liées aux seconds maxillipèdes (*Macrobrachium*, Pénéides), les arthrobranchies sont attachées à la membrane articulaire qui relie les appendices au thorax et, enfin, les pleurobranchies sont attachées aux pleurites (paroi latérale du thorax).

Chez les crabes de mangrove, le nombre de branchies (phyllobranchies) peut varier selon l'espèce. Elles sont constituées par des podobranchies, arthrobranchies et pleurobranchies

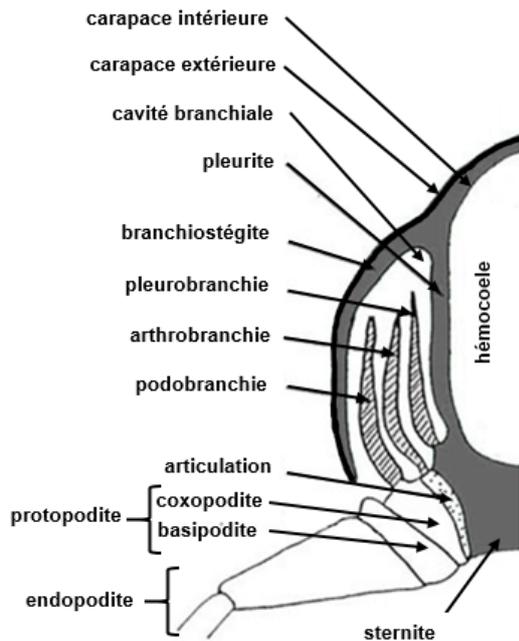


Figure 28 : Vue transversale au niveau de la cavité branchiale d'un crabe.

De plus, les caractéristiques de la zone intertidale ont imposé à la plupart des crabes de mangrove une respiration bimodale : ces animaux vivent à la fois dans l'eau et dans l'air. L'évolution de la respiration aérienne est un modèle pour comprendre les changements dans la structure et la fonction de l'organe respiratoire qui est l'un des organes majeurs des animaux. Le point culminant de ce processus étant l'émancipation des animaux terrestres. Cette évolution vers la respiration aérienne a été mise en place dans les milieux intertidaux du fait de l'importante dynamique des contraintes environnementales, dont principalement les épisodes anoxiques et les variations de températures.

2.5.2 Respiration bimodale

Plusieurs stratégies évolutives se sont développées chez les organismes bimodaux : certains vivent les premiers stades de leur développement dans l'eau avant de vivre dans l'air à l'âge adulte, alors que d'autres passent leur vie entière dans les deux milieux (Maina, 1998). Ces derniers ne descendent pas forcément du même ancêtre commun, certains respirent toujours avec des branchies alors que d'autres disposent d'un poumon développé. En effet, certains crabes capables de respirer dans l'air diffèrent des crabes aquatiques marins avec des modifications respiratoires bien développées qui sont essentielles pour l'adaptation terrestre (Morris, 2002). A l'échelle des branchies, les évolutions morphologiques résultent d'un compromis physiologique entre les échanges gazeux et la régulation des ions. Ainsi, les crabes à respiration aérienne ont un nombre réduit de branchies et de faible superficie permettant de limiter la perte en eau et l'effondrement des lamelles (Takeda et al., 1996; Taylor and Taylor, 1992). La présence d'organe respiratoire de type poumon est également une modification induite importante. Cette structure diffère selon les espèces, mais sa fonction est d'améliorer les échanges gazeux en milieu aérien (Maina, 1998; Maina and West, 2005; Taylor and Taylor, 1992) et de compenser la diminution des zones respiratoires des branchies. Cela implique également une plasticité physiologique pour la régulation des ions par les branchies. Les crabes devront ainsi adapter cette régulation avec des durées d'immersion et d'émersion variables

(Farrelly and Greenaway, 2005, 1994; Greenaway, 1984; Innes and Taylor, 1986; Santos et al., 1987). Ce poumon se situe principalement dans la cavité branchiale, est issu d'une adaptation morphologique du branchiostégite et/ou possède une origine cutanée. De plus, certains crabes de la famille des Dotillidae (super-famille des Ocypododiae) vivant dans des terriers sur les plages sableuses et respirant dans l'air (y compris pendant la marée haute en piégeant une bulle d'air dans le terrier) ont développé un poumon au niveau de leurs péréiopodes (Maitland, 1986).

Ainsi, les Grapsidae et Gecarcinidae qui sont adaptés à la vie terrestre, disposent d'un poumon souple et très vascularisé au niveau du revêtement de leur chambre branchiale et dont la complexité varie selon les espèces (Figure 29). La membrane respiratoire et sa cuticule sont extrêmement fines (200-350 nm), et les vaisseaux sanguins sont formés à partir de cellules du tissu conjonctif, de fibres de collagènes et d'une lame basale. Ces vaisseaux perdent leur tissu connectif au niveau de la membrane respiratoire, formant de fines lacunes juste sous l'épithélium respiratoire. C'est au niveau de ces lacunes qu'auront lieu les échanges gazeux. Ces structures sont entourées de cellules spécialisées qui peuvent porter de nombreuses microvillosités sur leur surface apicale, ou au contraire être très lisses. Les vaisseaux s'organisent en veine pulmonaire qui est directement reliée au sinus péricardique (Figure 30). Chez certaines espèces, les vaisseaux peuvent s'organiser en plusieurs systèmes portes⁸ qui permettent d'augmenter la surface d'échange et donc l'efficacité du poumon pour la respiration aérienne (Farrelly and Greenaway, 1994).

⁸ Partie de système circulatoire qui relie deux réseaux capillaires de même type (veineux/veineux ou artériel/artériel).

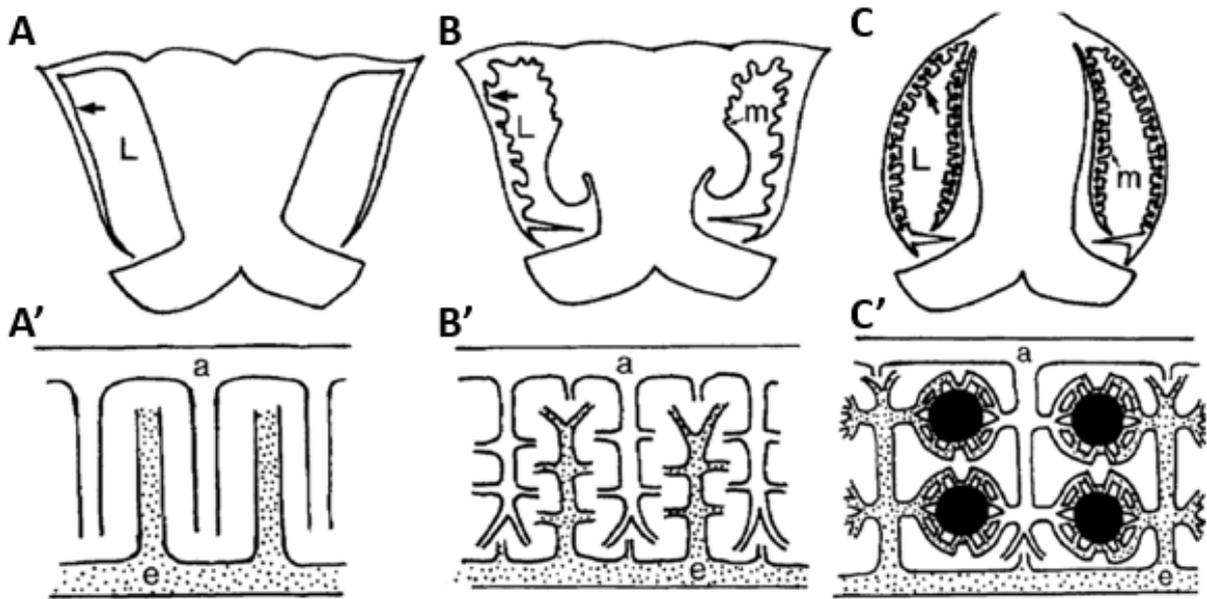


Figure 29 : Représentation schématique des différentes adaptations à la respiration aérienne chez les crabes à poumons lisses (A), à poumon évaginé (B) et invaginé (C). La première ligne représente une coupe transversale à travers la cavité branchiale et la deuxième la circulation de l'hémolymphe depuis le vaisseau afférent (a) puis dans les lacunes et ensuite le vaisseau efférent (e). Lumière du poumon (L), Membrane accessoire vascularisée (m), le point noir de C' représente un sac aérien. D'après Farrelly et Greenaway (1993).

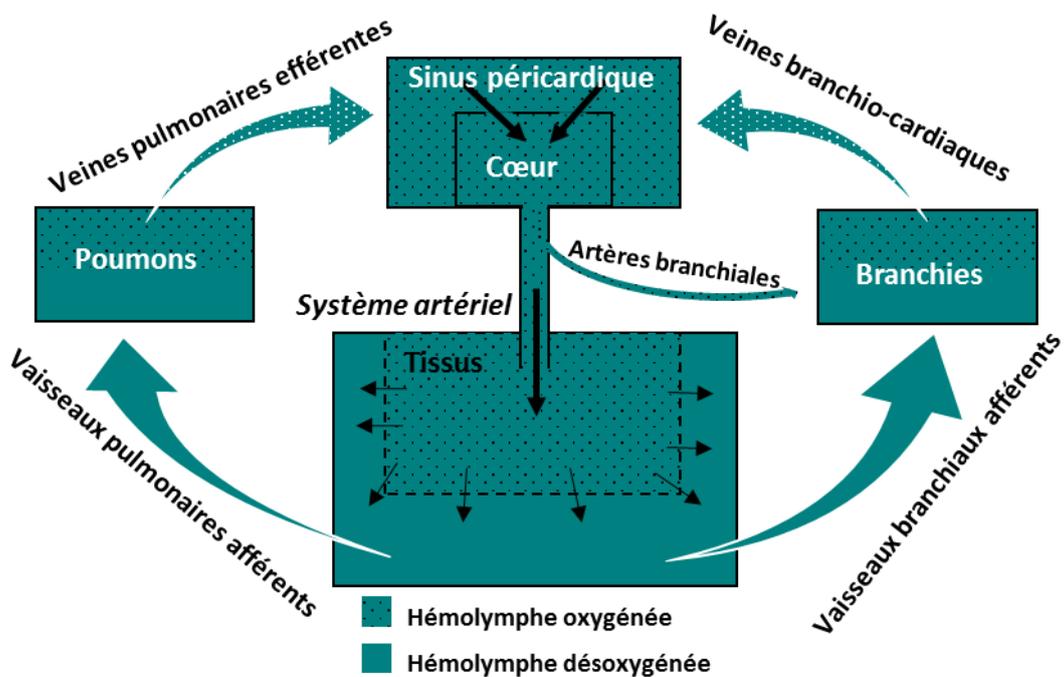


Figure 30 : Schéma de la circulation de l'hémolymphe chez un crabe bimodal modifié d'après Taylor et Greenaway (1984)

Les différentes adaptations sont très variées et des groupes très proches peuvent montrer de grandes différences. Par exemple, le crabe violoniste *Gelasimus vocans* (Ocypodidae, super-famille des Ocypodoidae) possède un branchiostégite transformé en poumon lisse (Figure 32) (Paoli et al., 2015) alors que le crabe de plage *Mictyris longicarpus* (Mictyridae, super-famille des Ocypodoidae) a développé un poumon relativement complexe (Figure 32) pour respirer en milieu aérien (Farrelly and Greenaway, 1987, 1992a).

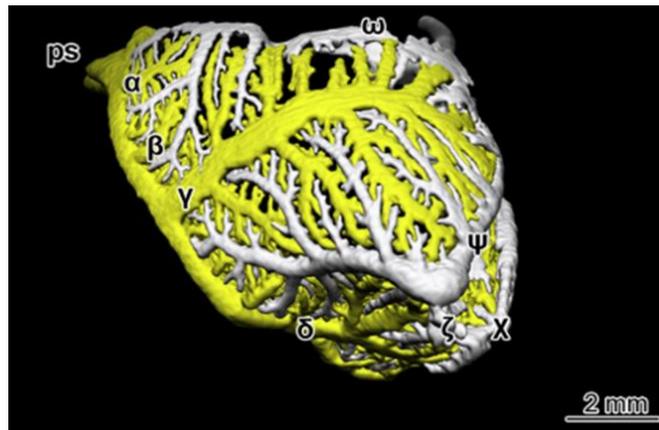


Figure 31 : Reconstruction 3D du poumon branchiostégite de *Gelasimus vocans* en vue dorsale. Les sinus efférents sont en jaune et les afférents en blanc. D'après Paoli et al. (2015).

Il est intéressant de noter que toutes les larves de décapodes disposent d'un branchiostégite vascularisé qui ramène l'hémolymphe directement au cœur, les branchies se développant secondairement. La complexité du poumon n'est pas directement liée au degré de terrestrialisation des crabes. En effet, d'autres espèces beaucoup plus terrestres que *Mictyris longicarpus* ont des poumons relativement simples. Cette complexité pourrait être liée à la taille du corps et au style de vie particulier adopté par *M. longicarpus* qui est petit et globulaire. A noter également que la structure du poumon de *M. longicarpus* montre quelques similitudes avec celle d'*Ocypode cordimanus* (le crabe fantôme commun).

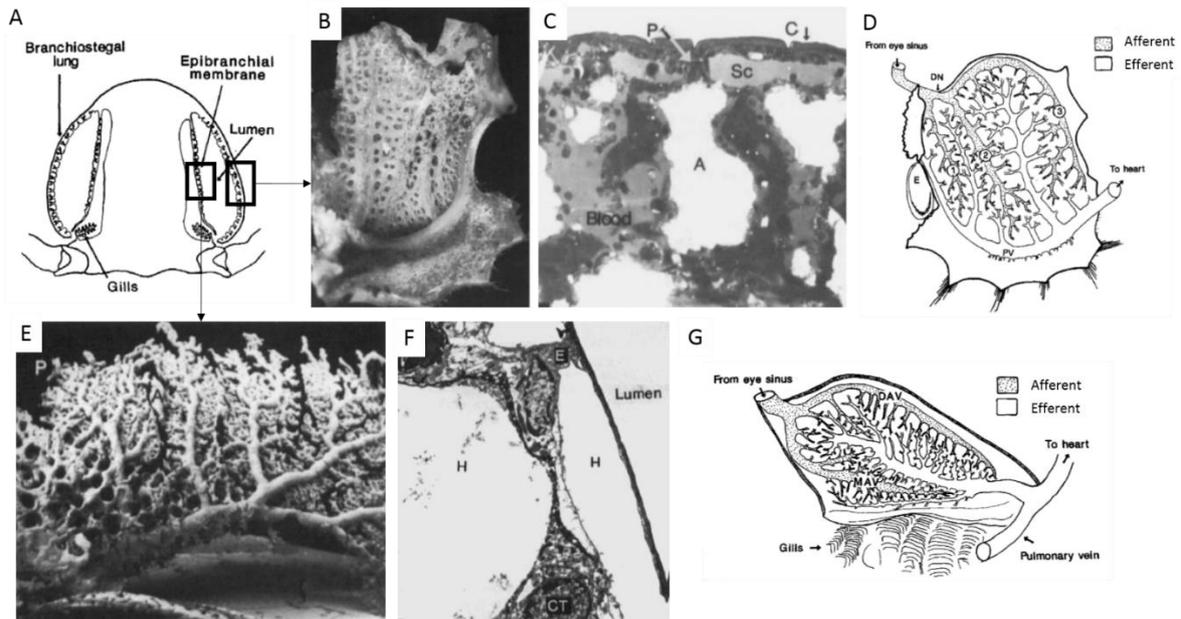


Figure 32 : Représentation des adaptations à la respiration bimodale chez *Mictyris longicarpus*. (A) Schéma d'une section verticale de la chambre branchiale montrant sa division en 2 parties par la membrane épibranchiale. Le branchiostégite (vu du côté du lumen, B) est un faux poumon vascularisé (schéma, D) dont le sinus sous la carapace comprend de nombreux sacs aériens (C). La membrane épibranchiale (E) est également un faux poumon vascularisé (schéma, G) dont les cellules épithéliales (F) forment des jonctions avec les cellules du tissu conjonctif formant la structure permettant les échanges gazeux (F). Photo C : sac aérien (A), cuticule externe (C), cellule pilier (P), sinus sous-cutané (Sc). Schéma D : épipodite (E), veine pulmonaire (PV), vaisseaux afférent verticaux (1 et 2), vaisseau afférent dorsal (3), encoche dorsale (DN). Photo E : partie postérieure du système afférent (P), partie de vaisseau afférent (A). Photo F : cellule de l'épiderme (E), cellule du tissu conjonctif (CT), hémocoèle (H). Schéma G : vaisseau afférent dorsal (DAV), vaisseau afférent médian (MAV). D'après Farrelly et Greenaway (1987).

L'émergence de nouveaux modes respiratoires pour augmenter les capacités d'oxygénation permet une amélioration de la tolérance thermique et une meilleure efficacité vis-à-vis de la distribution en oxygène pour les tissus (Fusi et al., 2015). Ainsi, l'optimisation de la tolérance à la chaleur est considérée comme une cause immédiate de l'évolution récurrente et indépendante des espèces respirant l'air à partir d'ancêtres respirant dans l'eau (Figure 33).

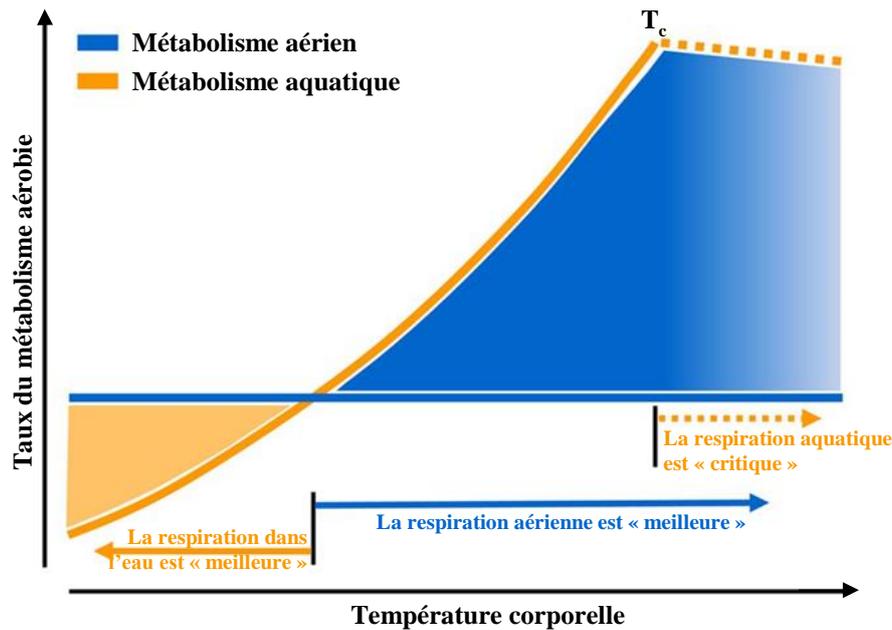


Figure 33 : Concept de la relation entre le métabolisme aérobie et la température chez les organismes bimodaux : constant dans l'air (ligne bleue) mais croissant dans l'eau (orange). T_c : température critique. D'après Fusi et al. (2016b).

Le compromis entre respiration aérienne et aquatique peut mener certains crabes à ne plus pouvoir respirer dans l'eau. Par exemple, Fusi et al. (2015) ont montré que *T. urvillei* montre une plus grande différence entre ses pO_2 artérielle et veineuse lors de la respiration aérienne qu'aquatique, démontrant l'efficacité des échanges gazeux aériens dans la cavité branchiale qui sert de vrai poumon (Farrelly and Greenaway, 1992a, 1992b). Cette espèce entre en profonde hypoxie lorsqu'elle est maintenue immergée, ce qui démontre l'inefficacité de sa respiration aquatique (Fusi et al., 2015). Sa capacité à vivre dans la zone intertidale est néanmoins rendue possible grâce à son comportement qui lui permet de piéger une bulle d'air dans son terrier à marée haute (voir 2.4.3).

2.5.3 L'osmorégulation

2.5.3.1 Principes

La tolérance aux changements de salinité dans l'environnement aquatique varie selon les espèces de crustacés et tous les types de stratégies d'osmorégulation sont retrouvés chez les crustacés (Figure 34). Ainsi, les espèces euryhalines peuvent tolérer de grandes variations de salinité, tandis que d'autres sont intolérantes aux changements de salinité et sont dites sténohalines. Certains crustacés sont donc des osmoconformeurs sténohalins (espèces marines

uniquement), ils ne régulent donc pas leur osmolalité hémolympatique et ne tolèrent qu'une gamme réduite de salinité. D'autres espèces sont qualifiées de régulateurs sténohalins⁹ ou euryhalins¹⁰ (certaines espèces marines et toutes les espèces d'eau douce). Ainsi, une espèce vivant dans un environnement très stable sans fluctuation de salinité (ex : écrevisses en eau douce) ne subit aucun changement de salinité dans la nature mais il a été démontré qu'elles peuvent tolérer des changements de salinité (jusqu'à 50 % d'eau de mer) dans des conditions expérimentales. Les crevettes d'eau douce du genre *Macrobrachium*, comme les écrevisses, maintiennent des osmolalités hémolympatiques très élevées dans l'eau douce et tolèrent toute une gamme de salinités.

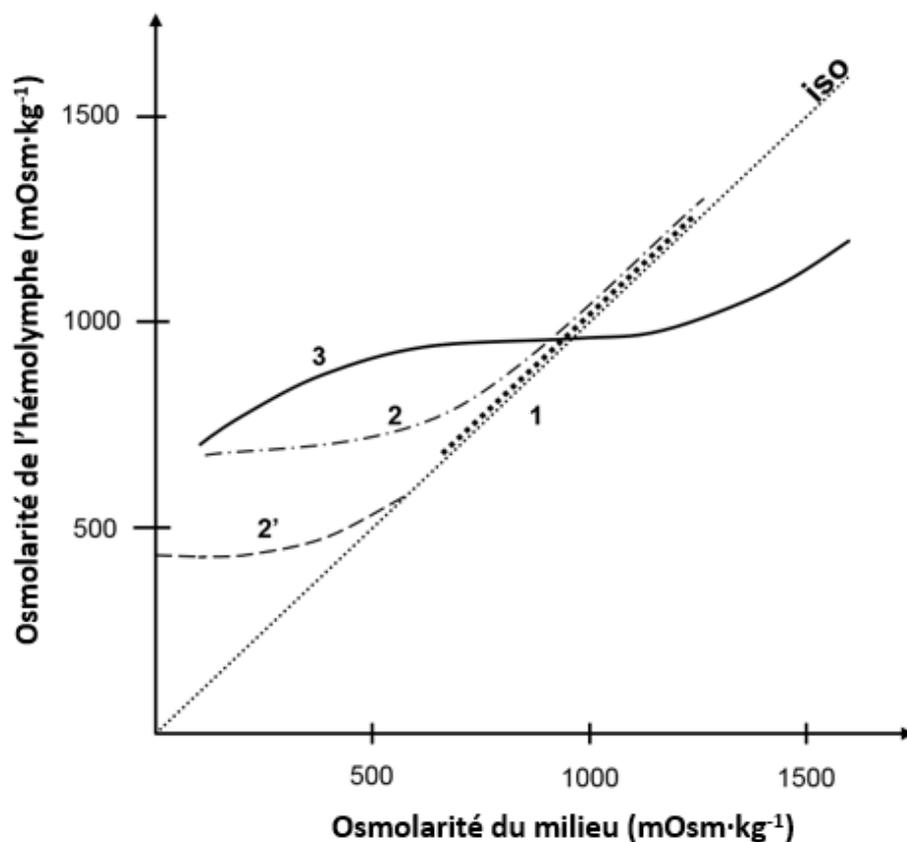


Figure 34 : Courbes d'osmorégulation : évolution de l'osmolalité de l'hémolymphe en fonction de l'osmolalité du milieu environnant. Les organismes peuvent être osmoconformeurs (1), hyper-iso-osmorégulateurs (2), hyper-iso-osmorégulateurs en eau douce (2') ou hyper-hypo-osmorégulateurs (3). Iso : ligne d'isosmoticité. D'après Lignot et Charmantier (2015). L'intersection entre la courbe d'osmorégulation et la ligne d'isosmoticité est appelé point isosmotique.

⁹ Espèces qui ont une tolérance étroite aux variations de salinité.

¹⁰ Espèces capables de supporter de grandes variations de la salinité.

Ce sont donc des colonisateurs récents de l'habitat d'eau douce, si on les compare avec les autres crustacés d'eau douce qui s'y sont adaptés depuis plus longtemps et qui présentent des osmolalités hémolympatiques plus faibles (Ordiano et al., 2005). Chez les osmoconformeurs, le liquide intracellulaire est isosmotique avec le liquide extracellulaire. Ceci restreint la répartition des individus aux milieux aquatiques ne présentant pas de variations dans leur composition ionique. Bien que le volume cellulaire (équilibre hydrique) soit facilement maintenu dans cette situation, l'homéostasie ionique intracellulaire nécessite toujours des ajustements fins réalisés par des effecteurs osmotiques intracellulaires (ex : synthèse *de novo* et dégradation des acides aminés libres et des composés phosphoriques) afin de conserver des gradients osmotiques les plus faibles possibles à la surface de la membrane cellulaire (Coelho de Faria et al., 2011; Florkin, 1960; Lang et al., 1998; Pequeux, 1995; Schoffeniels and Gilles, 1970; Wehner et al., 2003). Ce type de régulation est relativement lent et donc inefficace lorsque des changements rapides de salinité se produisent. Cela peut être considéré comme un trait ancestral (Anger, 2001). Chez certains crustacés euryhalins, la concentration intracellulaire de ces acides aminés libres peut être 10 fois plus élevée que celle observée chez les mammifères (Gilles and Delpire, 1997). L'osmoconformité est généralement le résultat d'une perméabilité élevée pour les ions monovalents et l'eau du tégument (cuticule et épithélium sous-jacent) induisant ainsi un influx ou un écoulement passif total d'ions et d'eau et un manque de sélectivité ionique. Certaines espèces peuvent inversement passer d'osmoconformeur à osmorégulateur en fonction de la salinité du milieu environnant et du moment de l'exposition.

Les crustacés osmorégulateurs maintiennent leur osmolalité hémolympatique avec des variations réduites quelle que soit la salinité du milieu environnant. Cette régulation extracellulaire anisosmotique¹¹ est basée sur plusieurs mécanismes impliquant diverses propriétés de perméabilité et de transport des solutés dans différents épithéliums transportant des ions. Ces épithéliums se retrouvent selon les espèces au niveau des branchies, des épipodites, du branchiostégite ou insérés au niveau d'autres organes externes à la cavité branchiale comme par exemple chez les copépodes (Lignot and Charmantier, 2015). Ainsi, en eau de mer diluée, ces crustacés osmorégulateurs maintiennent la concentration en solutés de leur hémolymphe à un niveau plus élevé que celui de leur environnement (hyper-osmorégulateurs). Ils minimisent ainsi l'afflux d'eau osmotique et la perte de sel par diffusion à travers les surfaces corporelles en réduisant la consommation d'eau, la perméabilité épithéliale ou la production d'urine. Certains de ces crustacés hyper-osmorégulent lorsqu'ils sont exposés

¹¹ Relatif à un équilibre osmotique avec des concentrations interne et externe différentes

à un environnement dilué, mais restent isosmotiques lorsqu'ils sont confrontés à des milieux fortement concentrés (hyper-iso-régulateurs «faibles» et «forts») (Cieluch et al., 2005; Péqueux and Gilles, 1978). Ils sont capables de maintenir leurs fluides extracellulaires hyper-osmotiques même en eau douce (ex : *Pseudothelphusa jouyi*, *Metapaulias depressus*, *Eriocheir sinensis* ou encore les écrevisses qui peuvent maintenir leur osmolalité de l'hémolymphe 3 à 400 fois plus élevée que leur environnement grâce à une grande capacité d'absorption des solutés dans les branchies et un faible coefficient de perméabilité du tégument). Les hyper-osmorégulateurs faibles comme le homard européen *Homarus gammarus* (Charmantier et al., 1984) sont également capables de faire face à un environnement hypo-osmotique mais seulement pendant un temps limité et ne sont pas capables de migrer vers l'eau douce (Felder, 1978). Enfin, les hyper-hypo-osmorégulateurs ont la capacité de maintenir leur fluide extracellulaire presque constant dans une large gamme de salinité allant de l'eau de mer concentrée (> 35 ppt) à l'eau douce (ex : *Armases roberti*, *A. ricordi*, *A. miersii*) (Schubart and Diesel, 1998). Les crabes terrestres sont également de très bons osmorégulateurs et peuvent faire face à la dessiccation. A leur retour en mer (par exemple pour la reproduction), ces animaux restent hypo-osmotiques par rapport à l'environnement marin.

Ces différentes stratégies d'osmorégulation nécessitent des mécanismes complexes impliquant différents organes avec une absorption active ou excrétion active d'ions, le transport d'eau et la régulation de la concentration en acides aminés intracellulaires. L'eau n'est pas transportée activement et peut passer directement par osmose à travers les membranes cellulaires suivant le gradient de concentration des ions. Ce transport d'eau est donc indirectement contrôlé par la réponse cellulaire aux changements de concentration ionique. Ces stratégies impliquent un système de pompes et de fuites des solutés grâce à des processus limitants et compensatoires (Pequeux, 1995). Les processus limitants sont principalement utilisés par les osmoconformeurs, agissant sur les propriétés de perméabilité de la membrane cellulaire afin de minimiser les mouvements diffusifs des effecteurs osmotiques (Schoffeniels and Gilles, 1970). Par contre, les processus compensatoires sont principalement utilisés par les régulateurs et impliquent des mouvements actifs de solutés afin de compenser les flux diffusifs. Les demandes métaboliques associées à ce type d'osmorégulation ont un impact direct sur le système vasculaire cardiaque, le taux d'absorption d'oxygène et la synthèse des protéines (Intanai et al., 2009; McGaw and Reiber, 1998; Taylor et al., 1977). Par exemple, les homards exposés à une faible salinité augmentent leur métabolisme, leurs battements cardiaques et leurs taux de ventilation pour alimenter la pompe Na^+ , K^+ -ATPase, pompe nécessaire pour maintenir l'osmolalité

hémo-lymphatique plus élevée que celle du milieu environnant (Charmantier et al., 2001; Jury et al., 1994). De même, chez *Macrobrachium rosenbergii*, le changement de salinité a un effet direct sur la synthèse des protéines chez les juvéniles, mais pas chez les postlarves (Intanai et al., 2009). Le stress osmotique influence également la synthèse des lipides et l'activité gluconéogénique dans les branchies, les muscles et l'hépatopancréas (Martins et al., 2011; Oliveira and da Silva, 2000; Schein et al., 2005, 2004). Par exemple, les concentrations totales de lipides dans les branchies et les muscles du crabe *Neohelice granulata* (anciennement *Chasmagnathus granulata* ou *C. granulatus*) sont plus faibles chez les crabes exposés à un milieu hypo-osmotique (Luvizotto-Santos et al., 2003). Un stress hyper-osmotique induit également une diminution de la concentration totale des lipides dans les branchies postérieures, l'hépatopancréas et le muscle de cette espèce (Chittó et al., 2009). En outre, au cours du stress hypo-osmotique, l'activité de la PEPCK¹² hépatopancréatique de la crevette *Litopenaeus vannamei* (Rosas et al., 2001) et les activités PEPCK et G6Pase¹³ dans les branchies postérieures de *N. granulata* sont diminuées.

Ainsi, la salinité peut influencer le taux métabolique standard (SMR) de différentes façons : a) le SMR reste non affecté, b) le SMR est augmenté aux faibles salinités et/ou réduit aux fortes salinités, c) le SMR est augmenté à la fois aux faibles et fortes salinités, et enfin, d) le SMR est réduit aux faibles et fortes salinités (Kinne, 1966).

2.5.3.2 Les organes, tissus et cellules

Pour la plupart des crustacés décapodes, les branchies (pleurobranchies, arthrobranchies et podobranchies) sont les principaux organes d'échanges gazeux respiratoires et d'homéostasie du liquide extracellulaire (Charmantier et al., 2009; Freire et al., 2008; Gilles and Péqueux, 1985; Lignot and Charmantier, 2015; Mantel and Farmer, 1983; Pequeux, 1995; Péqueux et al., 1988). Dans les branchies, les sites osmorégulateurs peuvent coexister avec les cellules épithéliales pavimenteuses dont le rôle est respiratoire ou peuvent être restreints à des cellules localisées dans les branchies postérieures, comme cela a été observé chez plusieurs crabes estuariens (Charmantier et al., 2009; Copeland and Fitzjarrell, 1968; Neufeld et al., 1980). Chez certaines espèces, le rôle des branchies est restreint aux échanges gazeux, tandis que les épipodites et les branchiostégites participent à l'osmorégulation (ex : les homards). Si la diffusion des gaz s'opère à travers des cellules fines et peu différenciées, le transport d'ions par contre, nécessite des cellules plus spécialisées (Figure 35). Ces cellules appelées « ionocytes »

¹² phosphoenolpyruvate carboxylase

¹³ glucose-6-phosphatase

(ou « cellules riches en mitochondries », ou « cellules à chlorures ») possèdent des replis apicaux et des replis basolatéraux associés à de nombreuses mitochondries. Les ionocytes forment un épithélium monostratifié épais et peuvent être étroitement liés aux jonctions cloisonnés (desmosomes ou ‘septate junctions’ qui représentent l’équivalent des jonctions serrées chez les invertébrés) et à des dédoublements latéraux fournissant ainsi une régulation de la résistance structurelle et de la perméabilité à travers l'espace intercellulaire (Charmantier et al., 2009; Lignot and Charmantier, 2015).

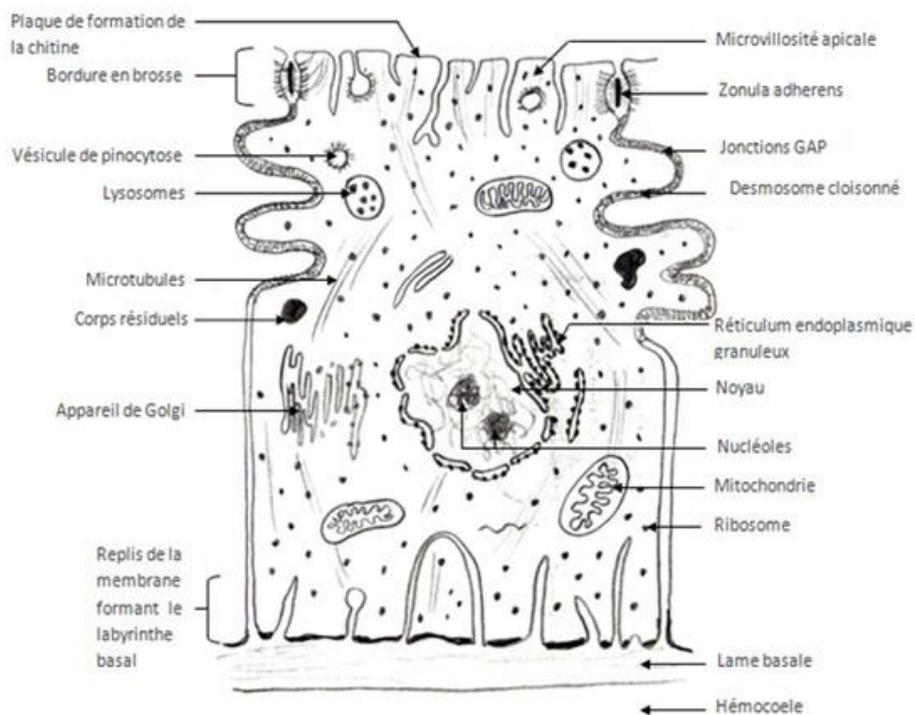


Figure 35 : Dessin d'observation d'une cellule épithéliale (d'après André Beaumont et Pierre Cassier, modifié).

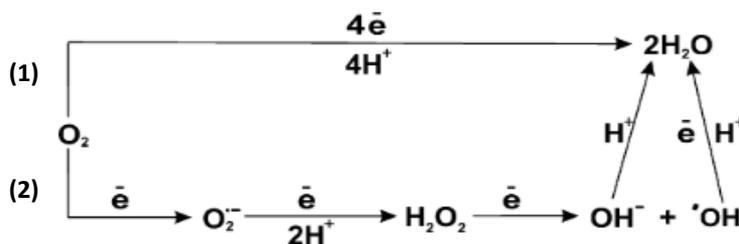
Des ionocytes et des zones perméables aux ions localisés sur d'autres surfaces corporelles que les branchies ont été décrits chez plusieurs espèces de crustacés. Certaines de ces structures sont situées au sein même de la cavité branchiale (au niveau des pleurites, de l'épithélium interne des branchiostégites et au niveau des épipodites) alors que d'autres ont aussi été décrites en dehors de ces chambres branchiales (Lignot and Charmantier, 2015).

2.5.4 Stress oxydatif

2.5.4.1 Les espèces réactives de l'oxygène (EROs)

Les EROs sont des espèces chimiques portant un nombre impair d'électrons sur leur couche périphérique (Sies, 1985; Zorov et al., 2014). Cette présence d'électrons de valence non appariés confère à ces molécules une grande réactivité et ainsi le potentiel d'oxyder ou de

réduire d'autres espèces chimiques afin de stabiliser leur orbite externe. Ils sont produits et transformés continuellement dans tous les organismes vivants par le métabolisme aérobie à différents niveaux dont principalement les mitochondries (complexe I et III) et le réticulum endoplasmique qui contient les cytochromes P-450 (Bedard and Krause, 2007; Lesser, 2006). Ainsi, 2 à 5 % de l'oxygène normalement réduit en H₂O (1) fait l'objet d'une réduction incomplète (Dawson et al., 1993) et produit différents EROs (Tableau 2) avant d'être finalement réduit via la réaction suivante (2) :



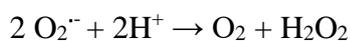
En condition normale, les EROs produits sont détoxifiés en H₂O par des systèmes de défenses (molécules et d'enzymes antioxydantes notamment) qui permettent d'atteindre un équilibre appelé la balance oxydative. Ces systèmes de défense sont constitués par des enzymes antioxydantes dont principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et des molécules antioxydantes telles que le glutathion (GSH forme réduite, GSSG forme oxydée) et les vitamines C et E.

Les EROs sont ainsi impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, principalement en tant que messagers secondaires dans la transduction de certains signaux (Schreck and Baeuerle, 1991) tels que l'apoptose (mort programmée des cellules) (Johnson et al., 1996).

2.5.4.1 Les défenses antioxydantes

Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines (elles contiennent un atome métallique : cuivre, zinc, manganèse, fer et/ou nickel dans leur site actif) ayant une activité enzymatique catalysant la dismutation des anions superoxydes (O₂^{•-}) en eau et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction suivante :



La quasi-totalité des organismes aérobies en possèdent. Chez les eucaryotes, les deux principales formes de SOD sont la SOD1 (CuZnSOD) et la SOD2 (MnSOD) contenant respectivement du cuivre-zinc et du manganèse dans leur site actif. La première se situe

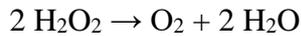
principalement dans le cytosol alors que la deuxième se situe dans les mitochondries (Cadenas, 1989). Les deux sont synthétisées à l'échelle cellulaire dans le cytosol en réponse à la présence de superoxyde mais la SOD2 est ensuite importée dans la matrice mitochondriale (Candas and Li, 2014).

Tableau 2: Principaux EROs et réactions

| Composé | Exemple de production | Réactions | Notes |
|--|--|--|--|
| Radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ | Réduction incomplète de l'oxygène dans 2 à 5 % (Dawson et al., 1993; Finkel and Holbrook, 2000) | $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ | Le plus abondant.
Très réactif. |
| Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 | Dismutation spontanée en milieu protoné ou catalysée par la superoxide dismutase | $2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ | Moins réactif que le superoxyde. |
| Radical hydroxyle OH^{\cdot} | Réaction de Fenton en présence de métaux de transition sous forme réduite (Biliński et al., 1985) | $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{\cdot}$ | Demi-vie : 11^{-10} s.
Très grande réactivité |
| Radical alkoxy RO^{\cdot} et peroxy RO_2^{\cdot} | Résultats de l'action oxydante du radical hydroxyle sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés (RH) : ils déclenchent des réactions radicalaires en chaîne dont la peroxydation lipidique | $RH + OH^{\cdot} \rightarrow R^{\cdot} + H_2O$
$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow RO_2^{\cdot}$
$RO_2^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$ | (Ayala et al., 2014) |
| Radical peroxinitrite | Le monoxyde d'azote est produit dans de nombreuses cellules (notamment nerveuses) et interagit avec le superoxyde à haute concentration | $NO^{\cdot} + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONO_2^{\cdot-}$ | Diffuse largement à travers les membranes (Beckman and Koppenol, 1996) |

La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme homotétramère constituée de 4 sous-unités protéiques comportant chacune un groupement héminique avec une molécule de Fe³⁺ liée au site actif. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et dioxygène selon la réaction suivante :



La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène mais aussi d'autres peroxydes organiques en utilisant principalement le glutathion réduit (GSH, §0) comme substrat. Il existe aussi des formes utilisant le cytochrome c et le NADH (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013). La GPX n'est pas spécifique du H₂O₂ mais du glutathion réduit qu'elle utilise via la réaction suivante :



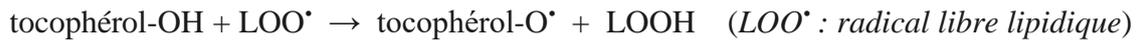
Le glutathion oxydé (GS-SG) est ensuite réduit par la glutathion réductase en utilisant le NADPH et un H⁺.

Les antioxydants non enzymatiques

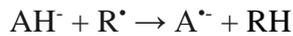
De nombreuses molécules non enzymatiques captent également les radicaux libres. La principale d'entre elles est le glutathion ainsi que l'acide L-ascorbique (vitamine C) et l' α -tocophérol (vitamine E).

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) comportant des groupements thiols (-SH) qui lui confère son pouvoir réducteur. C'est le thiol majoritaire dans les cellules eucaryotes sous forme réduite. En servant de substrat à la GPX ou même en chélatant les métaux de transition réduits tels que les ions cuivreux, il permet de limiter les réactions de Fenton qui génèrent le radical hydroxyl très réactif et nocif (Spear and Aust, 1995). Le glutathion joue donc un rôle dans la balance oxydative à deux niveaux : en fixant les radicaux libres et en participant à l'activité d'enzymes antioxydantes.

La vitamine E est l'antioxydant le plus efficace pour neutraliser les radicaux peroxydans la bicouche lipidique membranaire via la réaction ci-dessous, mais nécessitant l'action de la glutathion peroxydase pour neutraliser un produit final de cette réaction (un peroxyde lipidique LOOH) qui est également réactif (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013). La vitamine E est ensuite régénérée dans sa forme active par le glutathion ou la vitamine C (Niki et al., 1982).



La vitamine C est, quant à elle, un des plus puissants antioxydants hydrosolubles (Duarte and Lunec, 2005). Elle est capable de réagir directement sur plusieurs EROs sans catalyseurs enzymatiques tel que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou encore les radicaux peroxydes selon le schéma de réaction suivant :



AH[•] est l'ascorbate et A[•] est le radical libre d'ascorbate. Elle est aussi impliquée dans la régénération de la vitamine E et du glutathion oxydé. L'ascorbate est recyclé par des mécanismes chimiques et enzymatiques : via une réductase utilisant le NADH ou par dismutation de deux A[•] en une molécule d'ascorbate et une de déhydroascorbate lui-même pouvant être dégradé ou transformé à son tour en ascorbate par différentes enzymes.

2.5.4.2 Les dommages

Cependant, lors d'un stress induit par un facteur extérieur, cette balance peut être atteinte et il y a une surproduction d'EROs : on parle alors de stress oxydatif (Figure 36). Les variations en ROS et en antioxydants comme la catalase et la SOD qui sont en première ligne de défense, sont ainsi largement utilisées pour estimer le stress oxydatif (Rodrigues and Pardal, 2014). Ces facteurs sont nombreux : les polluants tels que les métaux, les hydrocarbures aromatiques, les pesticides, les dioxines, etc. (Lushchak, 2011) ou encore les variations de salinités (Freire et al., 2011; Paital and Chainy, 2012; Rivera-Ingraham et al., 2016a) et les rayonnements UV (Scharffetter-Kochanek et al., 1997). Lorsque cette balance est déséquilibrée, les EROs vont réagir de manière anormale avec différentes molécules biologiques et causer des dégâts oxydatifs aux lipides, à l'ADN et aux protéines principalement.

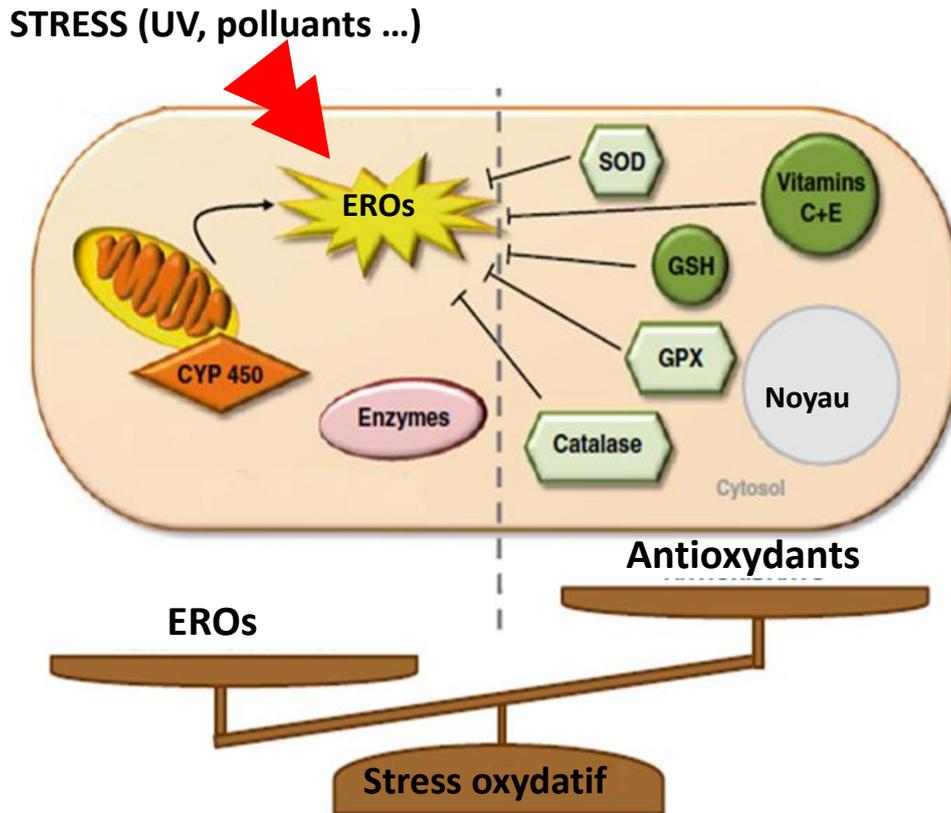


Figure 36 : Stress oxydatif dû à un déséquilibre entre la quantité d'EROs et les antioxydants. CYP450 cytochrome P450, SOD superoxyde dismutase, GSH glutathione, GPX glutathion peroxydase. Modifié d'après Roberts et al. (2015).

La peroxydation lipidique

Les EROs, dont principalement le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) et hydroperoxyl ($\text{HO}_2\cdot$), peuvent réagir directement avec les lipides et les endommager. Ils attaquent les lipides contenant une double liaison de carbone en retirant un atome d'hydrogène et en insérant un atome d'oxygène formant ainsi des radicaux peroxydes lipidiques et hydroperoxydes (Yin et al., 2011). Cette peroxydation se produit en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Figure 37). Au cours de l'initiation, une ERO réagit avec un lipide insaturé en retirant un hydrogène allylique ($-\text{R}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{R}$) qui devient alors instable (radical lipidique insaturé : L). Celui-ci tend à se stabiliser par un réarrangement moléculaire mais réagira rapidement avec l' O_2 pour former un radical peroxy lipidique qui va à son tour soustraire un atome d'hydrogène à un autre lipide insaturé en formant un hydroperoxide et un nouveau lipide instable (L) : c'est la propagation. Ce nouveau lipide instable réagira avec une molécule d' O_2 et continuera ainsi la boucle jusqu'à ce qu'un antioxydant donne un atome d'hydrogène au radical peroxy lipidique

: c'est la terminaison. Une grande variété de produits peut être formée de la sorte à partir d'acides gras insaturés mais les principaux sont les hydroperoxydes lipidiques LOOH. On citera ainsi les aldéhydes (dont le principal et le plus mutagène est le malondialdéhyde, MDA), le propanal, l'hexanal... dont la plupart sont toxiques et/ou mutagènes (Ayala et al., 2014). Le MDA est notamment utilisé depuis de nombreuses années comme marqueur approprié et pratique de la peroxydation lipidique (Pryor, 1989) grâce à sa stabilité et sa quantification aisée via sa réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (Lushchak, 2011).

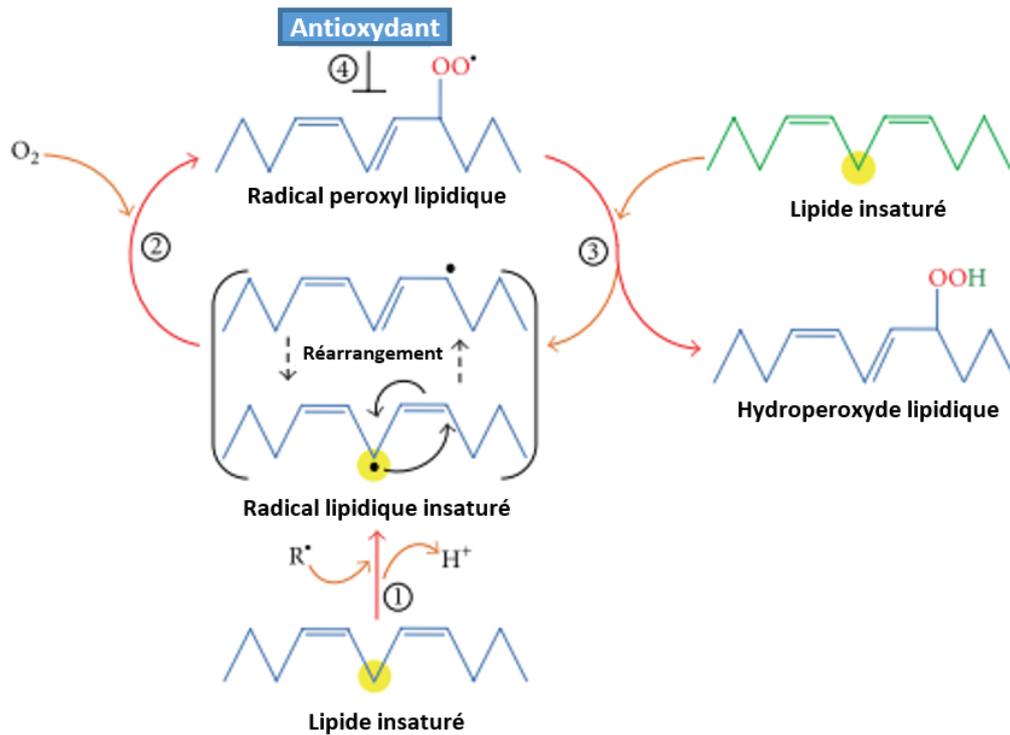


Figure 37 : Processus de la peroxydation lipidique : initiation (1), formation du radical peroxy lipidique (2), propagation (3) et terminaison (4). D'après Ayala et al. (2014).

Domages à l'ADN

Les ERO vont réagir de plusieurs manières avec l'ADN : par addition et par abstraction. Par exemple, le radical hydroxyl OH^* s'ajoute aux doubles liaisons des bases hétérocycliques de l'ADN ou retire un atome d'hydrogène d'un groupement méthyl du groupe des pyrimidines selon les réactions représentées par la Figure 38 (Evans et al., 2004). Les lésions induites à l'ADN vont ainsi causer des délétions, mutations et d'autres effets génétiques délétères (Lesser, 2006) pouvant conduire à l'apoptose (Simon et al., 2000). A l'équilibre, les cellules disposent d'enzymes réparant l'ADN, mais cette balance peut être déséquilibrée lors du stress oxydatif (Kryston et al., 2011).

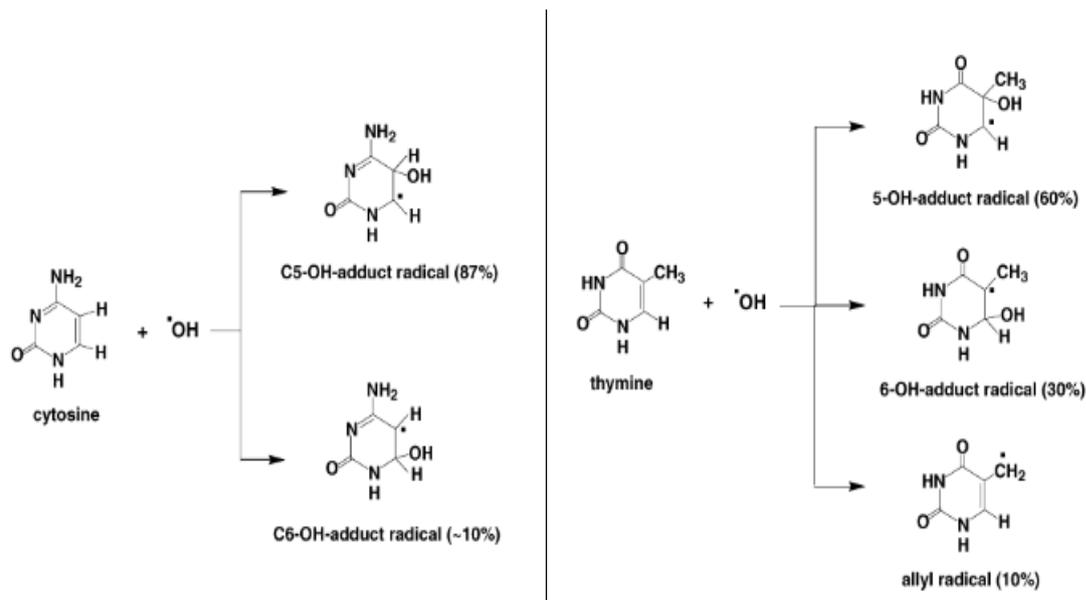


Figure 38 : Réactions du radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$ avec les bases pyrimidines. D'après Evans et al., 2004.

Les dommages aux protéines

Les EROs vont également oxyder les protéines de nombreuses manières : modifications d'acides aminés, fragmentation des chaînes peptidiques, agrégation de produits de réactions, altération des charges électriques, et, en agissant sur les mécanismes de dégradation et de renouvellement (Davies, 1987; Lesser, 2006). Ces modifications pourront rendre ces protéines inactives comme c'est le cas pour l'oxydation des centres Fe-S de certaines enzymes (Fucci et al., 1983). De plus, l'accumulation de ces protéines non fonctionnelles pourrait être une des causes dans les mécanismes du vieillissement (Dean et al., 1993).

2.6 Méthodologie déployée pour répondre aux objectifs de la thèse

2.6.1 Ecologie : suivi de la densité de terriers de crabe autour de la zone de rejet et de la salinité après rejet

Depuis mars 2015, des séries de 4 à 5 transects de 100 m sont répétées à marée basse au niveau et autour de la zone de rejet (environ 5000 m²) juste après l'épandage d'eaux usées. Sur chaque transect, des quadrats d'1 m² sont disposés sur le sédiment plat (drain) entre les buttes qui sont formées autour des racines et sont géoréférencés (Figure 39). Cette surface a été choisie car elle

représente la zone où les eaux usées s'écoulent et donc s'infiltrent dans le sédiment via les terriers de crabe (Figure 41).

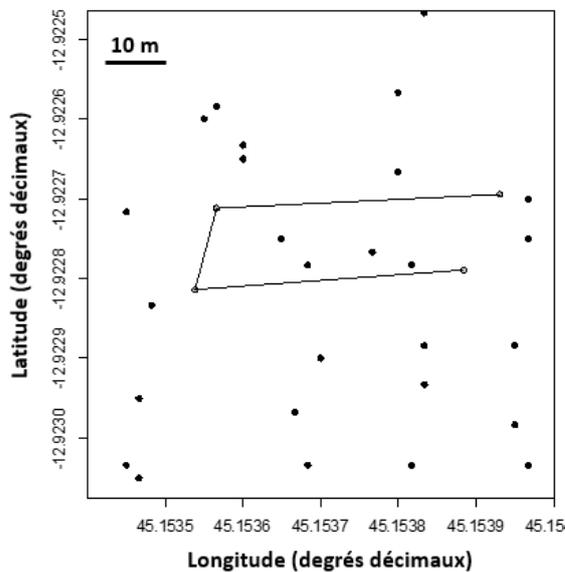


Figure 39 : Représentation de la localisation des quadrats de 4 transects dans la mangrove de Malamani (avant le changement de parcelle).



Figure 40 : Comptage du nombre de terriers de crabe dans un quadrat d'1 m²

Le nombre de terriers a été compté dans chaque quadrat (Figure 40) par le même observateur (Yann Mercky, technicien du CUFR) en utilisant la technique classique pour estimer la densité des crabes de mangrove (Kent and McGuinness, 2006; Mouton and Felder, 1996). Bien qu'elle présente des biais méthodologiques, cette technique reste la plus utilisée notamment car elle a un faible impact environnemental et elle prend en compte la population totale et pas seulement celle active au moment de l'observation (Schlacher et al., 2016). En même temps, un échantillon d'eau résiduelle a été collecté dans un terrier de chaque quadrat pour mesurer son osmolalité. Cette analyse a été effectuée le jour même dès le retour au laboratoire en utilisant un micro-osmomètre Advanced TM Micro-Osmometer, modèle 3300 (Advanced Instruments, Inc.). Ainsi, la réduction de la salinité autour de la zone de rejet est utilisée comme un proxy de la dispersion des eaux usées.

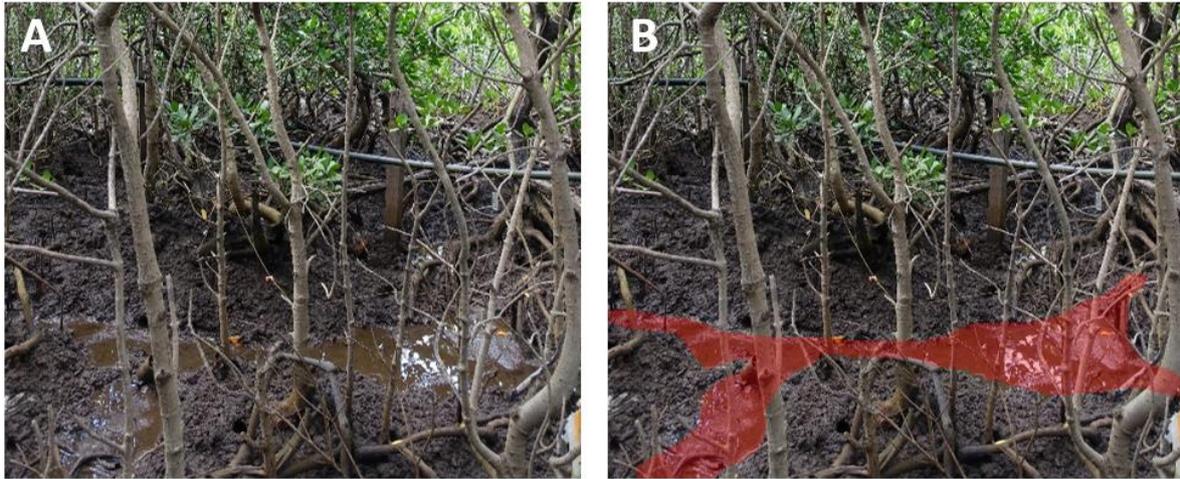


Figure 41 : Photographie de la zone de rejet montrant la complexité de la topographie du sédiment (A). Les eaux usées s'écoulent au niveau de drain (B, rouge) entre de nombreuses buttes.

Au total, 4 transects (5 à partir de 2016 suite au changement de la zone de rejet en septembre 2015) d'environ 80 m ont été réalisés à chaque prospection, ces transects comprenant chacun 8 quadrats espacés d'environ 10 m. Lors du changement de la zone de rejet début 2017, un cinquième transect a été ajouté en aval afin de mieux couvrir la zone d'écoulement. Ainsi, ces transects englobent la zone de rejet, la zone de résilience et l'amont et l'aval de ces zones.

Une interpolation linéaire par triangulation (Renka, 1996) a été réalisée sur les données de salinité et de terriers de crabe à l'aide du package « akima » du logiciel R. Les packages « rgdal », « raster », « sp », « mapdata » et « graphics » ont permis de manipuler les données géo-référencées sur le logiciel R afin d'obtenir cette interpolation. La projection utilisée pour Mayotte est UTM 38S du système géographique RGM04.

2.6.2 Collecte des individus et stabulation

Les crabes ont été capturés dans leur milieu naturel soit dans la mangrove de Malamani (Figure 42A), soit dans la mangrove d'Ironi Be (Figure 42B) et ramenés rapidement au CUFR (<1h). La capture des crabes se fait après un affût avec éventuellement présentation d'appâts (feuilles de palétuvier). Une fois que le crabe est attiré à l'extérieur de son terrier, celui-ci est obstrué à 10-20 cm en arrière de l'ouverture à l'aide d'un objet de type machette ou pelle de jardinage. Il est ensuite attrapé à la main et placé dans un seau. Dans le cas du crabe violoniste *Tubuca urvillei*, seuls les mâles sont récoltés car l'identification des femelles est difficile. En effet, elles

sont très semblables aux femelles d'autres espèces d'Ocypodidae présentes dans la mangrove (Peer et al., 2015). De plus, il a été nécessaire d'isoler les individus de *T. urvillei* collectés et de les transporter dans des boîtes individuelles afin d'éviter les blessures dues aux agressions entre individus (Crane, 1975). Quant à *Parasesarma guttatum*, étant donné qu'il n'occupe pas de terrier, la chasse se fait à vue et il est récupéré une fois qu'il s'est abrité dans une anfractuosité. Cette espèce a été la plus difficile à capturer.

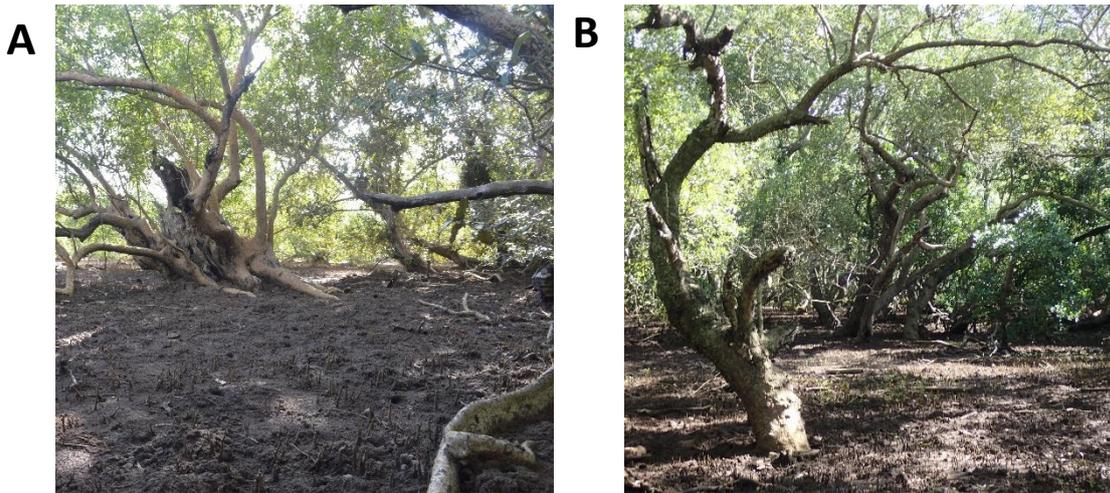


Figure 42 : Arrière mangrove de Malamani (A) et d'Ironi Be (B) à marée basse.

Une fois au CUFR (Figure 43A), les crabes sont placés en stabulation pendant 72h en eau de mer dans la salle d'élevage (Figure 43B et C). Dans cette salle, les crabes sont installés individuellement dans des boîtes en plastiques interconnectées (de 12 cm de long sur 8,5 cm de large et 5 cm de haut), remplies aux $\frac{3}{4}$ d'eau de mer aérée et filtré (33 ppt, $1050 \text{ mOsmol} \cdot \text{kg}^{-1}$). Pendant les 3 jours de stabulation, les crabes jeûnent et leurs fèces sont nettoyées deux fois par jour. Pour toutes les expériences, les crabes seront à jeun, pour une période maximale de 6 jours.



Figure 43 : Centre Universitaire de Mayotte, CUFR (A), salle d'élevage et circuits fermés recyclés avant les travaux de rénovations de juillet 2016 (B) et après (C).

2.6.3 Etude du stress osmotique

Afin d'étudier l'impact écotoxicologique des eaux usées sur les crabes de mangrove, il a d'abord été nécessaire d'analyser pour les espèces considérées, les différents métabolismes étudiés. En effet, les eaux usées exposent non seulement les individus à de nombreux polluants, mais aussi à un stress osmotique dû leur osmolalité qui est proche de l'eau douce. L'osmorégulation est donc un mécanisme clé qui a été ciblé dans notre étude. En effet, cette fonction physiologique est effectuée au niveau des branchies. Or, ces organes sont également la première voie d'entrée des éventuels polluants du fait de leur épithélium fin et de leur spécialisation dans les échanges ioniques. La première étape a donc consisté à décrire les mécanismes impliqués dans l'osmorégulation des trois espèces ciblées couplée à une analyse du stress oxydatif et du métabolisme énergétique des individus en eau douce, en eau de mer et en eau isosmotique (Figure 44).

Ainsi, des individus trois espèces de crabe étudiées ont été placées à des salinités allant d'un minimum de $5 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ jusqu'à $1600 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ pendant 96h pour établir la courbe d'osmorégulation. Cette durée, bien que ne permettant pas l'acclimatation physiologique complète des branchies (Lovett et al., 2006), est toutefois suffisante pour atteindre l'équilibre

au niveau de l'hémolymphe (Lovett et al., 2006). Dès lors, un temps de 7 jours d'exposition a été fixé pour les analyses des branchies en eau saumâtre (ES, 294 mOsm·kg⁻¹, 10 ppt) et en eau de mer (EDM, 980 mOsm·kg⁻¹, 33 ppt).

Cette première étape est cruciale afin de déterminer **comment et à quel niveau le stress osmotique peut impacter l'homéostasie des crabes.**

2.6.4 Effets écotoxicologiques des eaux usées

Après avoir décrit les mécanismes cités ci-dessus, l'effet des eaux usées sur l'osmorégulation, le stress oxydatif et le métabolisme énergétique ont été étudiés. Deux approches complémentaires ont été déployées, la première en laboratoire et la seconde *in situ*. La première approche permet de cibler les effets physiologiques des eaux usées dans un milieu contrôlé sans facteur extérieur alors que la deuxième analyse permet d'avoir une compréhension écotoxicologique plus pertinente mais moins spécifique. La première est également plus classique et facile à mettre en œuvre. Elle a permis l'étude de 3 espèces (*N. meinerti*, *T. urvillei* et *P. guttatum*). En effet, l'analyse sur une seule espèce n'est pas forcément représentative notamment par rapport à d'autres espèces plus vulnérables. Concernant la deuxième approche, cependant, celle-ci n'a pour le moment été appliquée qu'à *N. meinerti*.

Deux protocoles ont été mis en place selon l'espèce étudiée en laboratoire.

- 1) *N. meinerti* étant un très bon hyper-osmorégulateur, y compris en eau douce (aucune mortalité observée en eau douce), il fut acclimaté à ce milieu avant d'être exposé à eaux usées (eau douce polluée) (Figure 45A). Cette étape a permis d'évaluer l'effet induit par le cocktail de polluants présents dans les eaux usées domestiques sans à devoir prendre en compte un effet dû à un potentiel stress osmotique.
- 2) *T. urvillei* et *P. guttatum* ont été exposés directement aux eaux usées et à l'eau douce (Figure 45B), permettant ainsi d'analyser l'effet d'un stress osmotique (eau douce) et la combinaison 'stress osmotique - cocktail de polluants (eaux usées)'. Le protocole utilisé pour *N. meinerti* ne pouvait pas être utilisé sans induire une forte mortalité, particulièrement pour *T. urvillei* (50 % après 72h).

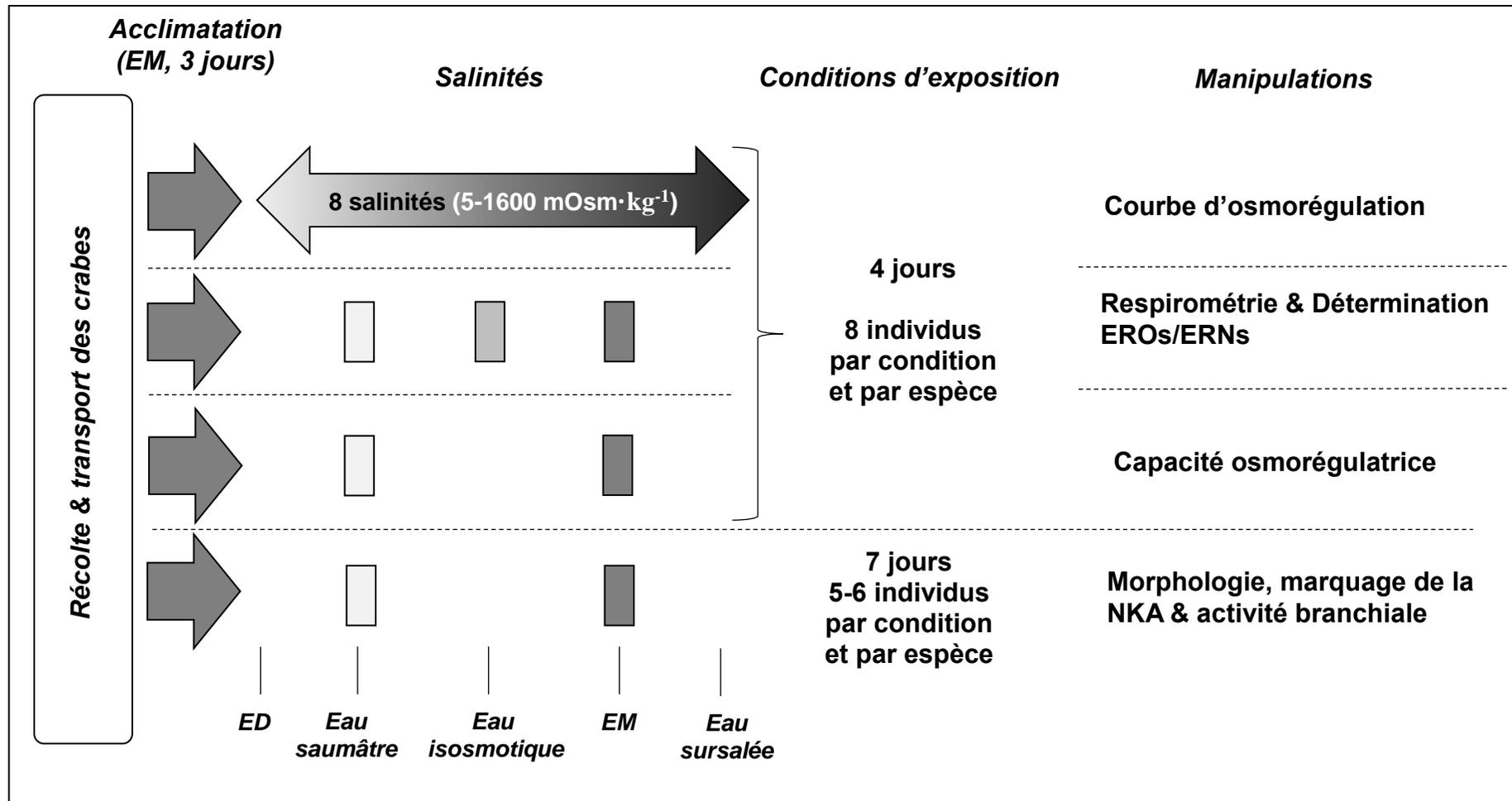


Figure 44 : Schéma des différents temps et milieux d'expositions ayant permis l'étude de l'osmorégulation chez *N. meinerti* et *T. urvillei*. L'eau isosmotique correspond à une eau dont l'osmolalité est égale à celle de l'hémolymphe (voir Figure 34, 750 et 820 mOsm·kg⁻¹ pour *N. meinerti* et *T. urvillei* respectivement). Eau de mer (EM), eau douce (ED), espèces réactives de l'oxygène (EROs), espèces réactives de l'azote (ERNs)

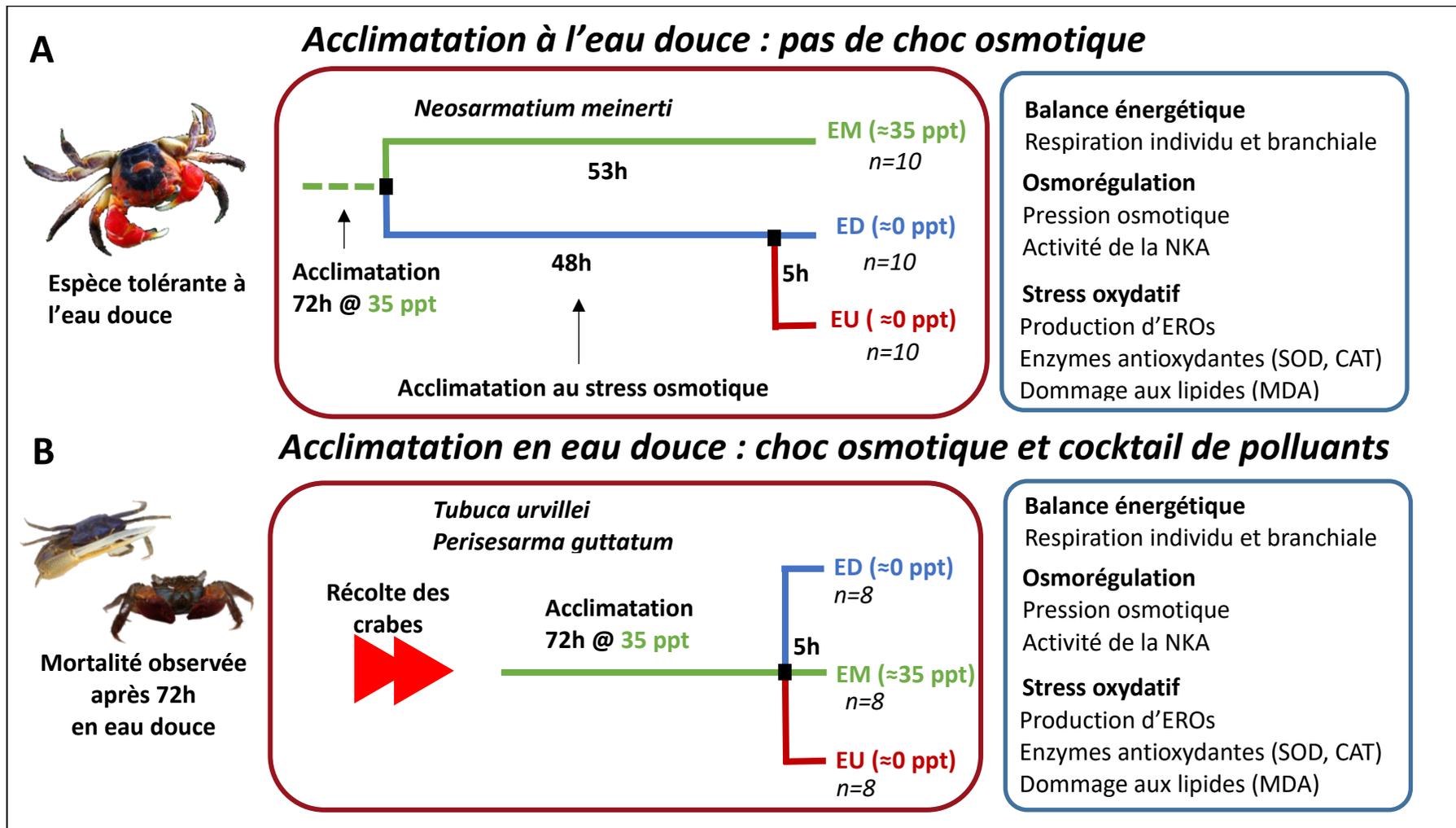


Figure 45 : Schéma expérimental des expositions aux eaux usées menées sur *N. meinerti* (A), *T. urvillei* et *P. guttatum* (B). Les encadrés rouges correspondent aux protocoles expérimentaux et les encadrés bleus correspondent aux paramètres physiologiques étudiés. Eau de mer (EM), eau douce (ED), eaux usées (EU).

Sur le terrain, des individus adultes de l'espèce *N. meinerti* ont été maintenus dans des terriers artificiels pendant 3 semaines dans une zone témoin et dans la zone de rejet. Ils ont donc été exposés aux conditions naturelles d'exposition aux eaux usées domestiques déversées en haut de mangrove (étage à *Ceriops tagal*). Ces animaux encagés n'ont pas eu la possibilité de se déplacer et ont dû subir les phases d'immersion et d'émersion. Le diamètre et la profondeur du terrier artificiel ont été adaptés au site d'exposition grâce aux paramètres (profondeur, diamètre, hauteur de la nappe, etc.) rapportés par Herteman (2010) pour les terriers de *N. meinerti* dans la même zone.

**Chapitre 3: Ecophysiologie de
l'osmorégulation des crabes de mangrove**

3.1 Introduction

Il a été nécessaire de décrire et d'estimer l'impact d'un stress osmotique sur la physiologie des crabes de mangrove avant même de pouvoir quantifier la toxicité des eaux usées sur leur physiologie. En effet, si les crabes de mangrove sont habitués à de fortes variations de salinité en fonction du rythme des marées et des précipitations, tous n'ont pas la même capacité osmorégulatrice du fait de différentes trajectoires évolutives et d'une occupation d'habitats différents (position à des étages différents dans la mangrove, et donc à des gammes de variations de salinité différentes).

De plus, l'adaptation des crabes à un mode de vie mixte entre le milieu aquatique et le milieu terrestre s'est faite à de multiples reprises au cours de l'évolution (Krieger et al., 2015; Schubart et al., 2000), via principalement des modifications structurales et morphologiques de leurs branchies (Pequeux, 1995) induisant donc des différences fonctionnelles entre des différentes familles de crabe. C'est notamment au niveau des branchies qu'un compromis entre osmorégulation et respiration a lieu (Maina, 1998). De plus, la transformation d'autres organes en faux poumon tels que le branchiostégite a permis de compenser la perte de la capacité respiratoire des branchies lors des phases d'émersion (Farrelly and Greenaway, 2005; Paoli et al., 2015). Chez les crabes osmorégulateurs, les branchies antérieures sont spécialisées dans la respiration : elles présentent un épithélium fin (2-4 μm), alors que les branchies postérieures sont spécialisées dans l'osmorégulation. En effet, ces branchies sont beaucoup plus épaisses (10-20 μm) et comportent davantage d'ionocytes, cellules spécialisées dans les échanges ioniques qui sont riches en mitochondries et en replis membranaires (Barra et al., 1983; Onken and McNamara, 2002; Pequeux, 1995; Takeda et al., 1996). La zonation des différentes espèces implique donc des degrés d'adaptation à la vie terrestre différents, avec des adaptations variables y compris au sein d'une même famille. Par exemple, la pompe à proton H^+ -ATPase d'*Austruca lactea* qui vit en haut et au milieu de la zone intertidale est cytoplasmique, alors qu'elle est apicale dans les branchies de *Xeruca formosensis* qui habite la limite supérieure de la zone intertidale (Tsai and Lin, 2007). Cette zonation implique également l'exposition à des variations de salinités différentes d'un étage à l'autre de la mangrove. Être capable de tolérer ces variations nécessite de mettre en place des mécanismes osmorégulateurs coûteux en énergie tels que le remodelage morphologique et ultrastructural des tissus osmorégulateurs (Compere et al., 1989; Pequeux, 1995). Ces changements et ces mécanismes requérant beaucoup d'énergie, ce sont les mitochondries qui permettent de fournir l'ATP nécessaire. Cependant, les

mitochondries sont également le lieu de production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs), qui peuvent causer de nombreux dommages cellulaires regroupés sous le nom de « stress oxydatif » (voir §2.5.4) lors de l'acclimatation à des variations de salinités (Freire et al., 2011; Paital and Chainy, 2012; Rivera-Ingraham et al., 2016a).

Des espèces représentatives des communautés les plus présentes dans la mangrove de Malamani ont été exposées à des salinités variables. Il s'agit de *Neosarmatium meinerti*, *Tubuca urvillei* et *Parasesarma guttatum*. Les deux premières espèces, qui ont une distribution bien marquée à deux étages différents (se chevauchant que partiellement dans le faciès à *Ceriops tagal*), ont fait l'objet d'une étude approfondie pour déterminer si cette différence d'occupation d'habitat et donc de salinité subie pouvait être reliée à des capacités osmorégulatrices différentes. En effet, *N. meinerti* occupe principalement des zones en arrière mangrove exposées à des eaux hypersalées pendant la saison sèche, et à de l'eau presque douce en saison humide (Hartnoll, 1975) ; alors que *T. urvillei* se retrouve principalement à côté de petits ruisseaux d'eau saumâtre en milieu/haut de mangrove (Figure 20). Cette étude est reprise par l'article ci-dessous (voir §3.2).

3.2 Salinity variation in a mangrove ecosystem: a physiological investigation to assess potential consequences of salinity disturbances on mangrove crabs

Salinity Variation in a Mangrove Ecosystem: A Physiological Investigation to Assess Potential Consequences of Salinity Disturbances on Mangrove Crabs

Dimitri Theuerkauff^{1,2}, Georgina A. Rivera-Ingraham¹, Jonathan A.C. Roques^{1,2}, Laurence Azzopardi^{1,2}, Marine Bertini¹, Mathilde Lejeune¹, Emilie Farcy¹, Jehan-Hervé Lignot^{1,*}, and Elliott Sucré^{1,2}

¹UMR MARBEC (University of Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD), Montpellier, France. E-mail: Dimitri.theuerkauff@umontpellier.fr (Theuerkauff); g.rivera-ingraham@gmail.com (Rivera-Ingraham); Jonathan.roques@bioenv.gu.se (Roques); Laurence.azzopardi@univ-mayotte.fr (Azzopardi); Marine.bertini@umontpellier.fr (Bertini); Emilie.farcy@umontpellier.fr (Farcy); Elliott.sucré@univ-mayotte.fr (Sucré)

²Centre Universitaire de Mayotte (CUFR), Route Nationale 3, BP 53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

(Received 14 December 2017; Accepted 21 June 2018; Published xx July 2018; Communicated by Benny K.K. Chan)

Citation: Theuerkauff D, Rivera-Ingraham GA, Roques JAC, Azzopardi L, Bertini M, Lejeune M, Farcy E, Lignot J, Sucré E. 2018. Salinity variation in a mangrove ecosystem: a physiological investigation to assess potential consequences of salinity disturbances on mangrove crabs. Zool Stud 57:36. doi:10.6620/ZS.2018.57-36.

Dimitri Theuerkauff, Georgina A. Rivera-Ingraham, Jonathan A.C. Roques, Laurence Azzopardi, Marine Bertini, Mathilde Lejeune, Emilie Farcy, Jehan-Hervé Lignot, and Elliott Sucré (2018) Salinity is one of the main environmental factors determining coastal species distribution. However, in the specific case of mangrove crabs, salinity selection cannot be understood through ecological approaches alone. Yet understanding this issue is crucial in the context of mangrove conservation, since this ecosystem is often used as biofilter of (low-salinity) wastewater. Crabs are keystone species in this mangrove ecosystem and are differentially affected by salinity. We hypothesize that crab salinity selection may be partly explained by specific salinity-induced physiological constraints associated with osmoregulation, energy and redox homeostasis. To test this, the response to salinity variation was analysed in two landward mangrove crabs: the fiddler crab *Tubuca urvillei*, which inhabits low-salinity areas of the mangrove, and the red mangrove crab *Neosamatum meinerti*, which lives in areas with higher salinity. Results confirm that both species are strong hypo-/hyper-osmoregulators that deal easily with large salinity variations. Such shifts in salinity do not induce changes in energy expenditure (measured as oxygen consumption) or in the production of reactive oxygen species. However, *T. urvillei* is physiologically suited to habitats with brackish water, since it presents i) high hemolymph osmolalities over a wider range of salinities and lower osmoregulatory capacity in seawater, ii) high Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) activity in the posterior osmoregulatory gills and iii) a thicker osmoregulatory epithelium along the posterior gill lamellae. Therefore, while environmental salinity alone cannot directly explain fiddler and red mangrove crab distributions, our data suggest that salinity selection is indeed influenced by specific physiological adjustments.

Key words: Bioenergetics, Osmoregulation, Salinity-induced oxidative stress, Mangrove, Decapods.

BACKGROUND

Mangroves are key ecosystems (Waycott

et al. 2011; Ellison 2015) that are decreasing at an alarming rate despite their ecological value (Giri et al. 2011). In tropical economies across

*Correspondence: E-mail: jehan-herve.lignot@umontpellier.fr
Dimitri Theuerkauff and Georgina A. Rivera-Ingraham contributed equally to this work.

the world, mangrove forests are often used as biofilters for domestic wastewater (Wong et al. 1997; Ouyang and Guo 2016 2018; Capdeville et al. 2018; Theuerkauff et al. 2018). This does not negatively impact the mangroves themselves, but their associated macrofauna is frequently affected. Among the latter, burrowing crabs are keystone mangrove species that play a critical role in the maintenance of mangrove forest health through their contribution to bioturbation and organic matter degradation (Smith III et al. 1991; Lee 1998). These processes are essential in a mangrove forest, ensuring matter cycling and the maintenance of sediment biochemical heterogeneity (Emmerson and McGwynne 1992; Kristensen 2008; Penha-Lopes et al. 2009). To understand crab distribution within mangroves, many studies have addressed the impact of environmental factors such as food availability, sediment characteristics, pore water availability, canopy density, site height, sediment mounds, soil penetrability and soil surface temperature (Bezerra et al. 2006; Salgado-Kent and McGuinness 2010; Nobbs and Blamires 2015 2016). However, salinity variation is usually a key parameter determining distribution in tropical estuaries, even for euryhaline species (Blaber 1997). Moreover, salinity changes and amplitudes are increased by domestic wastewater discharges and climate change (Alongi 2008; Gilman et al. 2008). In this sense, understanding variabilities in tolerance to salinity variation and the associated ecophysiological factors is a key factor in the protection of mangrove-associated macrofauna. This approach will contribute to mangrove forest conservation in the long term.

Much work has already been done on the effect of salinity variation on crab physiology, namely osmoregulation (Gilles et al. 1988; Anger and Charmantier 2000; Cieluch et al. 2004; Garçon et al. 2009; Lignot and Charmantier 2015). However, some authors suggest that mangrove crab distribution is not strongly linked to their physiological ability to tolerate salinity and that neither salinity tolerance nor osmoregulatory ability adequately explain the zonation patterns observed in the field (Frusher et al. 1994; Gillikin et al. 2004). The aim of this study is therefore to provide a more detailed description of this physiological approach with a bioenergetic perspective. This has already been suggested as a valid marker of invertebrate vulnerability to environmental stress (Sokolova et al. 2012) and identified as a means to ultimately evaluate if these physiological capacities are closely linked with crab habitats.

Exposure to salinity variation requires organisms to implement the necessary and energy-consuming mechanisms to counteract ion and water fluxes. Among other things, this involves significant functional, morphological and ultrastructural modifications of specialized osmoregulatory tissues and cells (Compere et al. 1989; Pequeux 1995). Mitochondria are the powerhouses of the cell and are responsible for fueling these processes. However, their activity also results in the production of reactive oxygen species (ROS) which, if uncontrolled, cause what is commonly known as “oxidative stress” - *i.e.* damage to proteins, lipids and/ or nucleic acids (Sies 1985) - and eventually lead to mutagenesis or even cell death. Exposure to salinity variations, as with many other biotic and abiotic stressors, may cause increased production of ROS. Therefore, salinity acclimation and its effects on the hydromineral balance, oxygen consumption rate and redox balance (at both the gill and animal levels) have attracted some attention in recent years, notably in crabs (Freire et al. 2011; Paital and Chainy 2012; Rivera-Ingraham et al. 2016a) and other intertidal invertebrates (Rivera-Ingraham et al. 2016b).

From a physiological perspective, we investigated the tolerance of two mangrove crab species to salinity variation in Mayotte, one of the main islands of the Comoros archipelago (Mozambique Channel) where 1.8% (703 ha) of the land surface is covered by mangrove forests (Jeanson et al. 2014). The study focuses on two dominant species with bimodal breathing capacities, both distributed in the upper part of the mangrove but in slightly different areas. This determines their exposure to significantly different environmental conditions, notably in terms of salinity variation. We considered the red mangrove crab *Neosarmatium meinerti* (Sesarmidae, de Man, 1887), which is most frequently found in areas exposed to drastic salinity variations ranging from hypersaline conditions (during low tide and the dry season) to freshwater (derived from upstream run-offs during the rainy season). The second species studied is the fiddler crab *Tubuca urvillei* (Ocypodidae, H Milne Edwards, 1852), which more frequently colonizes open areas surrounding freshwater streams. Unlike *N. meinerti*, *T. urvillei* uses a burrow-plugging behavior at high tide (a common behavior in other fiddler crabs) to avoid full immersion and hypoxemia (Fusi et al. 2015). By studying these two species with different habitat use within the mangrove forest, we demonstrate

that the physiological response to salinity variation (in terms of osmoregulation, associated bioenergetics and redox homeostasis) partly explains their distribution.

MATERIALS AND METHODS

Study site, animal collection and maintenance

Neosarmatium meinerti and *Tubuca urvillei* were collected during the rainy season from the Malamani mangrove (Chirongui bay, Mayotte, 12°55'1"S, 45°9'23") in the Comoros archipelago (Fig. 1A). *Neosarmatium meinerti* were collected in the upper part of the mangrove that is composed of spurred (*Cerriops tagal*) and white (or grey) mangrove trees (*Avicennia marina*), beneath which *N. meinerti* burrows are abundant. *Tubuca urvillei* were collected along the banks of a freshwater (FW) rivulet where trees are absent (Fig. 1B-E). These two areas can be totally submerged by seawater (SW) at high tide (Fig. 1D) and can also be flooded by FW at low tide after heavy rainfall (Fig. 1F). The collection of these crabs was restricted to the banks close to spurred and red mangrove trees (*Rhizophora mucronata*). All animals were collected at low tide, and water samples were taken from random burrows for verification of osmolality for each species. Crabs of similar fresh body mass were transferred to the experimental facility of the University Center of Mayotte (CUFR). They were placed in individual plastic boxes with approximate dimensions of 16 × 11 × 7 cm (l × w × h). Two-thirds of each box was filled with SW (salinity ~33 PSU; 970 mOsmol·kg⁻¹). Crabs were then acclimated for 3 days at 28 ± 1°C, the average water temperature recorded in Mayotte (Ballorain et al. 2013). Boxes were connected to a closed recirculation water system. Each system consisted of 24 (4 × 6) boxes connected to an 80 l water reservoir. A water pump containing a biofilter ensured the supply of clean and aerated SW to each box.

Experimental conditions

For all experiments, males and females of *N. meinerti* were used in the same proportion (fresh body weight, FBW: 35 ± 8 g) (Fig. 2A). However, for *T. urvillei*, only males (FBW: 6.9 ± 1.7 g) were considered (Fig. 2B) due to the large weight difference between sexes. All animals were in intermolt stage, verified *a-posteriori* through

epipodite examination.

After the initial 3-day acclimation period in SW (Fig. 2C), a first batch of crabs was exposed to different salinities to determine the osmolality curve and the isosmotic point (*i.e.* the environmental salinity at which the osmolality of body fluids and environmental media are equal) for each species. To conduct the energy-redox analyses (respirometry and ROS measurements), a second batch of animals was distributed among 3 salinities: SW, diluted seawater (dSW, 294 mOsm·kg⁻¹, salinity ~10 PSU), and isosmotic seawater (iSW) corresponding to 750 mOsmol·kg⁻¹ (~25.5 PSU) and 820 mOsmol·kg⁻¹ (~27.9 PSU) for *N. meinerti* and *T. urvillei*, respectively. Since results showed that iSW had no significant impact on bioenergetics, all further work was conducted under SW and dSW. Batch 3 was used to calculate osmoregulatory capacity and conduct gill morphometry and batch 4 was used to calculate Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) labelling and activity. For the latter, anterior (with a mainly respiratory function) and posterior gills (with an important osmoregulatory role) were sampled separately. *Neosarmatium meinerti* possesses 8 gills per branchial cavity (Fig. 2D) while *T. urvillei* has 6 (Fig. 2E). The last three pairs in each species were considered as osmoregulatory gills, since this is classically reported in many decapod crabs.

Salinity for each experimental condition was controlled daily and adjusted if necessary during the different exposure times. For most crab species, full salinity acclimation occurs between 1-2 weeks of exposure (Lovett et al. 2006a). However, to remain within ecologically-relevant experimental times and to keep crabs in their intermolt stage (thus avoiding a change in their physiological responses), exposure was limited to 4 days, which is sufficient to achieve haemolymph osmoregulation (Siebers et al. 1972; Lovett et al. 2006b; Rivera-Ingraham et al. 2016a). For the morphological and NKA analyses, 7 days of exposure were allowed to ensure that morphological changes were efficiently induced (Tsai and Lin 2007). Additionally, to avoid the impact of feeding on the physiological parameters considered (Herreid 1980), crabs were fasted for a maximum period of 10 days during the experiments. Depending on the subsequent analyses and when possible, living animals were returned to their environment.

Osmolality curves

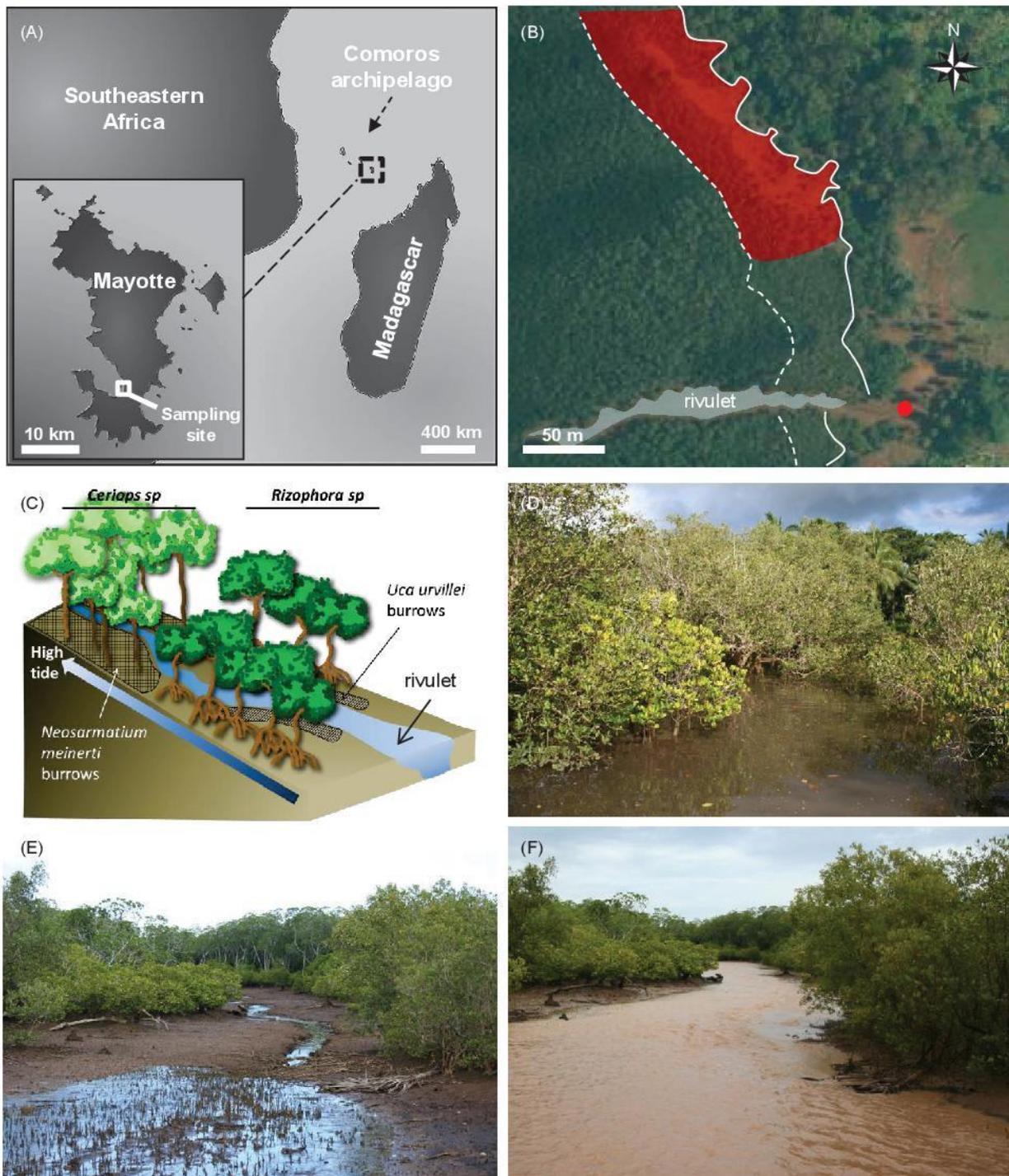


Fig. 1. Characteristics of the study site. (A) Location of the Comoros archipelago and Malamani mangrove (Mayotte Island). (B) Detailed view of the Malamani mangrove and *Neosarmatium meinerti* and *Tubuca urvillei* collection zones. Continuous line indicates the upper limit of the *Ceriops tagal* belt while the discontinuous line represents the approximate limit between the *C. tagal* and *Rhizophora mucronata* belts. The red dot corresponds to the position where pictures E and F were taken. Areas marked in red and blue represent the collection sites for *N. meinerti* and *T. urvillei*, respectively. (C) Schematic representation of the mangrove structure, representing the habitats of the two crab species. (D) General view of the mangrove (area marked in red in subpanel B) at high tide. E-F: General view of the rivulet at low tide during a dry day (E) and after rainfall (F).

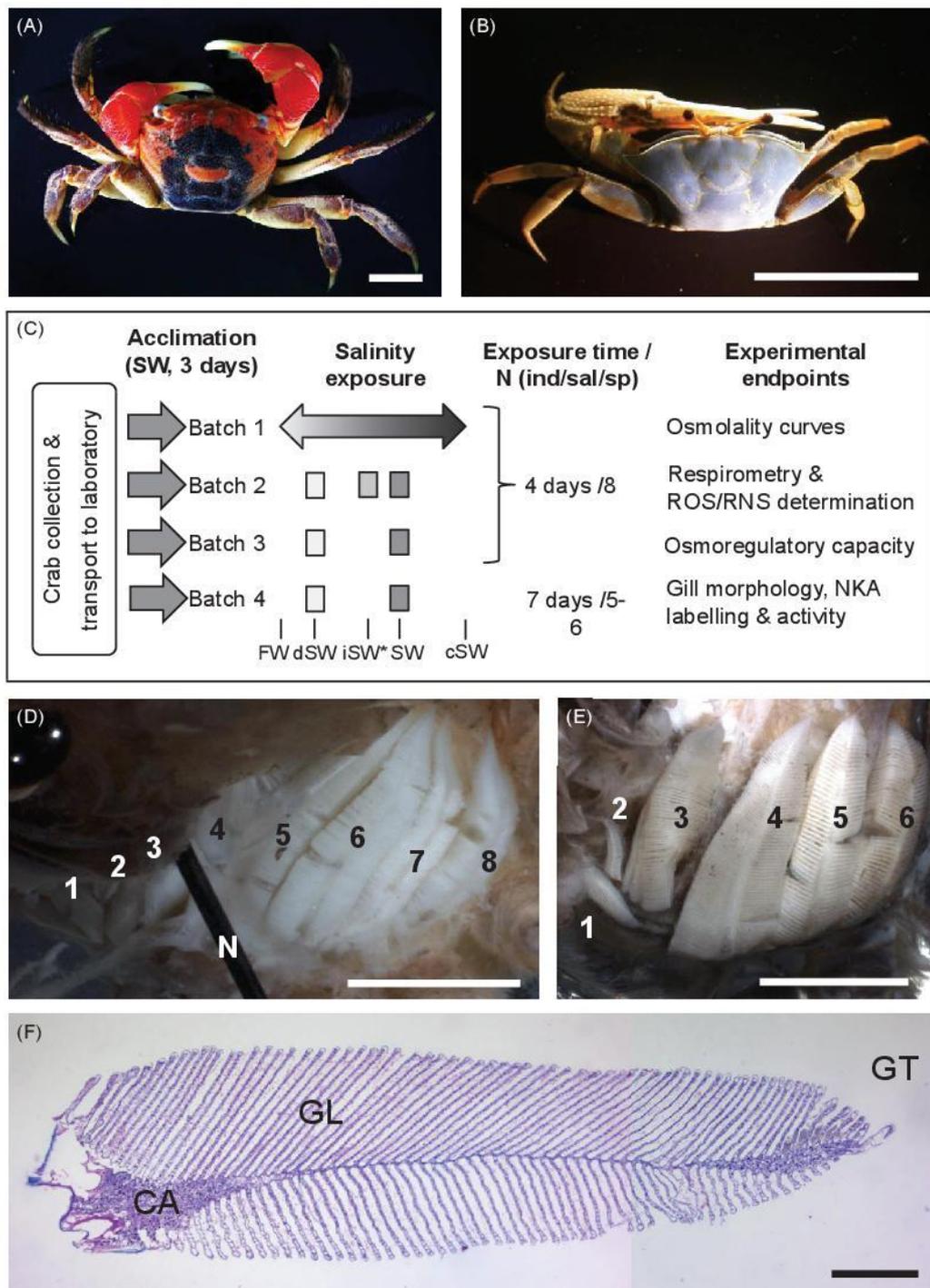


Fig. 2. Dorsal view of *Neosarmatium meinerti* (A) and *Tubuca urvillei* (B). (C) Schematic representation of the experimental setup. For those analyses considering gill tissues (morphology, NKA activity and labelling), anterior and posterior gills were considered separately. The macroscopic view of *N. meinerti* and *T. urvillei* gill cavities are shown in D and E, respectively. The branchiostegite covering the branchial cavity has been removed. Gills are numbered from the anterior side of the crabs. Both species present a similar gill organization but different total gill number: whilst there are 2 podobranchs and 4 arthrobranchs for *T. urvillei*, *N. meinerti* possess 3 podobranchs and 4 arthrobranchs. (F) Histological section of a phyllobranchiate gill (*T. urvillei*) with flat leaf-like lamellae connected to a central axis distributing and collecting the circulating hemolymph. Anterior and posterior gills of both species present a similar branchial organisation. CA: central axis; cSW: concentrated seawater; dSW: diluted seawater; FW: freshwater; GL: gill lamellae; GT: gill tip; iSW: isosmotic seawater; N: dissecting needle; SW: seawater. Scale bars: A = 3 cm, B = 2 cm; D = 7 mm; E = 500 μ m. *values adjusted to the isosmotic point of each of the two species according to the results provided in figure 3A.

To determine osmolality curves for *N. meinerti* and *T. urvillei*, crabs were immersed at different water salinities with 8 crabs per salinity, ranging from FW (salinity ~0.2 PSU; 6 mOsmol·kg⁻¹) to concentrated SW (salinity ~50 PSU; 1500 mOsmol·kg⁻¹). Crabs were maintained in these conditions for 4 days, a typical acclimation time used for other decapods. A 0.1–0.5 ml hemolymph aliquot was then rapidly collected from crabs kept on ice using a 0.5 ml syringe without added anticoagulant, inserting the needle between the cephalothorax and a pereopod. Hemolymph osmolality was measured in duplicate using a vapor pressure depression osmometer (Vapro 5600, Wescor, USA) (sample volumes: 10 µl).

Whole-animal respirometry

These experiments were conducted in 750 ml and 150 ml air-tight transparent chambers for *N. meinerti* and *T. urvillei*, respectively, equipped with magnetic stirrers to ensure correct O₂ mixing in the water column and equipped with an oxygen optode (OXSP5, sensor code SD7-545-214) (Pyro-Science GmbH, Aachen, Germany) on its inner wall. Optodes were calibrated to 100% (using air-saturated water) and 0% air saturation. The latter was achieved using a freshly made 80 mM Na₂SO₃ solution. A structure of 1 mm² mesh was installed in the chamber to avoid the disturbance of crabs by the magnetic stirrer (Rivera-Ingraham et al. 2016a). Each crab was placed in a chamber containing filtered (0.2 µm Whatman) medium at the salinity value at which the animal was acclimated. To avoid handling stress, crabs were left for 15 min with an aeration system to maintain fully oxygenated water. Each chamber was then filled to its maximum capacity to avoid the formation of air bubbles and was sealed to ensure air tightness. Oxygen concentration within each chamber was measured using a four-channel fiber-optic oxygen meter (FireSting, Pyro-Science GmbH) and was recorded through the Pyro Oxygen Logger software. All measurements started in fully oxygenated water (> 98 %) and oxygen consumption rates were recorded as a function of declining pO₂ over time. Four parallel measurements were carried out simultaneously (including a blank) and data were recorded at 5 s intervals. Animals in each of the chambers were allowed to breathe for a minimum of 15 min at a constant and controlled temperature of 25°C. After each experiment, crabs were blotted dry and fresh body weight (FBW) was recorded to the nearest 0.01 g. Rates of oxygen consumption

(MO₂) were calculated through linear regression and expressed as µmol O₂·min⁻¹·g FBW⁻¹.

ROS/RNS formation

For each experimental condition (SW, iSW and dSW), 8 crabs were individually weighed (to the nearest 0.01 g) before hemolymph sampling. Hemolymph samples were collected for each individual, as previously described. The presence of ROS/RNS in the hemolymph of mangrove and fiddler crabs was performed using the spectrophotometric procedure described by Rivera-Ingraham et al. (2016a). In triplicate, 2 µl of hemolymph sample was mixed with 100 µl of a saline solution. To avoid osmotic-induced ROS/RNS production by hemocytes, the osmolality of the solution was adjusted to the osmolality of the hemolymph. According to the osmolality curves, these values were: 649, 690 and 765 mOsmol·kg⁻¹ for *N. meinerti*, and 765, 780 and 874 mOsmol·kg⁻¹ for *T. urvillei* for the SW, iSW and dSW treatments, respectively. Reactions were initiated with 50 µl of Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate solution (DCFH-DA, 30 µM) (Molecular Probes, C-13293). The fluorescence signal was read at wavelengths of 590 nm (excitation) and 510 nm (emission) using a Tecan infinit F200 PRO (Tecan Group Ltd., Austria).

Measurements were made every minute over a 20 min period in a flat-bottom black microplate. The speed of DCFH-DA degradation in DCF is proportional to the content in ROS/RNS. As DCF fluorescence may vary according to the salinity of the medium (Rivera-Ingraham et al. 2016a), a standardization curve of H₂O₂ was prepared and measured at each of the 6 environmental salinities (3 per species) to correct any such differences, as described by Rivera-Ingraham (2016a). Although it has been widely demonstrated that DCF is not H₂O₂-specific for various reasons (Grisham 2012; Kalyanaraman et al. 2012), the curve was constructed using this compound as it is the most stable, and thus the most common, ROS present within cells.

Osmoregulatory capacities

The osmoregulatory capacity (OC) of *N. meinerti* and *T. urvillei* was assessed by recording hemolymph osmolality after 0, 1, 2 and 4 days of exposure to either dSW or SW. Each crab was sampled once. The OC was calculated as the absolute value of the difference between the

osmotic pressure of the hemolymph and that of the external medium.

Branchial histology, immunolabelling of the Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) and morphometric analyses

A total of 5 crabs per species were exposed to SW and dSW for a period of 7 days to ensure that all anatomical changes occurred fully. After this period, animals were anesthetized on ice and sacrificed. Anterior and posterior gills were sampled separately. For *N. meinerti*, anterior gill pair 1 and posterior gill pair 8 were sampled. For *T. urvillei*, anterior gill pair 3 and posterior gill pair 6 were used. Dissected gills were fixed in Bouin's fixative solution for 2 days and subsequently rinsed in 70% ethanol. Samples were then dehydrated in a series of graded alcohols (90, 95 and 100%) and embedded in paraffin. Sections (4 μm) were cut on a Leitz Wetzlar microtome, collected on glass slides and stained using the classical Masson's Trichrome Staining Protocol (Martoja and Martoja-Pierson 1967) or directly used for immunolabelling.

For NKA immunolabelling, sections were dewaxed; hydrated through a graded series of ethanol (90, 95, 100%); rinsed with a solution of 10 mM Phosphate-buffered saline (PBS), 150 mM NaCl and 0.01% Tween 20 (pH 7.3), for 10 min; then treated with 50 mmol NH₄Cl in PBS (pH 7.3) for 5 min to mask free aldehyde groups in the fixative. Finally, sections were incubated for 10 min with a blocking solution (BS) containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% gelatine in PBS. Primary labelling was performed for 2 h at room temperature in a wet chamber, with the primary antibody rabbit anti-NKA H300 (Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBS at 10 μg·ml⁻¹ covering the sections. Control sections were incubated in BS without the primary antibodies. After 3 extensive 10 min washes in BS to remove unbound antibodies, the sections were incubated for 1 h with a secondary antibody: donkey-anti rabbit (Alexa Fluor[®] 546), 10 μg·ml⁻¹. Following extensive washing in BS (six times for 5 min), sections were mounted in 80% glycerine, 20% PBS and 2% N-propyl-gallate to delay photobleaching (ImmunoHistoMount, Aqueous-based Media, Santa Cruz Bio-technology, USA).

Stained and labelled sections were examined with a Leitz Diaplan microscope equipped with a special filter for fluorescence and associated with a Leica DC 300 F digital camera and its software FW 4000 I (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison,

France).

Histological sections of the gill lamellae were photographed at the same magnification (×40). The thickness of the gill epithelium was measured on both sides of 5 lamellae per gill (only areas sectioned through cell nucleus were considered). Morphometric measures were obtained using the freeware Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Branchial NKA activity

To identify quantitative differences in NKA activity between the species, an additional 6 crabs per species were exposed to the same conditions described in section 2.7. The last three pairs of posterior gills (6, 7 and 8 for *N. meinerti* and 4, 5 and 6 for *T. urvillei*) were dissected and homogenized in pairs in SEI buffer (150 mM sucrose, 10 mM EDTA, 50 mM imidazole, pH 7.4) using a manual potter. The specific, Na⁺- and K⁺-dependent, ouabain-sensitive ATPase activity was measured in these homogenates using 1.4 mM of ouabain as described in detail by Metz et al. (2003). Aliquots (5 μl in triplicate) of homogenate (protein content of 1 mg·ml⁻¹) were incubated in assay media for 20 min at 25°C. The specific activity was calculated by subtracting the K⁺-independent, ouabain-insensitive ATPase activity from total ATPase activity. ATP hydrolysis was assessed by the amount of inorganic phosphate formed per minute per mg of protein. Sample protein content was estimated using the protocol originally described by Bradford (1976) using a commercially prepared reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), and bovine serum albumin as standard.

Statistics

Statistical analyses were conducted using R software (R Core Team 2016) and SPSS 15.0 (SPSS Inc., USA). The R statistic package 'cobs' was used to adjust the osmolality curves. This package is based on constrained b-spline approximations (Ng and Maechler 2007). T-tests and one- or two-way ANOVAs were carried out on data after control of parametric test assumptions (normality and homoscedasticity). When a significant difference was detected, differences among groups were identified using Tukey's Honest Significant Difference (HSD) test for two-way ANOVA and Student-Newman-Keuls (SNK) test for one-way ANOVA. Data are presented as means with standard error of the mean (± SE) and the level of statistical significance was $p < 0.05$.

RESULTS

For all analyses, no significant differences were found between treatments in terms of animal weight. In the case of *N. meinerti*, there was no influence of sex on any of the parameters analyzed and thus only pooled results are shown. The salinity range measured during crab sampling in the collection zones of *N. meinerti* and *T. urvillei* (Fig. 1B, C) was 911-1352 mOsm·kg⁻¹ (31-46 PSU)

and 273-521 mOsm·kg⁻¹ (10-18 PSU), respectively (Fig. 3A).

Hemolymph osmolality curves, salinity tolerance and osmoregulatory capacity (OC)

Both *N. meinerti* and *T. urvillei* are strong osmoregulators across the tested salinities (Fig. 3A). Crabs hyper-regulate at lower salinities (hemolymph osmolality is actively maintained

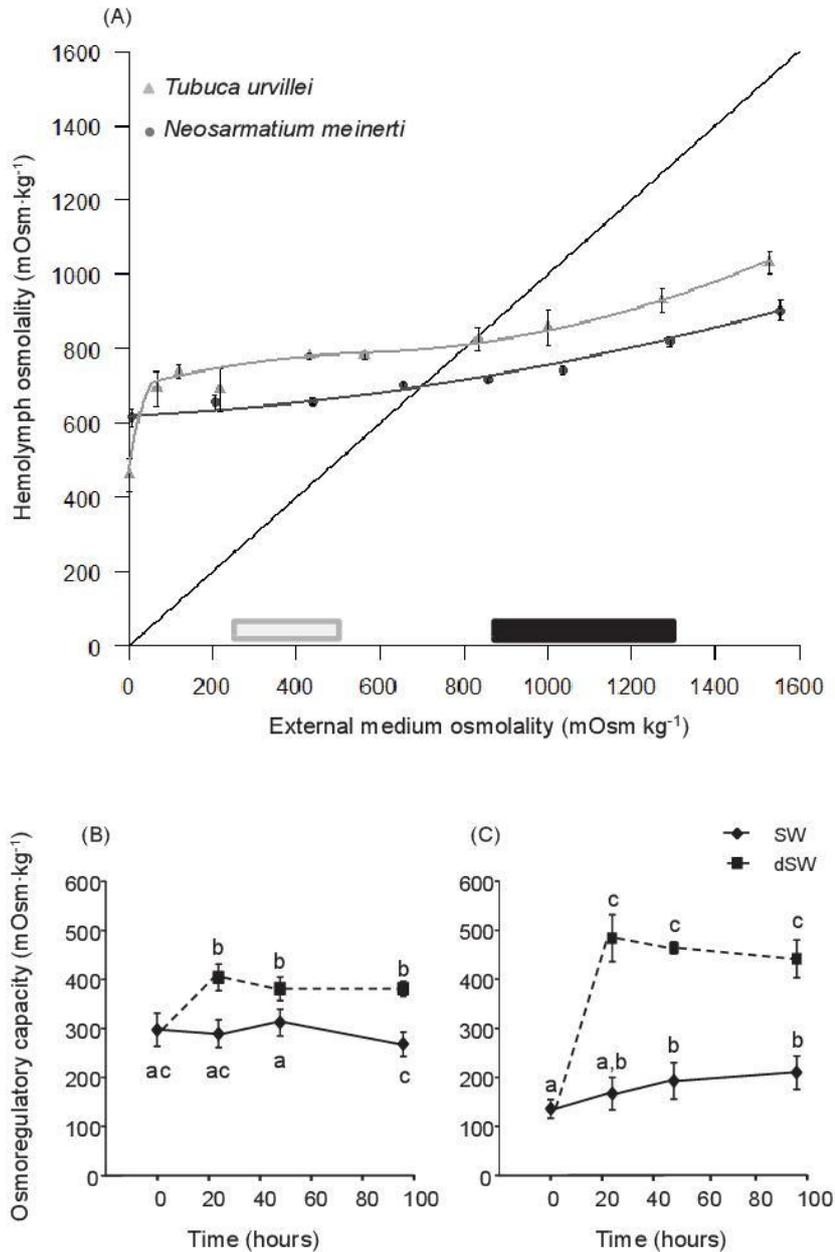


Fig. 3. Hemolymph osmolality (in mOsm·kg⁻¹) at different salinities (A) and osmoregulatory capacity after salinity challenge (B, C) shown by *Neosarmatium meinerti* (B) and *Tubuca urvillei* (C). Grey bar: salinity range of water collected at low tide along the rivulet banks. Black bar: salinity range of water collected at low tide in burrows of *N. meinerti*.

at levels above that of dSW) but show a hypo-osmoregulatory behaviour at higher salinity (hemolymph osmolality maintained below that of SW). They can maintain a gradient greater than 600 mOsm·kg⁻¹ when exposed to salinities close to FW (5-10 mOsm·kg⁻¹) or concentrated SW (1500 mOsm·kg⁻¹). The only deaths recorded at the lowest and highest salinities were in *T. urvillei*. Mortality rates were up to 37 % at 5 mOsm·kg⁻¹ and 12% at 1500 mOsm·kg⁻¹.

For crabs kept in SW or directly transferred to dSW, OC data after 4 days post transfer confirms these crabs are strong osmoregulators and can maintain a stable osmoregulation within hours after transfer (Fig. 3A, 3B). *Neosarmatium meinerti* can maintain OC values of ~300 mOsm·kg⁻¹ in SW (30 PSU) and ~400 mOsm·kg⁻¹ in dSW (10 PSU) over time, and these values were significantly different ($F = 34.54, p < 0.001$) (Fig. 3B). The same is true for *T. urvillei* ($F = 174.28, p < 0.001$), which

also presents remarkable regulatory capacity with OC values of ~200 mOsm·kg⁻¹ in SW (30 PSU) and ~500 mOsm·kg⁻¹ in dSW (10 PSU) (Fig. 3C).

Rates of oxygen consumption and ROS/RNS production

Oxygen consumption rate across salinities did not vary for *N. meinerti* ($F = 0.52, p \approx 0.59$, Fig. 4A) or for *T. urvillei* ($F = 0.05, p \approx 0.95$, Fig. 4B). ROS/RNS production in the hemolymph (Fig. 4C and D) did not show any significant difference for either species ($F = 0.48, p \approx 0.62$ and $F = 1.01, p \approx 0.38$ for *N. meinerti* and *T. urvillei*, respectively).

Branchial histology

The histological analysis revealed relevant differences among anterior and posterior gills in both species. No discernible differences

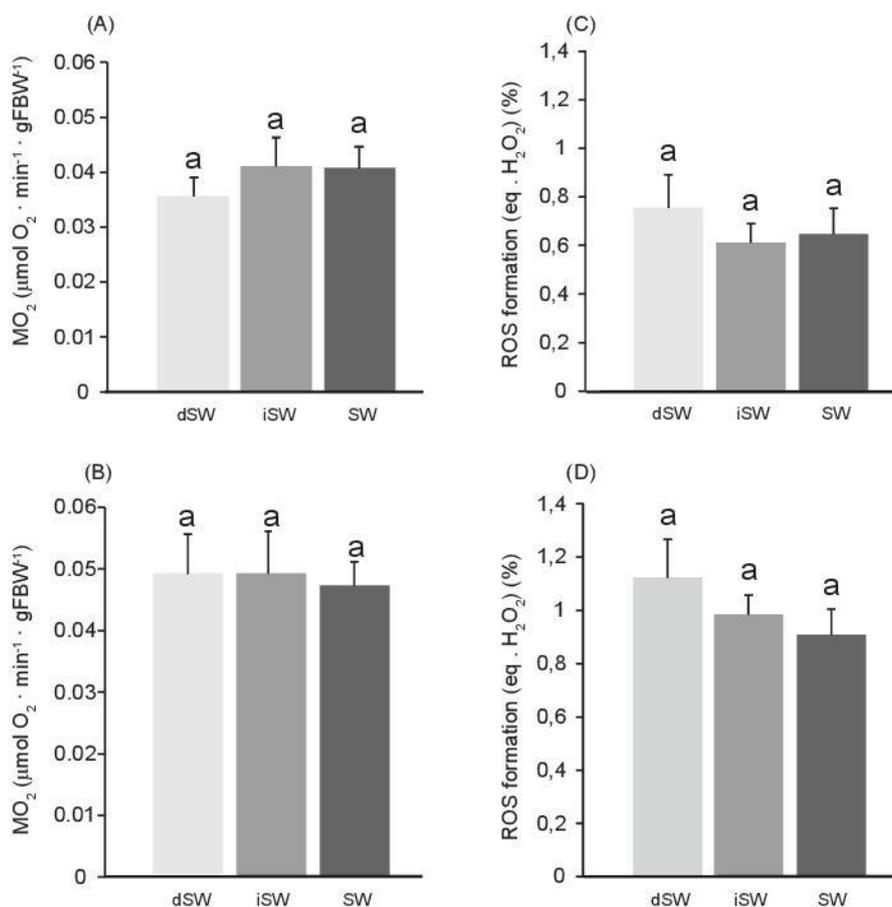


Fig. 4. Whole animal rates of oxygen consumption (A, B) and ROS/RNS production in hemolymph (C, D) from *Neosarmatium meinerti* (A, C) and *Tubuca urvillei* (B, D). Different letters represent significantly different groups according to a one-way ANOVA test followed by a SNK multiple comparison test ($p < 0.05$). iSW: isosmotic SW (750 mOsm·kg⁻¹ for *N. meinerti* and 820 mOsm·kg⁻¹ for *T. urvillei*). FWB: fresh body weight.

in morphology were found between animals acclimated to SW and those exposed to dSW. Thus, only results corresponding to the latter are shown. In both cases, anterior gills showed the typical characteristics of respiratory organs: gill lamellae consist of a single layer of very thin epithelial cells while the hemolymphatic space is divided into upper and lower sections by a

septum (Fig. 5A, B). Posterior gills do not have this septum and present a much thicker epithelial layer. Measurements of epithelial thickness on histological sections show large differences between anterior and posterior gills (Fig. 5E, F), and it is especially striking that values are over 2-fold higher for the small *T. urvillei*.

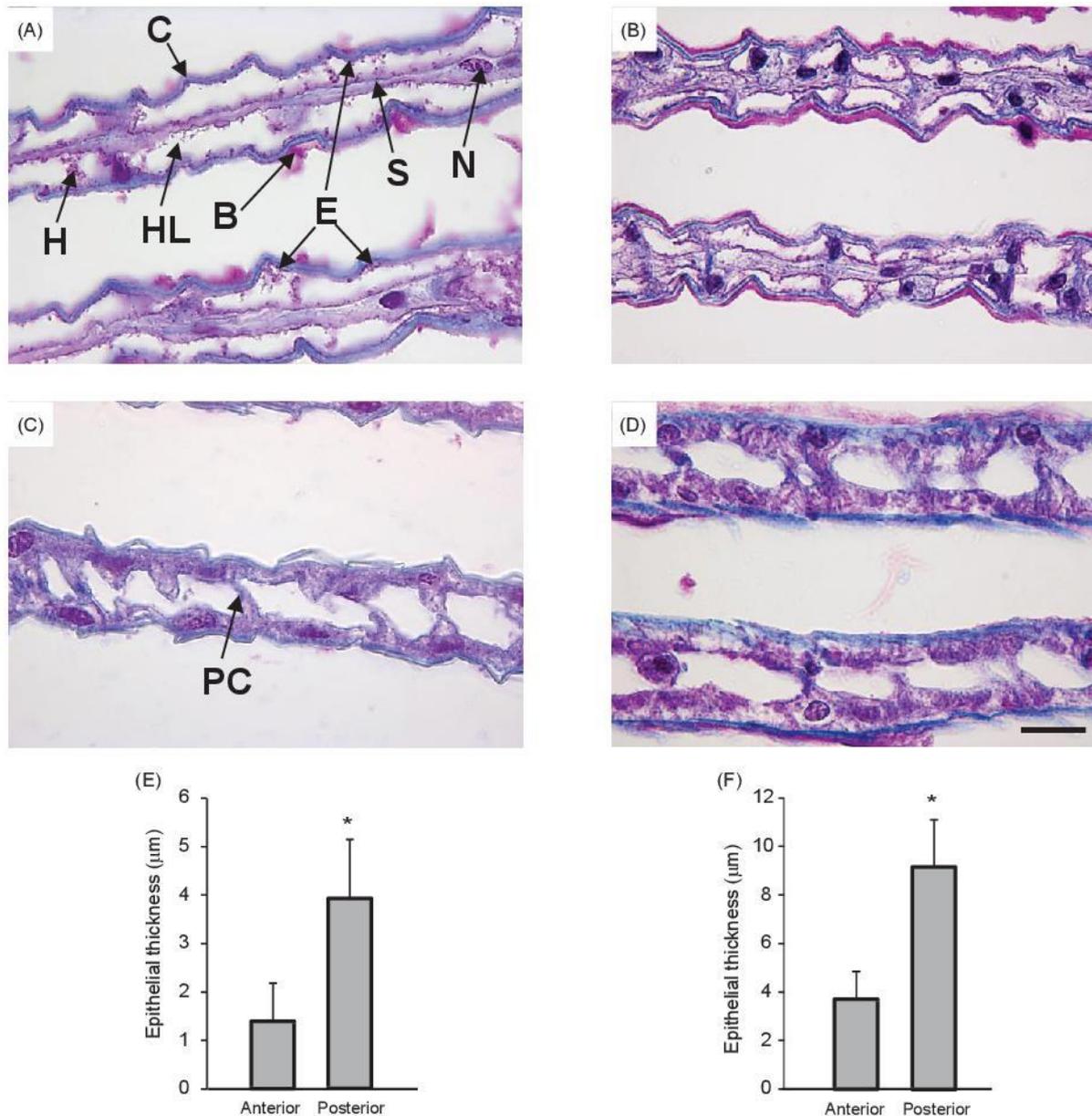


Fig. 5. Histological sections (A to D) and epithelial thickness of gill lamellae (E, F) of *Neosarmatium meinerti* (A, C, E) and *Tubuca urvillei* (B, D, F) after dSW acclimation. Subpanels A and B correspond to anterior (mainly respiratory) gills (here pairs 1 and 3 for *N. meinerti* and *T. urvillei*, respectively). Subpanels C and D correspond to posterior (osmoregulatory) gills (here, pairs 8 and 6 for *N. meinerti* and *T. urvillei*, respectively). B: bacterial layer; C: cuticle; E: epithelium; H: hemocyte; HL: hemolymphatic lacuna; N: nucleus; S: septum. Scale bar = 20 µm. * $p < 0.001$ (*t*-test).

Branchial Na⁺/K⁺-ATPase labelling and activity

NKA immunolocalization conducted on histological sections of both species (Fig. 6) indicates that the labelling occurs along the basal

side of the epithelial cells and appears reduced in the anterior gills (Fig. 6A, B), but immunostaining is thicker in the posterior gills (Fig. 6C, D) in both species.

For *N. meinerti*, the two-way ANOVA

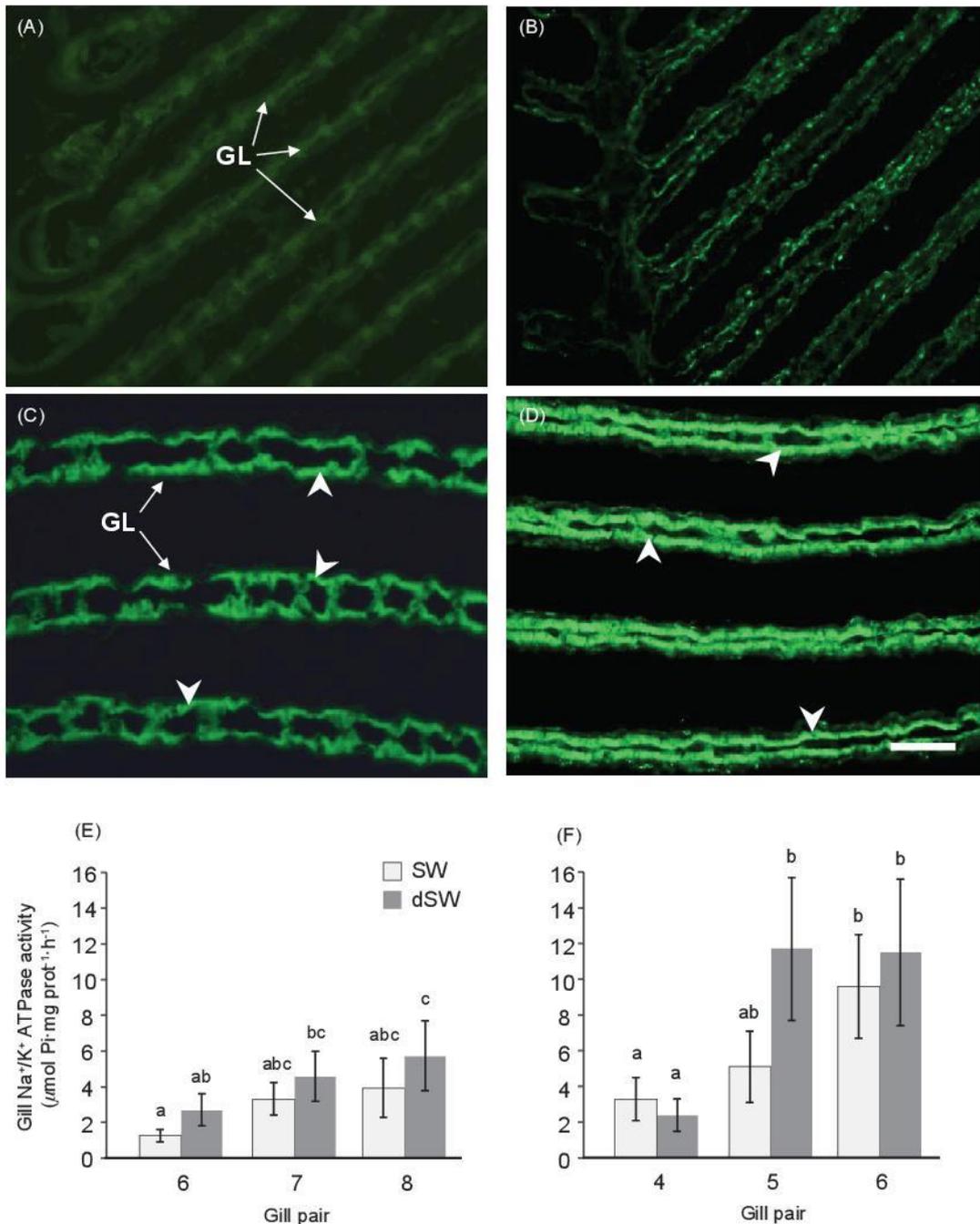


Fig. 6. NKA immunolabelling and activity for *Neosarmatium meinerti* (A, C, E) and *Tubuca urvillei* (B, D, F). NKA immunolabelling is shown for anterior (A, C) and posterior (B, D) gills (here, gill 8 for *N. meinerti* and gill 6 for *T. urvillei*). NKA activity (E, F) was measured from the last three gill pairs of crabs exposed to SW or dSW. Different letters show statistically significant differences based on a two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test ($p < 0.05$). GL: gill lamellae; arrow heads indicate NKA labelling. This labelling occurs along the basal side of the epithelial cells and appears reduced in the anterior gills but thicker in the posterior gills. Scale bar = 40 μm.

revealed that NKA activity is significantly different between the three posterior gills ($F = 11.154$; $p < 0.001$), with a salinity effect ($F = 5.761$; $p < 0.05$). However, post-hoc analysis did not reveal any difference between SW and dSW crabs among gill pairs (Fig. 6E).

For *T. urvillei*, no difference was observed in NKA activity recorded in the last three posterior gills between SW- and dSW-exposed crabs (two-way ANOVA, $F = 3.316$; $p = 0.08$) but there was a significant difference according to the position of the gills ($F = 21.149$; $p < 0.001$). NKA gill activity increased by up to 6 times between gill pairs 4 and 6 (Fig. 6F).

DISCUSSION

In a mangrove ecosystem, the key factors driving the spatial and temporal abundance of amphibious sesarmid and fiddler crabs are still not fully understood (Koch et al. 2005; Bezerra et al. 2006; Salgado-Kent and McGuinness 2010; Nobbs and Blamires 2015). In the mangrove site of Mayotte, Comoros archipelago, the fiddler crab *Tubuca urvillei* and the red mangrove crab *N. meinerti* are both strong osmoregulators, but they live in different areas of the upper mangrove and thus face different salinity ranges. *N. meinerti* is periodically subjected to extreme salinity fluctuations and regularly faces high salinity water in its burrows, most probably due to SW evaporation at low tide and infrequent seawater renewal at high tide, depending on the tidal coefficients (this study; Gillikin et al. 2004). Fiddler crabs; however, live preferentially close to flowing brackish water, *i.e.* close to rivulets draining freshwater from the mainland (this study; Nobbs and Blamires 2015) and, unlike *N. meinerti*, use a burrow plugging behavior (Fusi et al. 2015), thereby minimizing their exposure to wide salinity variations.

Existing literature suggests that mangrove crab osmoregulatory ability is not strongly linked with observed zonation patterns, species abundance and distribution (Frusher et al. 1994; Gillikin et al. 2004). Our results support this hypothesis. From a purely energetic perspective, this is shown by the rates of oxygen consumption recorded for the two species. Both species maintain relatively stable oxygen consumption rates across different salinities, suggesting that shifts in environmental salinity do not impose a significant change in energy demand or entail a

redox imbalance. However, the different subtle physiological characteristics recorded in this study widen our knowledge of the ecological *in-situ* salinities observed for fiddler and red mangrove crabs. *Neosarmatium meinerti* has a strong hypo-osmoregulatory capacity (hypo-OC) in SW and hyper-OC in dSW, indicating that this species has a strong OC under these conditions (Lignot et al. 2000; Henry et al. 2012). *Tubuca urvillei* shows a high hyper-OC at the lower salinity levels it encounters in its habitat, and a comparatively low hypo-OC in SW. This OC shift at low salinities further supports the conclusion that high salinity conditions are a larger physiological challenge for *T. urvillei* than *N. meinerti*. This is consistent with NKA gill activity recorded in the posterior osmoregulatory gills of crabs maintained in SW and dSW. NKA activity is up to 6 and 12 $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for *N. meinerti* and *T. urvillei*, respectively. Also, the osmoregulatory epithelium of the posterior gill lamellae is up to 4 μm thick for *N. meinerti* and 9 μm for *T. urvillei*. Similar osmoregulatory gill epithelium thicknesses were also observed in hololimnetic crabs such as *Dilocarcinus pagei* (Furriel et al. 2010) and *Potamon niloticus* (Maina 1990). In other true freshwater species such as crayfish (*i.e.* *Astacus pallipes*, *Procambarus clarkii* and *Orconectes virilis*), the water-blood barrier thickness can also measure up to 8 μm (Fisher 1972; Burggren et al. 1974; McMahon et al. 1974), even attaining 18-20 μm in the Trichodactylid crab *Dilocarcinus pagei* (Onken and McNamara 2002). A similar thickness to that obtained for *T. urvillei* was measured in *Leptuca uruguayensis* (Luquet et al. 1995). Terrestrial Gecarcinidae, Grapsidae, Ocypodoidea and Sundathelphusidae crustaceans (*i.e.* *Geograpsus grayi*, *G. crinipes*, *Cardisoma hirtipes*, *Gecarcoidea natalis*, *Mictyris longicarpus* and *Holthuisana transversa*) also have thick osmoregulatory epithelia of up to 10 μm in their posterior gills (Taylor and Greenaway 1979; Farrelly and Greenaway 1992). Consequently, the blood/gas diffusion distance limits the efficiency and absolute contribution of the gills to gas exchange. The presence of well-developed epithelia in posterior gill lamellae in fiddler and red mangrove crabs is therefore typical of FW, amphibious and land crabs. This represents one of the major morphological evolutions towards terrestrialization.

Finally, osmoregulatory posterior gills of fiddler and red mangrove crabs do not suffer any major morphological changes due to dSW transfer. This is not the case for most intertidal

euryhaline crustaceans, for which the need for increased ion transport during low-salinity transfer drives epithelial hypertrophy in the osmoregulatory gill lamellae through various and well-studied mechanisms (Neufeld et al. 1980; Henry and Watts 2001; Roy et al. 2007; Torres et al. 2007; Lucu et al. 2008). All these changes are linked to an increase in NKA-specific activity along with increased expression of other ion transporters and supporting enzymes such as carbonic anhydrase, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter, V-type H^+ -ATPase and arginine kinase (Pequeux 1995; Lucu and Towle 2003). However, no salinity-induced changes in NKA activity occur for bimodal and terrestrial crabs (Tsai and Lin 2007), as observed for *N. meinerti* and *T. urvillei* in our study. A possible explanation is that the cellular machinery is already optimized for terrestrial life, with the involvement of posterior gills in acid-base balance, nitrogen excretion and aerial osmoregulation. This machinery could thus easily switch to aquatic osmoregulation with no functional and morphological remodeling of the gills. It could involve specific enzymes such as the apical-type V- H^+ -ATPase which, along with NKA, is a key enzyme in the transition from a marine environment to land and is involved in acid-base balance and nitrogen excretion (Morris 2001; Weihrauch et al. 2001 2004). As already demonstrated by Tsai and Lin (2007), intertidal crabs with varying NKA activity show a cytoplasmic V- H^+ -ATPase distribution due to salinity challenge, but freshwater and terrestrial crabs with stable NKA activity during salinity variations tend to have an apical V- H^+ -ATPase. It would therefore be interesting to investigate V- H^+ -ATPase expression and localization in *T. urvillei* and *N. meinerti* to further characterize their adaptation to freshwater and terrestrial habitats. It would also be relevant to analyze the morphology of extrabranchial organs such as the branchiostegite, which has an osmoregulatory function in FW decapod crayfish (Lignot et al. 2005). This organ is also used for aerial oxygen uptake, since it has a reduced epithelial diffusion distance as low as 2 μm (Halperin et al. 2000). Finally, to better comprehend adaptation to terrestrial environments, it would be interesting to consider the ability of fiddler and red mangrove crabs to control their urine composition. Terrestrial crabs normally have access to FW but not to SW, and must therefore recover salt from their urine. This mechanism down-regulates a normally active uptake system, making it more suitable for their ecology.

CONCLUSIONS

We applied integrative physiological tools to provide new insights into the factors affecting crab distribution and, in doing so, add to the field of mangrove ecophysiology. Although salinity alone does not explain the spatio-temporal distribution of mangrove crabs, this study highlights that salinity-induced physiological constraints partly shape the distribution of crabs across a range of habitats within their salinity range. This physiological approach is a potential tool for assessing the impacts of salinity variations induced by human activities on mangrove crab distribution. This is essential to understand mangrove crab distribution and to predict how their disappearance could affect the functionality of mangrove ecosystems (Nobbs and Blamires 2015). This is particularly relevant since, among other practices, the release of domestic wastewater (with salinities close to FW values) or effluents from shrimp farms (with salinities close to SW values) may become a common practice in many countries that use mangrove forests as a natural filtering system (Wong et al. 1997; Ouyang and Guo 2016 2018). Mangrove crabs are also key players in the bioremediation process through their bioturbation activities.

Acknowledgments: The authors are thankful to Kissimati Abdallah for her help on the field and to Claire Gollety for statistical advice. The authors also sincerely thank Mrs. Joanna Munro from Munro Language Services for correcting the manuscript. This study was partly funded through the Marie Curie Actions EU grant FP7-PEOPLE-2013-IEF (grant number 622087-“IAS-Life”) awarded to GAR-I and by the French National Agency for Water (ONEMA), which is now part of the French Agency for Biodiversity (AFB).

Authors' contributions: DT, GAR-I and JHL participated in the conception of the article, conducted laboratory analyses and were involved in manuscript preparation. JACR, LA, MB and ML participated in laboratory analyses. EF and ES were involved in the planning of the article and manuscript preparation.

Competing interests: DT, GAR-I, JACR, LA, MB, ML, EF, JHL and ES declare that they have no conflict of interest.

Availability of data and materials: All data

and materials not included in this manuscript are available from the corresponding author on request.

Consent for publication: Not applicable.

Ethics approval consent to participate: All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

REFERENCES

- Alongi DM. 2008. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuar Coast Shelf Sci* **76**:1-13. doi:10.1016/j.ecss.2007.08.024.
- Anger K, Charmantier G. 2000. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in a mangrove crab, *Sesarma curacaoense* (Decapoda: Grapsidae). *J Exp Mar Bio Ecol* **251**:265-274. doi:10.1016/S0022-0981(00)00223-9.
- Ballorain K, Bourjea J, Ciccione S, Kato A, Hanuise N, Enstipp M, Fossette S, Georges JY. 2013. Seasonal diving behaviour and feeding rhythms of green turtles at Mayotte Island. *Mar Ecol Prog Ser* **483**:289-302. doi:10.3354/meps10301.
- Bezerra LA, Dias CB, Santana G, Matthews-Cascon H. 2006. Spatial distribution of fiddler crabs, genus *Uca*, in a tropical mangrove of northeast Brazil. *Sci Mar* **70**:759-766. doi:10.3989/scimar.2006.70n4759.
- Blaber SJ. 1997. *Fish and Fisheries in Tropical Estuaries*, Springer, London.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Burggren WW, McMahon BR, Costerton JW. 1974. Branchial water- and blood-flow patterns and the structure of the gill of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Can J Zool* **52**:1511-1518.
- Capdeville C, Abdallah K, Buffan-Dubau E, Lin C, Azemar F, Lambs L, Fromard F, Rols J-L, Leflaive J. 2018. Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. *Mar Pollut Bull* **129**:379-391. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.02.035.
- Cieluch U, Anger K, Aujoulat F, Buchholz F, Charmantier-Daures M, Charmantier G. 2004. Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J Exp Biol* **207**:325-336. doi:10.1242/jeb.00759.
- Compere P, Wanson S, Pequeux A, Gilles R, Goffinet G. 1989. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. *Tissue Cell* **21**:299-318. doi:10.1016/0040-8166(89)90073-6.
- Ellison JC. 2015. Vulnerability assessment of mangroves to climate change and sea-level rise impacts. *Wetl Ecol Manag* **23**:115-137. doi:10.1007/s11273-014-9397-8.
- Emmerson WD, McGwynne LE. 1992. Feeding and assimilation of mangrove leaves by the crab *Sesarma meinerti* de Man in relation to leaf-litter production in Mgazana, a warm-temperate southern African mangrove swamp. *J Exp Mar Bio Ecol* **157**:41-53. doi:10.1016/0022-0981(92)90073-J.
- Farrelly C, Greenaway P. 1992. The morphology and vasculature of the lungs and gills of the soldier crab, *Mictyris longicarpus*. *J Morphol* **3**:285-304.
- Fisher JM. 1972. Fine-structural observations on the gill filaments of the freshwater crayfish. *Tissue and Cell* **4**:287-299.
- Freire CA, Togni VG, Hermes-Lima M. 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* **160**:291-300. doi:10.1016/j.cbpa.2011.06.024.
- Frusher SD, Giddins RL, Smith TJ. 1994. Distribution and abundance of grapsid crabs (Grapsidae) in a mangrove estuary: Effects of sediment characteristics, salinity tolerances, and osmoregulatory ability. *Estuaries* **17**:647-654. doi:10.1007/BF02804642.
- Furriel RPM, Firmino KCS, Masui DC, Faleiros RO, Torres AH, Mcnamara JC. 2010. Structural and biochemical correlates of Na⁺,K⁺-ATPase driven ion uptake across the posterior gill epithelium of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* **313A**:508-523. doi:10.1002/jez.622.
- Fusi M, Giomi F, Babbini S, Daffonchio D, Mcquaid CD, Porri F, Cannicci S. 2015. Thermal specialization across large geographical scales predicts the resilience of mangrove crab populations to global warming. *Oikos* **124**:784-795. doi:10.1111/oik.01757.
- Garçon DP, Masui DC, Mantelatto FLM, Furriel RPM, McNamara JC, Leone FA, Garçon DP, Masui DC, Mantelatto FLM, Furriel RPM, McNamara JC, Leone FA. 2009. Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* **154**:44-55. doi:10.1016/j.cbpa.2009.04.624.
- Gilles R, Pequeux A, Bianchini A. 1988. Physiological aspects of NaCl movements in the gills of the euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*, acclimated to fresh water. *Comp Biochem Physiol - Part A Physiol* **90**:201-207. doi:10.1016/0300-9629(88)91028-6.
- Gillikin DP, De Wachter B, Tack JF. 2004. Physiological responses of two ecologically important Kenyan mangrove crabs exposed to altered salinity regimes. *J Exp Mar Bio Ecol* **301**:93-109. doi:10.1016/j.jembe.2003.09.024.
- Gilman EL, Ellison J, Duke NC, Field C. 2008. Threats to mangroves from climate change and adaptation options: A review. *Aquat Bot* **89**:237-250. doi:10.1016/j.aquabot.2007.12.009.
- Giri C, Ochieng E, Tieszen LL, Zhu Z, Singh A, Loveland T, Masek J, Duke N. 2011. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Glob Ecol Biogeogr* **20**:154-159. doi:10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x.
- Grisham MB. 2012. Detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. In: Abele D, Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T (eds) *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 329-343.
- Halperin J, Ansaldo M, Pellerano GN, Luquet CM. 2000. Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana 1851 - Physiological and morphological

- studies. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* **126**:341-349. doi:10.1016/S1095-6433(00)00216-6.
- Henry RP, Lucu Č, Onken H, Weihrauch D. 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front Physiol* **3**:1-33. doi:10.3389/fphys.2012.00431.
- Henry RP, Watts SA. 2001. Early carbonic anhydrase induction in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus* during low salinity acclimation is independent of ornithine decarboxylase activity. *J Exp Zool* **289**:350-358.
- Herreid CF. 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* **67**:311-320.
- Jeanson M, Anthony EJ, Doliue F, Cremades C. 2014. Mangrove evolution in Mayotte island, Indian Ocean: A 60-year synopsis based on aerial photographs. *Wetlands* **34**:459-468. doi:10.1007/s13157-014-0512-7.
- Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJA, Dennerly PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, Ischiropoulos H. 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radic Biol Med* **52**:1-6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.
- Koch V, Wolff M, Diele K. 2005. Comparative population dynamics of four fiddler crabs (Ocypodidae, genus *Uca*) from a North Brazilian mangrove ecosystem. *Mar Ecol Prog Ser* **291**:177-188. doi:10.3354/meps291177.
- Kristensen E. 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J Sea Res* **59**:30-43. doi:10.1016/j.seares.2007.05.004.
- Lee SY. 1998. Ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: a review. *Mar Freshw Res* **49**:335-343. doi:10.1071/MF99078.
- Lignot J-H, Charmantier G. 2015. Osmoregulation and excretion. In: Chang ES, Thiel M. eds. *The natural history of the Crustacea*. Vol 4: Physiology. Oxford University Press, New York, pp. 249-283.
- Lignot J-H, Spanings-Pierrot C, Charmantier G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* **191**:209-245. doi:10.1016/S0044-8486(00)00429-4.
- Lignot J-H, Susanto GN, Charmantier-Daures M, Charmantier G. 2005. Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res* **319**:331-339. doi:10.1007/s00441-004-1015-2.
- Lovett DL, Colella T, Cannon AC, Lee DH, Evangelisto A, Muller EM, Towle DW. 2006a. Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol Bull* **210**:132-139.
- Lovett DL, Verzi MP, Burgents JE, Tanner CA, Glomski K, Lee JJ, Towle DW. 2006b. Expression Profiles of Na⁺, K⁺-ATPase during Acute and Chronic Hypo-osmotic Stress in the Blue Crab *Callinectes sapidus*. *Biol Bull* **211**:58-65.
- Lucu Č, Pavičić J, Ivanković D, Pavičić-Hamer D, Najdek M. 2008. Changes in Na⁺/K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* **149**:362-372. doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.026.
- Lucu Č, Towle DW. 2003. Na⁺+K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* **135**:195-214. doi:10.1016/S1095-6433(03)00064-3.
- Luquet CM, Pellerano G, De Carlo J. 1995. Gill Morphology and Terrestrial Adaptation in the Estuarine Crab *Uca uruguayensis Nobili*, 1901 (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana* **68**:882-892.
- Maina JN. 1990. The morphology of the gills of the freshwater African crab *Potamon niloticus* (Crustacea: Brachyura: Potamonidae): a scanning and transmission electron microscope study. *J Zool* **221**:499-515.
- Martoja R, Martoja-Pierson M. 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Paris.
- McMahon BR, Burggren WW, Wilkens JL. 1974. Respiratory responses to long-term hypoxic stress in the crayfish *Orconectes virilis*. *J Exp Biol* **60**:195-206.
- Metz JR, van den Burg EH, Bonga SEW, Flik G. 2003. Regulation of branchial Na⁺/K⁺-ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. *J Exp Biol* **206**:2273-80. doi:10.1242/jeb.00421.
- Morris S. 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J Exp Biol* **204**:979-989.
- Neufeld GJ, Holliday CW, Pritchard JB. 1980. Salinity adaptation of gill Na, K-ATPase in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J Exp Zool* **211**:215-224. doi:10.1002/jez.1402110210.
- Ng P, Maechler M. 2007. A fast and efficient implementation of qualitatively constrained quantile smoothing splines. *Stat Modelling* **7**:315-328. doi:10.1177/1471082X0700700403.
- Nobbs M, Blamires SJ. 2015. Spatiotemporal distribution and abundance of mangrove ecosystem engineers: burrowing crabs around canopy gaps. *Ecosphere* **6**:1-13. doi:10.1890/ES14-00498.1.
- Nobbs M, Blamires SJ. 2016. Making up for lost time: Biophysical constraints on the temporal abundance of two fiddler crabs in wet-dry tropical mangroves. *Austral Ecol* **41**:791-796. doi:10.1111/aec.12365.
- Onken H, McNamara JC. 2002. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J Exp Biol* **205**:167-175.
- Ouyang X, Guo F. 2018. Optimal selection of mangrove paradigms for municipal wastewater treatment: an intuitionistic fuzzy analytical hierarchical processes. *Chemosphere* **197**:634-642. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.102.
- Ouyang X, Guo F. 2016. Paradigms of mangroves in treatment of anthropogenic wastewater pollution. *Sci Total Environ* **544**:971-979. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.013.
- Paital B, Chainy GBN. 2012. Effects of salinity on O₂ consumption, ROS generation and oxidative stress status of gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* **155**:228-237. doi:10.1016/j.cbpc.2011.08.009.
- Penha-Lopes G, Bartolini F, Limbu S, Cannicci S, Kristensen E, Paula JJ. 2009. Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar Pollut Bull* **58**:1694-1703. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.06.015.
- Pequeux A. 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. *J Crustac Biol* **15**:1-60. doi:10.1163/193724095X00578.
- Rivera-Ingraham GA, Barri K, Boe IM, Farcy E, Charles A-L, Geny B, Lignot J-H. 2016a. Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: is oxidative adaptation determined by gill function? *J Exp Biol* **219**:80-89. doi:10.1242/jeb.128595.

- Rivera-Ingraham GA, Nommick A, Blondeau-Bidet E, Ladumer P, Lignot J-H. 2016b. Salinity stress from the perspective of the energy-redox axis: lessons from a marine intertidal flatworm. *Redox Biol* **10**:53-64. doi:10.1016/j.redox.2016.09.012.
- Roy LA, Davis DA, Saoud IP, Henry RP. 2007. Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* **147**:404-411. doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.003
- Salgado-Kent C, McGuinness K. 2010. Spatial and temporal variation in relative numbers of grapsid crabs (Decapoda: Grapsidae) in northern Australian mangrove forests. *The Beagle* **26**:79-87.
- Siebers D, Lucu C, Sperling KR, Eberlein K. 1972. Kinetics of osmoregulation in the crab *Carcinus maenas*. *Mar Biol* **17**:291-303. doi:10.1007/BF00366739.
- Sies H. 1985. *Oxidative stress*. Academic Press, London.
- Smith III TJ, Boto KG, Frusher SD, Giddins RL. 1991. Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest productivity. *Estuar Coast Shelf Sci* **33**:419-432. doi:10.1016/0272-7714(91)90081-L.
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin AA. 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar Environ Res* **79**:1-15. doi:10.1016/j.marenvres.2012.04.003.
- Taylor HH, Greenaway P. 1979. The structure of the gills and lungs of the arid-zone crab, *Holthuisana (Austrothelphusa) traversa* (Brachyura: Sundathelphusidae) including observations on arterial vessels within the gills. *J Zool* **189**:359-384.
- Theuerkauff D, Rivera-Ingraham GA, Mercky Y, Lejeune M, Lignot J-H, Sucre E. 2018. Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species. *Aquat Toxicol* **196**:90-103. doi:10.1016/j.aquatox.2018.01.003.
- Torres G, Charmantier-Daures M, Chifflet S, Anger K. 2007. Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in the gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* **147**:460-465. doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.020.
- Tsai J-R, Lin H-C. 2007. V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J Exp Biol* **210**:620-627. doi:10.1242/jeb.02684.
- Waycott M, McKenzie L, Mellors JE, Ellison JC, Sheaves MT, Collier C, Schwarz AM, Webb A, Johnson JE, Payri CE. 2011. Vulnerability of mangroves, seagrasses and intertidal flats in the tropical Pacific to climate change. *In*: Bell JD, Johnson JE, Hobday AJ (eds) *Vulnerability of Tropical Pacific Fisheries and Aquaculture to Climate Change*, pp. 297-368.
- Weihrauch D, Morris S, Towle DW. 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J Exp Biol* **207**:4491-4504. doi:10.1242/jeb.01308.
- Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D, Towle DW. 2001. Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J Exp Biol* **204**:25-37.
- Wong YS, Tam NFY, Lan CY. 1997. Mangrove wetlands as wastewater treatment facility: A field trial. *In*: *Hydrobiologia*, pp. 49-59.

3.3 Synthèse des résultats et tolérance à la salinité de *Parasesarma guttatum*

Les trois espèces étudiées, *N. meinerti*, *T. urvillei* et *P. guttatum* sont toutes des hyper-hyposmoréulateurs (Figure 46). Les individus peuvent moduler leur capacité osmorégulatrice en quelques heures pour maintenir un fort gradient osmotique. Ainsi, ils hyper-régulent aux basses salinités (l'osmolalité de l'hémolymphe est supérieure à celle de l'eau) et ils sont hyposmoréulateurs aux fortes salinités (l'osmolalité de l'hémolymphe est inférieure à celle du milieu).

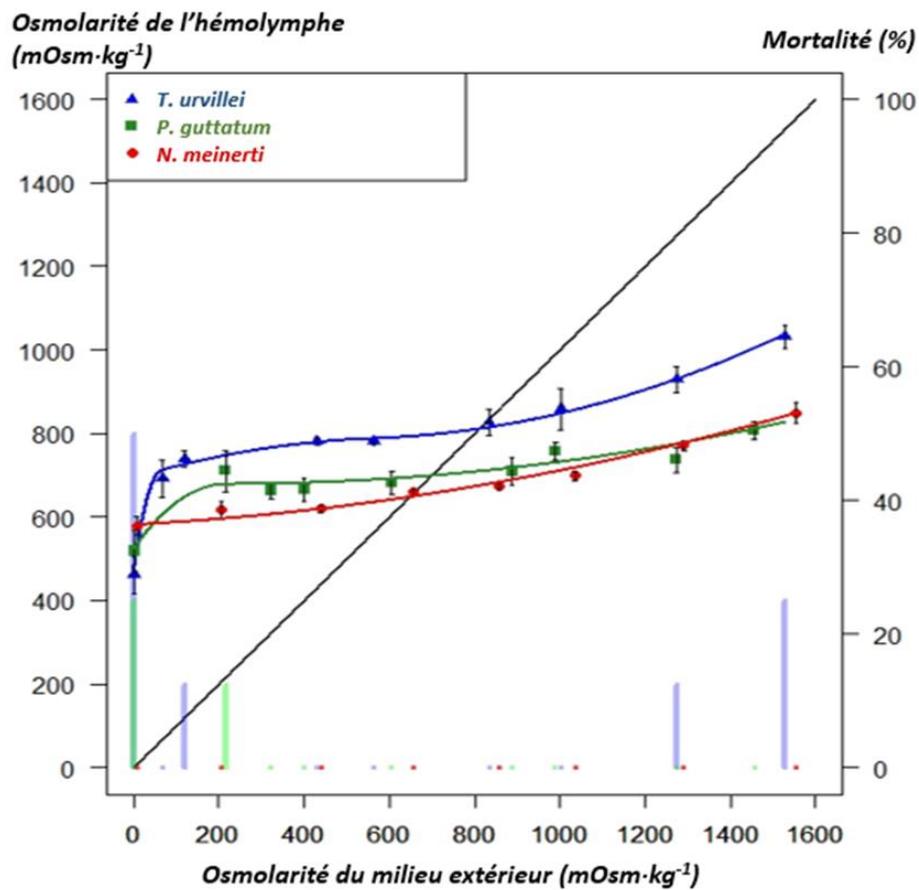


Figure 46 : Courbe d'osmorégulation et de mortalité de trois espèces de crabe de mangrove : *T. urvillei* (bleu/violet), *P. guttatum* (vert) et *N. meinerti* (rouge).

L'espèce la plus tolérante aux basses salinités est *N. meinerti* qui peut survivre et maintenir une forte capacité osmorégulatrice en eau douce. Les deux autres espèces tolèrent les basses

salinités mais montrent des mortalités de 50 % (*T. urvillei*) et 25 % (*P. guttatum*) après 72h en eau douce. *T.* supporte également moins bien les milieux hypersalés, avec un taux de mortalité de 25 % à 1550 mOsm·kg⁻¹. Par contre, *Tubuca urvillei* est l'espèce qui maintient le plus fort gradient ionique en eau saumâtre (jusqu'à 650 mOsm·kg⁻¹ lorsque l'eau est à environ 100 mOsm·kg⁻¹), alors que *N. meinerti* et *P. guttatum* maintiennent un plus grand gradient que *T. urvillei* dans les eaux sursalées (jusqu'à 750 mOsm·kg⁻¹ dans des eaux de 1550 mOsm·kg⁻¹).

En revanche, *N. meinerti*, *T. urvillei* et *P. guttatum* ne présentent pas de différences morphologiques entre animaux acclimatés à l'eau de mer par rapport à l'eau douce, mais présentent des différences entre branchies antérieures et postérieures (Figure 47A et B). Les branchies antérieures sont plus fines que les branchies postérieures chez les deux espèces et *T. urvillei* possède un épithélium branchial 2 fois plus épais (3-4 et 8-9 µm) que *N. meinerti* et *P. guttatum* (1-2 et 3-4 µm). Comme escompté, l'immunomarquage de la NKA a permis de localiser cette pompe du côté basal des cellules de l'épithélium. Ce marquage apparaît plus épais dans les branchies postérieures que dans les branchies antérieures (résultats non disponibles pour la branchie antérieure de *P. guttatum*) ce qui démontre à nouveau la spécialisation des branchies postérieures dans la régulation ionique. Ceci est également corroboré par les niveaux d'activités de la NKA, qui augmentent au niveau des branchies les plus postérieures chez *T. urvillei* et *N. meinerti*.

En microscopie électronique à balayage, il a pu être observé des bactéries sur la cuticule recouvrant les branchies postérieures (Figure 48). Celles-ci sont plus nombreuses en eau de mer (Figure 48B) qu'en eau douce (Figure 48A). Ceci pourrait être dû à la qualité de l'eau utilisée ; l'eau de mer étant naturelle alors que l'eau douce est de l'eau du robinet déchlorée. En effet, les crabes maintiennent naturellement des bactéries symbiotiques ou non au niveau des branchies qui sont en contact direct avec le milieu extérieur. Cependant, très peu d'études s'intéressent à ces bactéries et à leur rôle (Zhang et al., 2016).

L'étude du « poumon » de *P. guttatum* a confirmé son adaptation à la respiration aérienne (Figure 49). Cette structure est formée d'un repli du pleurite et est située à l'arrière de la chambre branchiale. Elle présente une large surface d'échange entre l'hémolymphe et des conduits aériens. Il s'agit donc bien d'un « poumon cutané » avec des muscles striés (Figure 49C, D) permettant d'étendre (aspect du poumon lisse) ou de contracter les conduits aériens (aspect plissé du poumon) afin d'assurer le renouvellement de l'air.

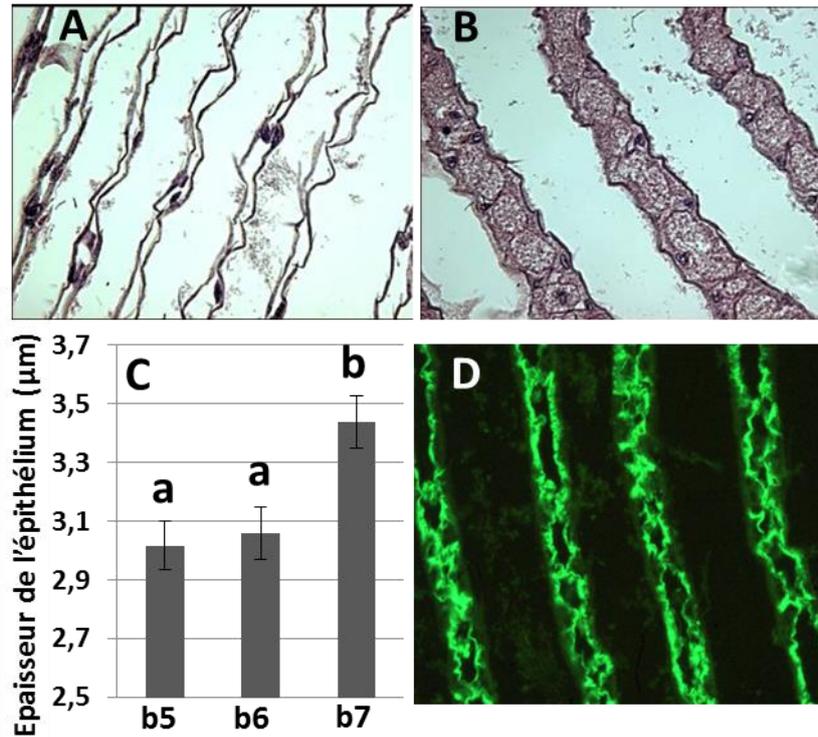


Figure 47 : Photographies de lamelles branchiales antérieures (A) et postérieures (B) de *P. guttatum*. Epaisseur de l'épithélium des branchies postérieures (5, 6 et 7) de *P. guttatum* (C) et immunomarquage de la NKA de sa sixième branchie (D). Les lamelles des branchies antérieures sont déformées et l'épithélium n'est pas visible sur toute sa longueur et n'a donc pas été mesuré ni utilisée pour l'immunomarquage de la NKA.

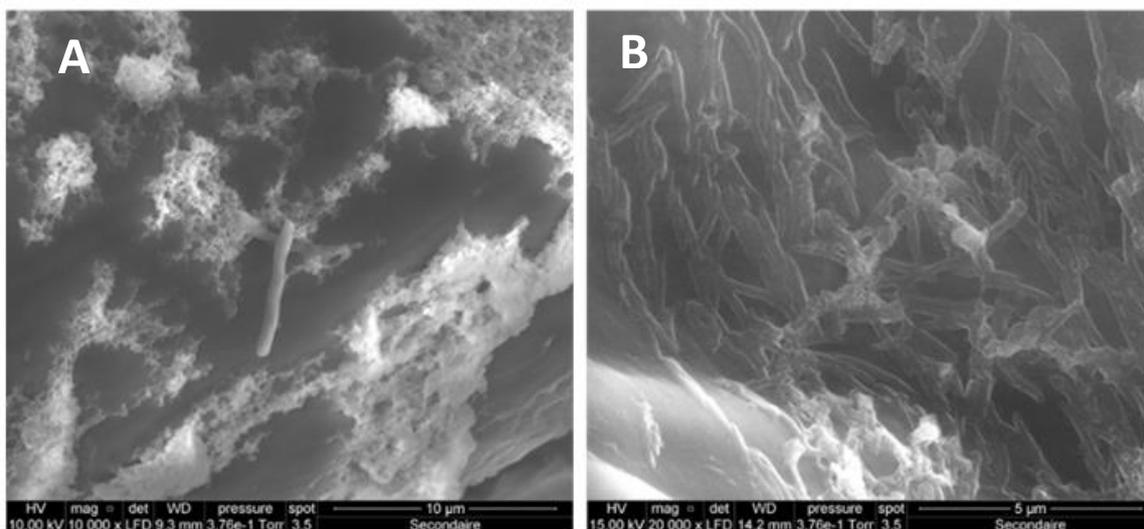


Figure 48 : Observations au microscope électronique à balayage de branchies postérieures de *P. guttatum* en eau douce (A) et eau de mer (B).

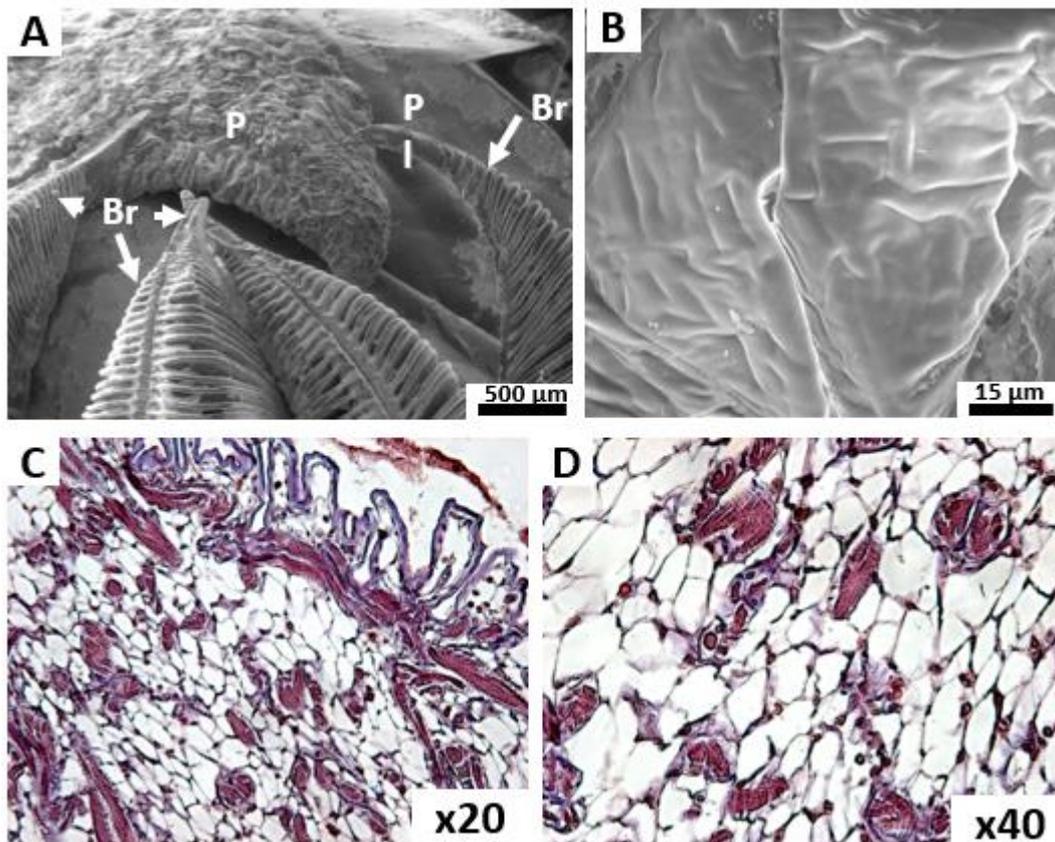


Figure 49 : Photographies au MEB de la cavité branchiale de *P. guttatum* montrant les branchies et le poumon cutané (A) et la surface lisse de ce poumon (B). Photographies des coupes histologiques du poumon cutané au niveau des replis de *P. guttatum* après coloration au Trichrome de Masson (C : grossissement x20, D : grossissement x40). Branchie (Br), Poumon (P).

Les trois espèces ne présentent pas de variation dans leur consommation en oxygène lorsqu'ils sont exposés à un choc osmotique (§3.2, Figure 50) ni à la formation d'EROs dans l'hémolymphe et peuvent donc passer d'un milieu à l'autre sans dépenser davantage d'énergie ni subir de stress oxydatif. Ces résultats sont en accord avec ceux de Frusher et al. (1994) et Gillikin et al. (2004) qui suggèrent que la distribution zonale des crabes de mangrove n'est pas liée à leur capacité osmoréglatrice.

Cependant, les courbes d'osmorégulation et les caractéristiques de l'épithélium branchial montrent des différences nettes entre *N. meinerti* et *T. urvillei*. Ainsi, *N. meinerti* montre une forte capacité osmoréglatrice aussi bien en eau sursalée qu'en eau douce alors que *T. urvillei* montre une forte capacité osmoréglatrice en eau saumâtre. Ces capacités correspondent aux

gammes de salinité rencontrées dans l'habitat de chaque espèce et montrent que leur capacité osmorégulatrice y est optimale (Henry et al., 2012; Lignot et al., 2000). *T. urvillei* est dans une zone fréquemment immergée par la marée haute, mais également à proximité de ruissellements d'eau provenant du bassin versant et cette eau devient saumâtre puis de plus en plus salée au fur et à mesure qu'elle s'écoule dans la mangrove.

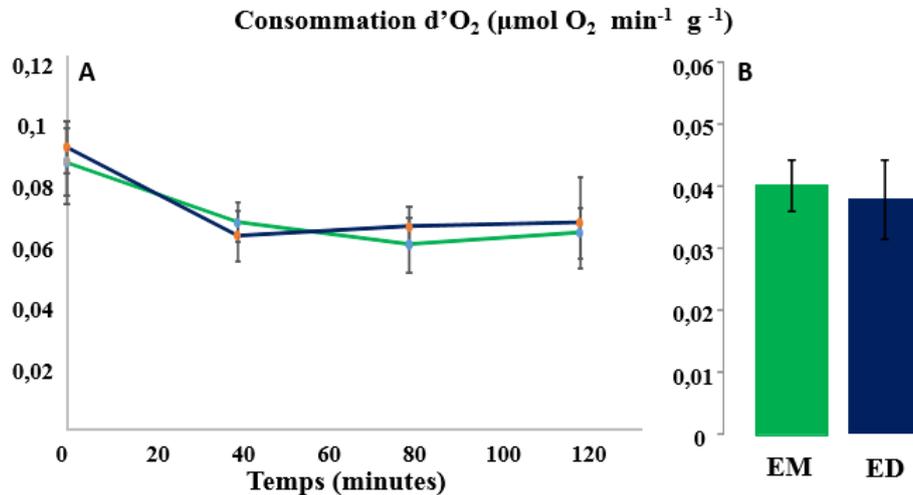


Figure 50 : Consommation d'oxygène de *P. guttatum* après (A) transfert de l'eau de mer vers l'eau douce (bleu) et l'eau de mer (contrôle, vert) et (B) respiration aérienne après 2h d'exposition à l'eau douce (ED) et l'eau de mer (EM).

La différence au niveau de l'épaisseur de l'épithélium et les activités de la NKA correspondent également à une adaptation de *T. urvillei* à la proximité de ruissellements drainant de l'eau légèrement saumâtre à salée (250-500 mOsm·kg⁻¹). De telles différences ont également été observées chez les crabes d'eau douce *Dilocarcinus pagei* (Furriel et al., 2010) et *Potamon niloticus* (Maina, 1990). Des épithélia aussi épais que ce qui a été observé chez *T. urvillei* ont été mesurés chez *Leptuca uruguayensis* (Luquet et al., 1995), espèce qui vit également à proximité de ruisseaux, mais aussi chez des écrevisses d'eau douce (Burggren et al., 1974; Fisher, 1972). L'importante épaisseur de la branchie postérieure est également une adaptation à la vie terrestre (Taylor and Greenaway, 1979) car la distance de diffusion entre l'hémolymphe et l'air limite les échanges gazeux ce qui réduit la contribution des branchies à la respiration tout en permettant de limiter la perte d'eau. Ces branchies sont alors davantage impliquées dans l'osmorégulation mais également dans la régulation acido-basique et l'excrétion de l'ammonium (Morris, 2001; Weihrauch et al., 2017, 2004).

Neosarmatium meinerti, Tubuca urvillei et Parasesarma guttatum sont d'excellents hyper-hypo-osmorégulateurs.

Les trois espèces peuvent facilement passer de l'eau salée à l'eau douce, sans dépense énergétique supplémentaire ni réorganisation morphologique et physiologique au niveau de la branchie.

Tubuca urvillei et Parasesarma guttatum montrent des taux de mortalité après 72h de 50 et 25 % respectivement en eau douce (5 mOsm·kg⁻¹) mais aucune mortalité en eau saumâtre.

Tubuca urvillei est particulièrement adapté à la vie terrestre et aux eaux saumâtres.

**Chapitre 4: Effets des eaux usées en milieu
contrôlé**

4.1 Introduction

Après avoir décrit l'écophysiologie de l'osmorégulation de *N. meinerti*, *T. urvillei* et *P. guttatum*, ainsi que leur tolérance par rapport aux variations de salinité, ce chapitre traite de l'impact aigu d'eaux usées domestiques provoqué en milieu contrôlé. C'est une exposition courte (5h) par rapport aux tests de toxicité classiques (24h, 72h, 92h, etc.) mais adaptée au système intertidal. En effet, la durée d'exposition effective aux eaux usées déversées en mangrove sur le site de Malamani dépend du temps écoulé avant le retour de la marée haute qui dépend lui-même de l'étage dans la mangrove et du coefficient de marée. Le protocole expérimental choisi impose aussi un contact direct des crabes avec des eaux usées sans dilution bien qu'une dilution se produise dans le milieu naturel avec les eaux de ruissellement et les eaux interstitielles. Cette dilution doit dépendre du coefficient de marée mais est surtout déterminée par le niveau hydrostatique et l'importance des eaux de ruissellements, par exemple après des précipitations locales.

Ces études sont innovantes, l'impact de rejet d'eaux usées sur la physiologie des crabes de mangrove ayant seulement été étudié dans le cadre d'un projet mené au Kenya et au Mozambique en milieu naturel et en mésocosme (projet 'PUMPSEA') (Amaral et al., 2009b; Bartolini et al., 2009; Cannicci et al., 2009; Penha-Lopes et al., 2009b). Notre étude se démarque de ce projet pourtant déjà très complet par l'étude d'une parcelle naturelle directement impactée. En effet, les autres études ont utilisé des mésocosmes ou analysé des mangroves péri-urbaines dans lesquelles le rejet d'eaux usées n'est ni contrôlé en termes de débit, ni en termes de calendrier, ni même en termes de dispersion. Ces études ont démontré que le rejet d'eaux usées peut avoir un impact par exemple, sur la reproduction : *Paraleptuca annulipes* a ainsi une meilleure fécondité mais une plus grande perte d'œufs. Ceci est également le cas pour *Parasesarma guttatum* mais cela n'augmente pas sa fécondité. Egalement, la densité des crabes de mangrove augmente contrairement aux densités des gastropodes et oligochètes qui diminuent. Ces analyses démontrent néanmoins qu'il manque des données physiologiques pour mieux comprendre les mécanismes internes qui peuvent s'opérer suite à une exposition chronique aux eaux usées (Amaral et al., 2009a). De plus, si une partie de ces études pointe le peu de différences entre zone contaminée et zone témoin sur les crabes de mangrove, et ce, de manière cohérente avec les résultats précédents de Yu et al. (1997), le rapport final de l'étude PUMPSEA indique que les eaux usées ont bien un effet à l'échelle individuelle, au niveau de

la population et au niveau des communautés, ce qui pourrait provoquer une modification profonde de l'écosystème (PUMPSEA, 2008).

L'exposition aux eaux usées engendre à la fois un stress osmotique et un stress dû à sa charge en polluants divers. L'analyse de la fonction osmorégulatrice au niveau des branchies (épithélium plus ou moins épais pour assurer les échanges ioniques et gazeux) est donc un choix évident pour étudier cet impact. L'analyse du stress oxydatif qui est couramment utilisée pour déterminer la perturbation de l'homéostasie interne et cellulaire ainsi que la balance énergétique (respirométrie individuelle et des branchies isolées) ont permis de compléter cette approche physiologique. L'étude a d'abord portée sur le crabe *N. meinerti*. En effet, sa présence importante dans l'arrière mangrove de Malamani et sa taille en font un modèle de choix. De plus, il a été rapporté que celui-ci est moins présent dans les parcelles impactées (Kissimati Abdallah, com. pers.). Deux autres espèces ont aussi été étudiées, *T. urvillei* utilisée ici comme espèce modèle des crabes violonistes (anciennement regroupés dans le genre *Uca*) et *P. guttatum*, seule espèce dont l'abondance n'est pas impactée négativement par ce rejet. En effet, si cette espèce est déjà dominante dans le faciès à *Cerriops*, sa présence est encore plus accentuée dans les parcelles impactées (Kissimati Abdallah, pers. com.).

Dans ce chapitre, nous évaluerons l'impact des eaux usées après une exposition aigue (5h) sur plusieurs biomarqueurs au niveau : i) l'hémolymphe (osmorégulation & stress oxydatif), ii) des branchies (osmorégulation & balance oxydative & métabolisme énergétique) et iii) au niveau de l'organisme entier (métabolisme énergétique).

A la fin de cette exposition, l'hémolymphe des crabes a été prélevée pour analyse de la pression osmotique et de la production en EROs. Les crabes ont ensuite été anesthésiés afin de prélever les branchies qui seront utilisées soit directement pour la respirométrie (en chambre métabolique) soit ultérieurement pour des mesures biochimiques (activité de la pompe à sodium, de la SOD et de la catalase, mesure du MDA). Pour ces mesures biochimiques, les branchies ont été congelées instantanément (à l'aide d'alcool à -80°C pour les analyses en laboratoire ou d'azote liquide pour les analyses sur le terrain) et stockées à -80°C. La mesure de la consommation d'oxygène des organismes entiers a été réalisée avant et après transfert en eaux usées (jusqu'à 2 à 5h d'exposition) avec d'autres individus qui ont ensuite été relâchés.

4.2 Effet des eaux usées domestiques sur le crabe de mangrove *Neosarmatium meinerti*

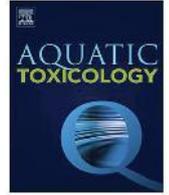
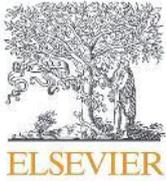
Cette étude a été publiée sous forme d'article dans la revue **Aquatic toxicology**.

4.2.1 Introduction

Le crabe *N. meinerti* est très présent dans l'arrière mangrove de Malamani jusqu'au faciès à *Cerriops* (Bouchard et al., 2013), mais également dans toutes les mangroves du sud-est de l'océan Indien dans ces mêmes faciès (Dahdouh-Guebas et al., 2002; Emmerson, 2001; Flores et al., 2003). Sa proportion dans la communauté des crabes diminue dans la parcelle impactée (Capdeville et al., 2018), laissant supposer des conséquences importantes sur le fonctionnement de l'écosystème du fait de son rôle d'ingénieur (voir §2.3). Il s'agit d'un très bon hyper-hypo osmorégulateur. En effet, aucune mortalité n'a été observée après 72h d'exposition à une large gamme de salinité allant 0 à 1550 mOsm·kg⁻¹ (voir §3.2). Sa forte tolérance à l'eau douce permet d'étudier l'impact des polluants des eaux usées sans le choc osmotique associé. En effet, dans la mangrove, les crabes sont dans un milieu hyper-osmotique avant de recevoir les eaux usées dont la salinité est proche de l'eau douce. Ainsi, après 72h d'acclimatation en eau de mer, *N. meinerti* a été placé pendant 48h en eau douce pour qu'il s'acclimate à une basse salinité avant d'être transféré pendant 5h en eaux usées (voir Figure 45). L'évaluation des effets des eaux usées à l'échelle individuelle a été ciblée en prenant en compte différents biomarqueurs :

- Energétiques via la consommation en O₂ de l'individu et des branchies isolées, ainsi que le rythme ventilatoire
- De l'osmorégulation : pression osmotique de l'hémolymphe, activité de la NKA et épaisseurs de l'épithélium des branchies antérieures et postérieures
- Du stress oxydatif : production d'EROs dans l'hémolymphe, enzymes antioxydantes (SOD, catalase) et dégâts aux lipides (MDA) dans les branchies antérieures et postérieures

4.2.2 Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: Integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species



Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: Integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species

Dimitri Theuerkauff^{a,b,*}, Georgina A. Rivera-Ingraham^a, Yann Mercky^{a,b}, Mathilde Lejeune^a, Jehan-Hervé Lignot^a, Elliott Sucre^{a,b}

^a UMR MARBEC (University of Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD), Montpellier, France

^b Centre Universitaire de Mayotte, Route Nationale 3, BP 53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Domestic effluent
Neosarmatium
 Respiration
 Oxidative stress
 Osmoregulation
 Mayotte

ABSTRACT

Mangroves are increasingly used as biofiltering systems of (pre-treated) domestic effluents. However, these wastewater discharges may affect local macrofauna. This laboratory study investigates the effects of wastewater exposure on the mangrove spider crab *Neosarmatium meinerti*, a key engineering species which is known to be affected by waste waters in effluent-impacted areas. These effects were quantified by monitoring biological markers of physiological state, namely oxygen consumption, the branchial cavity ventilation rate, gill physiology and morphology, and osmoregulatory and redox balance. Adults acclimated to clean seawater (SW, 32 ppt) and freshwater (FW, ~0 ppt) were compared to crabs exposed to wastewater for 5 h (WW, ~0 ppt). Spider crabs exposed to WW increased their ventilation and whole-animal respiration rates by 2- and 3-fold respectively, while isolated gill respiration increased in the animals exposed to FW (from 0.5 to 2.3 and 1.1 nmol O₂ min⁻¹ mg DW⁻¹ for anterior and posterior gills, respectively) but was not modified in WW-exposed individuals. WW exposure also impaired crab osmoregulatory capacity; an 80 mOsm kg⁻¹ decrease was observed compared to FW, likely due to decreased branchial NKA activity. ROS production (DCF fluorescence in hemolymph), antioxidant defenses (superoxide dismutase and catalase activities) and oxidative damage (malondialdehyde concentration) responses varied according to animal gender. Overall, this study demonstrates that specific physiological parameters must be considered when focusing on crabs with bimodal breathing capacities. We conclude that spider crabs exposed to WW face osmoregulatory imbalances due to functional and morphological gill remodeling, which must rapidly exhaust energy reserves. These physiological disruptions could explain the ecological changes observed in the field.

1. Introduction

Mangroves are a unique type of ecosystem, characterized by coastal forests located in the intertidal zone of tropical and subtropical regions. Several studies carried out over the last 20 years have demonstrated that mangroves can be used for wastewater (WW) processing (Boonsong et al., 2003; Leung et al., 2016; Wickramasinghe et al., 2009; Wong et al., 1997; Ye et al., 2001). For instance, mangrove forests in China, Thailand, India, Tanzania, and Kenya have a natural potential for wastewater treatment by efficiently eliminating excess nutrients and organic matter (Jiththaisong et al., 2012; Lee et al., 2014; Li et al., 2011; Ouyang and Guo, 2016; Turcios and Papenbrock, 2014; Wong et al., 1997; Yang et al., 2008)

In Mayotte, one of the main islands of the Comoros archipelago

(Mozambique Channel) (Fig. 1A), mangrove forests cover 1.9% (703 ha) of the land surface (Jeanson et al., 2014). In the past 17 years, the population of this island has tripled to almost 215 000 inhabitants in 2012 (INSEE, 2012). This demographic explosion has raised a number of environmental concerns, including the crucial question of wastewater treatment on this island. Since 2007, a bioremediation pilot study has been observing the discharge of domestic pre-treated effluent from an Imhoff tank belonging to the Water Syndicate of Mayotte (SIEAM) into the Malamani mangrove (see Herteman, 2010) (Fig. 1B). The WW effluent (Table 1) is directly discharged into experimental plots and is partially absorbed by the mangrove, which responds with a reinforcement of the nutrient cycle and a closure of the canopy (Herteman et al., 2011). However, existing studies on the impact of WW on mangrove macrofauna are contradictory and further specific

* Corresponding author at: UMR MARBEC (University of Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD), Montpellier, France.
 E-mail address: dimitri.theuerkauff@umontpellier.fr (D. Theuerkauff).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.003>

Received 26 August 2017; Received in revised form 30 November 2017; Accepted 4 January 2018

Available online 06 January 2018

0166-445X/© 2018 Published by Elsevier B.V.

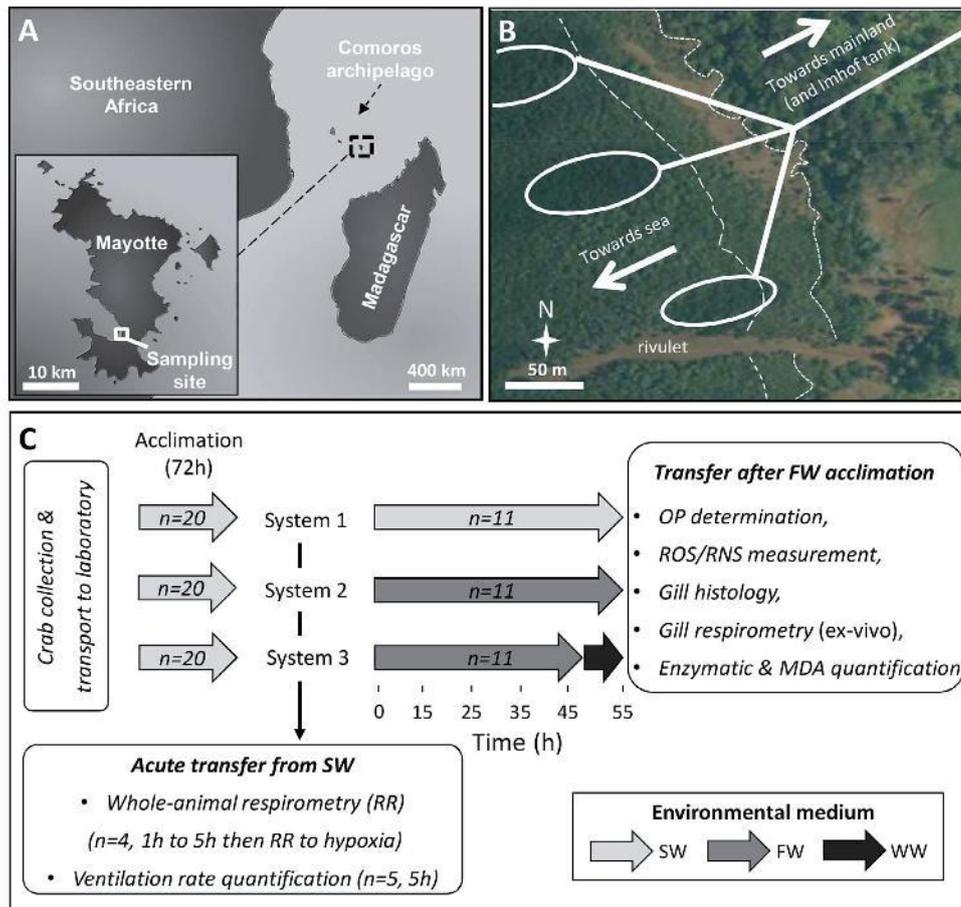


Fig. 1. Location of the Comoros archipelago and the study site in Mayotte (A); aerial view of the collecting site at Malamani mangrove (B). Dotted line indicates the upper limit where *N. meinerti* was sampled while the dashed line indicates the boundary between the *Avicenia marina* and *Cerriops tagal* belts. Continuous white lines show the WW distribution system while the areas affected by WW release are enclosed in circles. In this WW discharge area, well-developed mangrove trees can be observed (see Herteman, 2010). Spider crabs *N. meinerti* as well as the SW samples used for chemical analyses were collected within the *Avicenia marina* and *Cerriops tagal* belts in non-impacted sites. (C) Experimental set-up: during the acclimation time, each system contained 20 animals. Then, 27 crabs were used for respirometry and ventilation rate measurements while another 33 crabs were used for the rest of the analyses considered in this study.

Table 1

Chemical characterization of SW, brackish water (from rivulet) and WW (partly modified from Herteman, 2010). N.A. = data not available. Water was collected at low tide in crabs' burrow of pristine area (Fig. 1B) and in the rivulet (Fig. 1B) respectively.

| | SW | | Rivelet | | WW | |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Min. value | Max. value | Min. value | Max. value | Min. value | Max. value |
| NH ₄ -N (μM) | 6 | 18 | 8 | 49 | 325 | 3800 |
| PO ₄ (μM) | 0.05 | 0.3 | 4 | 40 | 50 | 180 |
| Salinity (ppt) | 35.6 | 40.4 | 8.9 | 20.8 | 0.3 | 1.0 |
| pH | 6.96 | 7.40 | na | na | 6.0 | 7.5 |

physiological studies are needed (Amaral et al., 2009; Bartolini et al., 2009; Cannicci et al., 2009; Fusi et al., 2016; Penha-Lopes et al., 2009b; Yu et al., 1997). In Malamani, WW discharges occur for one hour at every other low tide of the day, a process which has already been shown to have a direct effect on the local crab populations (Herteman, 2010). In the areas with regular WW discharges, the group distribution changes and a marked decrease is observed in crab burrow density (Herteman, 2010). However, the burrowing mangrove crab is a key engineer species that plays a key role in the mangrove ecosystem: their bioturbation and organic matter degradation activities are crucial in element transfer within the matter cycle and allow the maintenance of sediment biochemical heterogeneity (Emmerson and McGwynne, 1992; Kristensen, 2008; Lee, 1998; Penha-Lopes et al., 2009a; Smith et al., 1991). They are also involved in the bioremediation process, as their burrows allow WW to enter the sediment. It is therefore crucial to identify the driving factors forcing some of these key ecological engineers to escape from the affected plots. In the long term, WW discharges could induce profound and global modifications of the

ecological functioning of mangrove ecosystems. Previous work conducted in Malamani mangrove has highlighted that the spider crab *Neosarmatium meinerti* (Sesarmidae, de Man, 1887) is the crab species that is the most affected by WW discharges, and particularly those located in the forest belt dominated by *Cerriops tagal* (K. Abdallah, unpublished data). Some specimens identified as *N. meinerti* found in Mayotte could in fact be *N. africanum*, but we attribute them to *N. meinerti* in this work, until confirmation of their origin is obtained by DNA sequencing (Bouchard et al., 2013; Ragionieri et al., 2012, 2009). *N. meinerti* is among the largest and most dominant mangrove crab species in the area, and is most frequently found in the upper part of the mangrove forest (from the *Cerriops tagal* up to the *Avicenia marina*). The spider crab is one of the dominant mangrove crab species and plays a key role in structuring this area of the mangrove system (Fusi et al., 2015; Gillikin et al., 2004). It has a bimodal breathing capacity and is exposed to drastic salinity variations, ranging from hypersaline conditions (at low tide and during the dry season) to high levels of fresh water originating from run-off streams during the rainy season. Previous work on crab populations in Madagascar has demonstrated that the spider crab is a powerful osmoregulator capable of tolerating the acute salinity changes of the upper intertidal area they inhabit (Gross et al., 1966). Although most toxicological studies focus on model species or on species that are of commercial interest, examining the impact of pollutants on resident species such as *N. meinerti* could reveal how this species permits important ecological changes through the decrease in sediment bioturbation activity.

In the field of stress ecophysiology, it has been suggested that organism tolerance to environmental stressors may be predicted using energy-related biomarkers (Sokolova et al., 2012). However, a common consequence of aerobic metabolism is the production of free radicals, reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) that have hormetic

effects on organisms, and thus, are highly deleterious at high concentrations. Moreover, crabs may respond to pollutants with ROS production and alterations of antioxidant defenses, such as catalase and superoxide dismutase activities, parameters which have been largely used to assess their oxidative stress (Rodrigues and Pardal, 2014).

The aim of this study is to use controlled laboratory manipulations to identify the main physiological constraints that could explain why spider crabs are less present in experimental plots affected by regular WW discharges. The study examined respiratory profiles, redox metabolism and osmoregulatory mechanisms in crabs exposed to seawater (SW), freshwater (FW) and WW.

2. Materials and methods

2.1. Animal collection from the field and laboratory maintenance

In October 2015, adult *N. meinerti* were collected at low tide from an undisturbed area of the Malamani mangrove (Boueni bay, Mayotte island, 12°55'1"S, 45°9'23"E) in the Comoros Archipelago (Fig. 1A and B). Spider crabs were then directly transported to the laboratory at the University Center of Mayotte (CUFR, Dembeni). Crabs were distributed among three flow-through systems, (Fig. 1C) each consisting of a series of interconnected individual plastic boxes of 12 × 8.5 × 5 cm, ¾ filled with aerated and filtered SW (salinity ~33‰; 1050 mOsmol kg⁻¹), as described in a previous publication. Crabs were allowed to acclimate in these boxes for 3 days and were fasted throughout the experiments, with a maximal fasting period of 6 days.

2.2. Acute transfer from SW: whole-animal respiration and ventilation rates after acute transfer to FW and WW

Following a 72 h acclimation period in SW, whole-animal respiration rates for twelve spider crabs (4 individuals per treatment) were obtained. Each crab was placed in an individual 750 ml air-tight transparent metabolic chamber equipped with an oxygen optode (PyroScience GmbH, Aachen, Germany) glued to the inner wall and calibrated to 100% and 0% air saturation using air-saturated water and 80 mM Na₂SO₃ solution, respectively. A magnetic stirrer (separated from the animals by a plastic mesh structure to reduce disturbance) ensured correct O₂ mixing in the water column. The chambers were opened and aerated 10 min before starting O₂ measurements to avoid any effect of handling stress during the experiments. A first measurement was carried out in SW. The water was then replaced by clean SW, FW or WW, with O₂ measurements carried out at 1, 2 and 5 h post-change. The water was aerated between each measurement to maintain normoxic conditions in the chambers. All measurements lasted a maximum of 10 min and the air saturation (*p*O₂) was never allowed to decrease below 65% in any except the last measurement (*T* = 5 h), for which animals were allowed to breathe in their chambers until complete anoxia occurred. Crabs were later weighed to express results per g of body weight (BW). Results were corrected by subtracting the value of their corresponding blank, i.e. measurements conducted with SW, FW and WW in empty metabolic chambers. All data were registered using a 4-channel FireSting (Pyro-Science GmbH, Aachen, Germany).

When appropriate, a critical *p*O₂ (*p*_cO₂) value was used to indicate the onset of anaerobic metabolism. Following Duggleby's protocol (1984), calculations were based on a section-wise linear regression of each respirometric curve. Above this point animals breathe in an oxygen-regulating manner (independent of environmental *p*O₂) and below it, respiration follows an oxyconforming pattern.

For ventilation rate calculations, 15 crabs (5 per treatment) were placed in small individual glass aquaria (6 × 12 × 4.5 cm; width × length × height) and were filmed using a video camera (GoPro, Woodman Labs Inc) for 15 min after 5 h of immersion in WW, SW or FW. The beating frequency of the scaphognathite, a leaf-like appendage on the second maxilla in Decapods controlling the water

flow in the branchial cavity, was recorded by counting the beats produced on the right-hand side of motionless animals using 2 video sequences of at least 3 min of steady beats (see Dyer and Uglow, 1978, p. 212). All video recordings were obtained during the daytime using similar light conditions.

2.3. Experimental set-up for short-term exposure to WW after 2 days of acclimation in FW

After the 3-day acclimation period in SW, the water was changed in each system for all remaining crabs (Fig. 1C): the water in the first system was replaced with clean SW, while the second and third systems were replaced with FW (5 mOsm kg⁻¹, ~0 ppt). The water content from each system was changed again after 2 days: the first system was refilled with clean SW again (i.e. SW to SW), the second system was supplied with clean FW (SW to FW), and the third with wastewater (WW) (FW to WW) (Table 1), which was freshly collected directly from the Imhof tank at the Malamani experimental site (Herteman et al., 2011). All animals were sacrificed 5 h after this last change. This time is considered to match the effective exposure to FW and WW in the field given that WW discharge occurs for one hour at every second low tide per day, and one hour before the end of the ebb tide.

2.4. Animal sampling

Five hours after the introduction of WW in the third system, a minimum of 10 spider crabs per treatment were sampled. Males and females were used in the same proportion for all experiments. Hemolymph samples were obtained using a 0.5-ml syringe by inserting the needle between the cephalothorax and the first pereopod. Fresh hemolymph samples were used for osmotic pressure (OP) determination and reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) quantification, as described below. Crabs were then weighed and anesthetized on ice for gill sampling. Gill pairs were divided into two groups, according to their osmoregulatory function (Copeland and Fitzjarrell, 1968; Neufeld et al., 1980; Theuerkauff et al., submitted). Anterior pairs 1–4 were considered as respiratory gills, while posterior pairs 5–8 were considered as respiratory and osmoregulatory gills. Freshly excised left-side gill pairs 2 and 5 were used for ex-vivo respirometric analyses, as described below (Section 2.5). The first anterior and last posterior gills (left-side pairs 1 and 8) were fixed for histological analyses (Section 2.7). The remaining anterior and posterior gills were flash frozen and conserved separately at –80 °C for further enzymatic activity analyses (see details in Sections 2.6 and 2.7). For this study, only animals in intermolt stage (C3) were considered, which was verified through epipodite examination under a dissecting microscope after gill dissection to avoid handling-associated stress on the biological markers considered.

2.5. Respiratory measurements in the gill

Freshly excised anterior and posterior gills were placed in 300 µl transparent metabolic chambers equipped with a calibrated oxygen optode, as previously described in Section 2.2. The osmolality of the measuring medium was calculated as the average PO of crab hemolymph for each treatment (SW = 848 mOsm kg⁻¹; FW = 664 mOsm kg⁻¹; WW = 587 mOsm kg⁻¹). Measurements were thus carried out in isotonic SW supplemented with 10 mM glucose to maintain gill metabolism. All measurements started in fully oxygenated water and lasted a maximum of 80 min. Gills were then dried for 48 h at 58 °C in order to express gill respiration rates per mg of dry weight (DW) and calculations were made as previously described in Section 2.2.

2.6. Assessment of ROS/RNS formation, antioxidant defenses and oxidative damage

Triplicates of 5 μ l of hemolymph samples were mixed with 140 μ l of the isotonic saline solutions used for assessments of gill respiration. Reactions were initiated through the addition of 5 μ l of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma 35848) to achieve a final concentration of 10 μ M. The fluorescence signal produced by the conversion of DCFH-DA in its fluorescent form (2', 7'-dichlorofluorescein, or DCF) following oxidation by ROS/RNS was read in a flat-bottom black microplate (excitation: 590 nm; emission: 510 nm) with a Tecan infinit F200 PRO (Tecan Group Ltd., Austria) every minute for 20 min. As DCF fluorescence could vary according to salinity differences (Rivera-Ingraham et al., 2016), a standard curve with H₂O₂ was performed for each salinity treatment. Although DCF is not H₂O₂-specific (Grisham, 2012; Kalyanaraman et al., 2012), H₂O₂ was still used since it is the most stable and most abundant ROS product in animal cells.

For each exposed crab, antioxidant defenses were quantified as the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), then measured spectrophotometrically in one right-side anterior (gill 3) and one posterior gill (gill 5). All frozen samples were diluted to 1:40 and 1:10 (w:v) for SOD and CAT measurements, respectively, in a 50 mmol l⁻¹ KPi buffer with 120 mmol l⁻¹ KCl (pH = 7.0). Tissue homogenization was achieved using three steel balls (Retsch, n°. FR0120) in a Mixer Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Germany; 30 s at 30 beats s⁻¹). SOD activity was determined using the protocol of McCord and Fridovich (1969) modified by Livingstone et al. (1992). CAT activity was measured in supernatants following the decomposition of H₂O₂ in a 50 mmol l⁻¹ KPi buffer, as described by Aebi (1984). All measurements were carried out at least in triplicates using a microplate reader. Throughout all these procedures, samples were preserved on ice and results were expressed per mg of proteins, which were quantified in triplicates according to Bradford (1976) with bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), following standard procedure.

Concentration of malondialdehyde (MDA), a product resulting from lipid peroxidation, was used to estimate oxidative damage in anterior and posterior gills from one right-side anterior (gill 4) and one posterior gill (gill 6). MDA was quantified through measurements of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), using the protocol originally described by Uchiyama and Mihara (1978) and further modified by Abele et al. (2002).

2.7. Osmoregulatory capacity (OC), gill histological morphometry and NKA activity

Hemolymph and medium osmolalities were measured in duplicate by freezing point depression osmometry using an Advanced™ Micro-Osmometer, model 3300 (Advanced Instruments, Inc.) using 20 μ l per sample. The OC was calculated as the absolute difference between the osmotic pressure of the hemolymph and of the external medium.

For histological purposes, left-side gill pairs 1 and 8 were rinsed in 70% ethanol following immersion in Bouin's fixative solution for 48 h. Gills were then dehydrated in a series of graded alcohols and embedded in paraffin. Sections measuring 4 μ m were cut with a Leitz Wetzlar microtome, then carefully placed on poly-L-lysine-precoated glass slides, deparaffinated and stained following Masson's Trichrome Staining Protocol (Martoja and Martoja-Pierson, 1967). Samples were then examined using an Olympus BX60 microscope equipped with a Jenoptik (ProgRes C3) digital camera and the associated software CapturePro v2.8.8 (Jenoptik Optical Systems GmbH, Jana, Germany). Epithelial gill thicknesses were measured from areas where the nuclei were visible using a x40 objective. Along this single-layered epithelium, cell heights were systematically measured from the base of the cuticle to the basal side of the cells facing the hemolymph lacuna. For statistical purposes, gills were divided into three sections along longitudinal

(basal, central and apical) and transversal axes (proximal, middle and distal). For each of these areas, photographs were taken at the same magnification (x60) using the CapturePro software. Measurements of epithelial gill thickness were then performed using Image J (NIH, Rasband WS).

The Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) activity was determined on the 2nd and 7th right-side gills by homogenizing tissues separately in MIIM buffer (250 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, pH: 7.4) at a 1:6 (w:v) ratio. After centrifugation, protein concentration in supernatants was determined colorimetrically according to Bradford (1976) using BSA as a standard. All samples were diluted to achieve equal protein concentrations. The specific ouabain-sensitive NKA activity in these supernatants was measured using a protocol adapted from Flik et al. (1983) using 3 mM ATP, 5 mM MgCl₂ with ouabain adjusted to 2.8 mM.

2.8. Statistics

All statistical analyses were performed in R version 3.2.3 (R Core Team, 2015) with RStudio Version 0.99.891 (RStudio, Inc). The Shapiro-Wilk test was used to test normality and the Bartlett test was used to test the homogeneity of variances. If data did not meet the assumptions of normality and homogeneity of variance, they were log transformed. For crab body weight, scaphognathite beats, osmoregulatory capacity and whole animal respiration rates, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test the null hypothesis of no difference between treatments. A two-way ANOVA was performed on gill respiration rates and NKA activities (gill position and treatment), on the epithelial thickness of posterior gills (transversal axis and treatment) and ROS production in hemolymph (sex and treatment). A 3-way ANOVA was then used to test the null hypothesis of no difference in antioxidant defenses and oxidative damage according to sex, gill position and treatment, and in gill epithelial thickness according to gill position, longitudinal axis and treatment. All factors were considered orthogonal and fixed. ANOVA tests were followed by a Tukey's HSD post hoc comparison test and the significance level was $p < 0.05$. Critical pO₂ and crab body weight between male and female were compared using Student's *t*-test. All values are represented as average \pm SEM.

3. Results

Crab body weight was significantly different between males and females: 42.8 g \pm 2.26 g and 29.7 g \pm 3.62 g, respectively (Student's *t*-test; $t = 5.5$; $p < 0.001$) but not between treatments (one-way ANOVA; $F = 0.43$; $df = 2$; df error = 28; $p = 0.66$). Unless stated, no sex-related differences were recorded and thus, for those cases, only pooled results are shown.

3.1. Respiration and ventilation measurements

Under normoxic conditions in SW and FW, spider crab respiration rates (RR) showed an average of 25.4 \pm 0.5 nmol O₂ min⁻¹ g BW⁻¹ (Figs. 2 and 3). Animals maintained in SW and those subjected to an acute transfer to FW after 1 h in SW significantly decreased their RR by 50% and remained in general terms equal between them and constant during the 5-h exposure. These values significantly differed from those recorded in animals transferred to WW (one way ANOVA; $F = 14.3$; $df = 11$; df error = 35; $p < 0.001$), which showed a 3-fold increase in RR after just 1 h of exposure and remained stable at an average of 80.4 nmol O₂ min⁻¹ g BW⁻¹ through the experiment. Ventilation rates showed the same pattern, with a 1.7-fold increase in scaphognathite beats (one way ANOVA; $F = 19.4$; $df = 2$; df error = 13; $p < 0.001$) when crabs were transferred from SW to WW (Fig. 4A).

Full respirometric profiles of spider crabs reveal significant differences between treatments. Animals showed a clear oxyregulating capacity, and WW significantly influenced average RR above p_{cO_2}

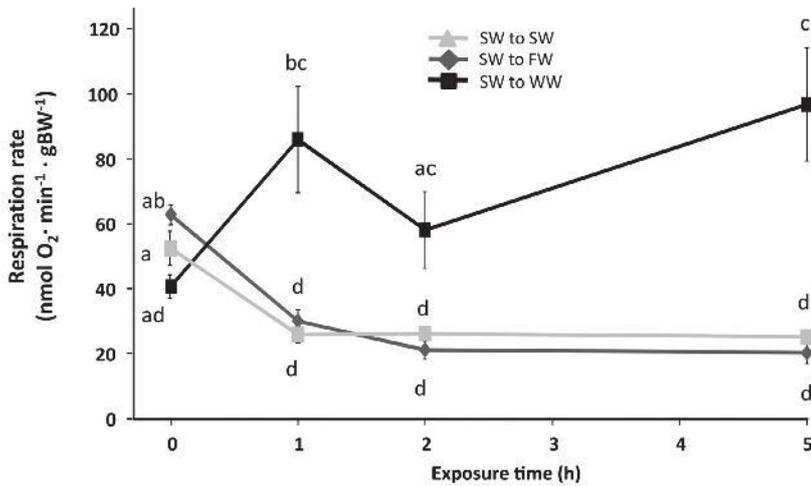


Fig. 2. Whole crab respiration rates under normoxia after acute transfer from SW (time = 0 h) to SW, FW or WW at 1, 2 and 5 h exposure. Different letters represent statistically significant differences at $p < 0.05$ (one-way ANOVA). gBW: gram of (fresh) body weight.

(WW > SW and FW, one-way ANOVA; $F = 21.8$; $df = 1$; df error = 12; $p < 0.001$) (Fig. 3A). While no p_cO_2 was detected for animals exposed to WW, the respirometric profiles of both SW and FW-acclimated crabs showed p_cO_2 values of 29.6% and 22.9%, respectively (Student's t -test;

$t = 2.7$; $p < 0.05$) (Fig. 3B).

In SW, anterior and posterior gills showed no significant differences in RR (Fig. 4B). However, gills from animals exposed to WW and FW showed significantly increased RR, although this increase is higher for

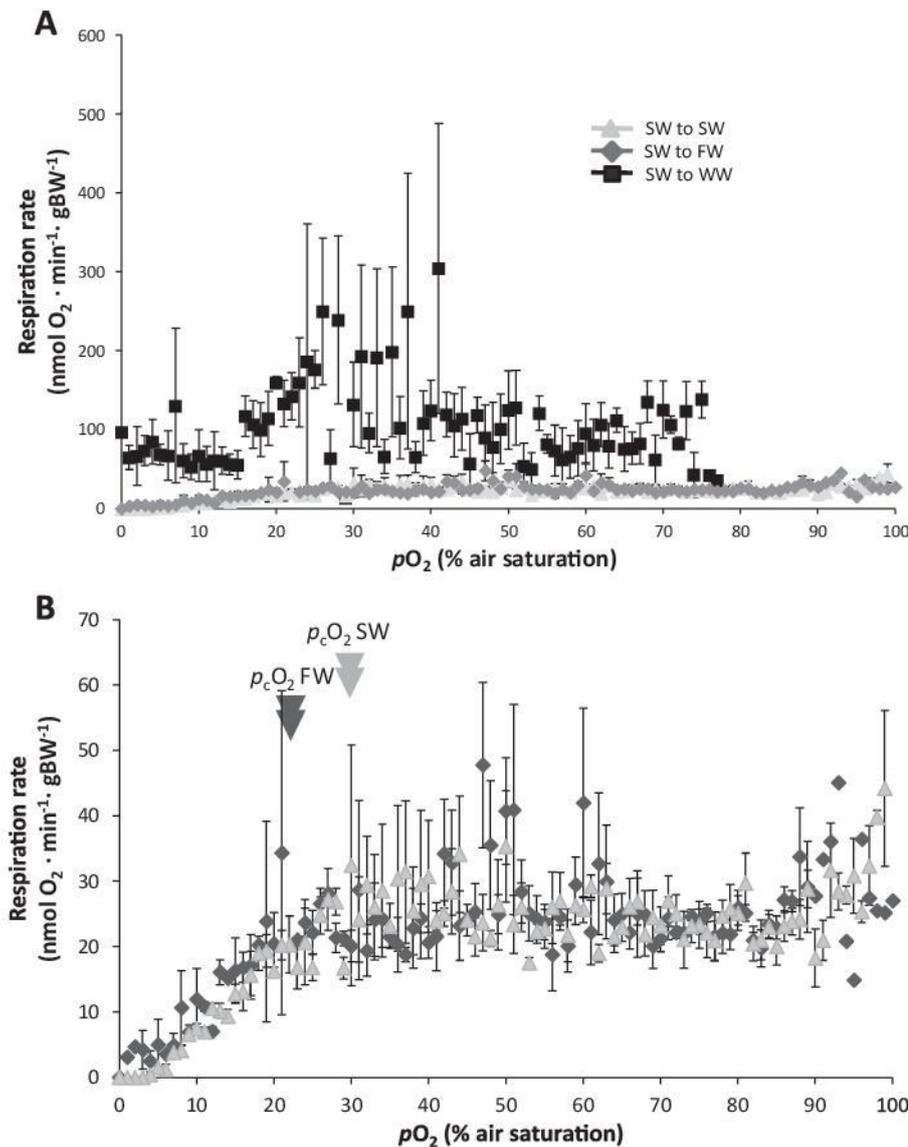


Fig. 3. Whole crab respiration rate according to environmental pO_2 after 5 h of exposure in SW, FW or WW. A: Values for all three treatments; B: Close-up of the results obtained for FW and SW-acclimated animals. The p_cO_2 in SW and FW is statistically different (Student t -test; $t = 2.7$; $p < 0.05$). gBW: gram of (fresh) body weight.

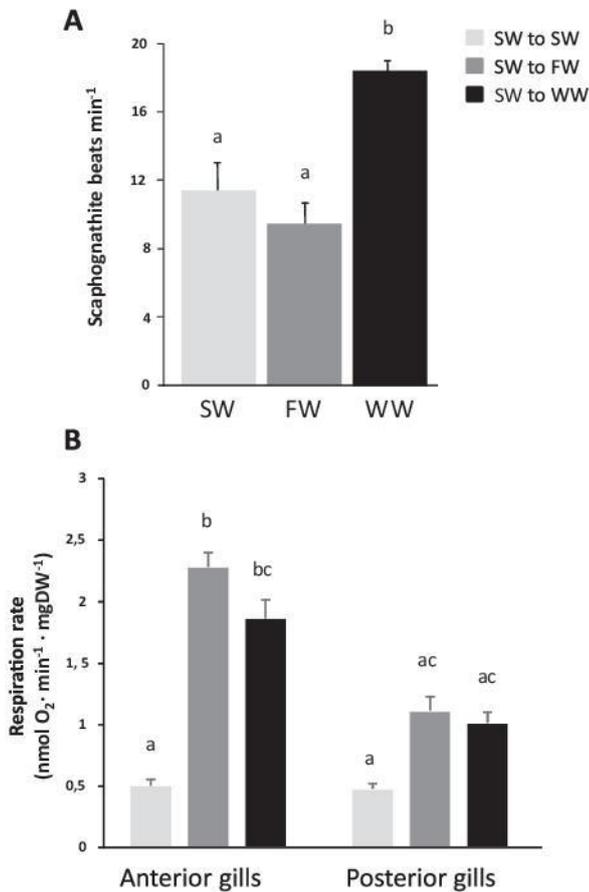


Fig. 4. Ventilation rates (expressed as scaphognathite beats per minute) for *N. meinerti* exposed to SW, FW or WW after 5 h of exposure in SW, FW and WW (A); Ex-vivo gill respiration rates under normoxic conditions exposed to SW, FW or WW for 5 h (B). Different letters represent statistically significant differences at $p < 0.05$. Results obtained from a one-way ANOVA (A) and a two-way ANOVA (B). gDW: gram of dry weight.

anterior (4-fold) than for posterior gills (2.5-fold) (two-way ANOVA; df error = 41; gill position $F = 9.7$; df = 1; $p < 0.001$; treatment $F = 14.5$; df = 2; $p < 0.001$; interaction: $F = 2.2$; df = 3).

3.2. Oxidative stress

DCF fluorescence measurements in the hemolymph samples indicate that males significantly increase their ROS formation due to transfer from SW to FW (two-way ANOVA; df error = 20; sex $F = 4.8$; df = 1; treatment $F = 8.8$; df = 2; $p < 0.001$; interaction: $F = 5.2$; df = 2; $p < 0.05$). However, values remain unchanged for females (Fig. 5A). MDA concentration in tissues did not differ between males and females or between treatments, but significant differences were recorded between posterior and anterior gills (Table 2A), with a higher accumulation of MDA in posterior gills than in anterior gills (Fig. 5B). SOD activities varied among treatments and showed a sex-dependent pattern (Table 2B and Fig. 6A). WW-exposure only affected female posterior gills, with a 1.8-fold increase in SOD activity. Similar results were recorded for catalase activity, which also revealed sex and treatment-related differences (Table 2C and Fig. 6B). Contrary to SOD, CAT activities increased for posterior gills in WW-exposed males but not in females.

3.3. Osmoregulatory capacity gill morphology and NKA activity

Spider crabs osmoregulate in both SW and FW (Fig. 7A), the difference between external medium and hemolymph osmolalities increasing at low salinity ranging from 181 mOsm kg⁻¹ in SW to

659 mOsm kg⁻¹ in FW. Exposure to WW significantly decreased osmoregulatory capacity (one-way ANOVA; $F = 666.9$; df = 2; df error = 29; $p < 0.001$), with OC dropping to an average of 583 mOsm kg⁻¹.

In all cases, gill NKA activities in spider crabs (Fig. 7B) were always lower in anterior gills than posterior gills FW (two-way ANOVA; df error = 57; gill position $F = 120.1$; df = 1; $p < 0.001$; treatment $F = 14.9$; df = 2; $p < 0.001$; interaction: $F = 2.1$; df = 2). Transfer from SW to FW did not induce a significant increase in NKA activity in anterior or posterior gills. Compared to FW-transferred crabs, transfer to WW induced a drastic 8-fold decrease in NKA activity in anterior gills. This pattern is not significant for posterior gills ($p = 0.085$).

Histological analyses highlight that anterior and posterior gills present multi-layered, leaf-like lamellar structures containing hemolymph lacunae (Fig. 8A). All the epithelial layers present pavement cells and pillar cells and are covered by a thin cuticle on the apical side. A septum is also present at certain locations in the hemolymph space and is connected to pillar cells.

The posterior gill epithelium has twice the thickness of the anterior gill epithelium in FW (Fig. 8B, Table 2D), a phenomenon that was observed throughout the longitudinal axis of the gill, from the base to the apical part. WW exposure did not affect the epithelial thickness of the anterior gills, which remained at an average of 1.39 μm and did not significantly differ from FW-acclimated crabs (Fig. 8B). Posterior gills were affected by WW exposure, with the epithelial thickness decreasing 1.96-fold towards the apical part of the gills (Fig. 8B). However, WW exposure induced a reduction of the epithelial thickness in the posterior gills across the transversal axis and throughout the complete length of the gill lamellae (Fig. 8C). In the apical part of these gills, epithelial thickness was reduced 2.4-fold along the length of the transversal axis (two way ANOVA; df error = 36; transversal axis $F = 0.07$; df = 2; treatment $F = 28.0$; df = 1; $p < 0.001$; interaction: $F = 0.88$; df = 2), while it was only reduced in the central part of the distal end and middle part of the lamellae (two-way ANOVA; df error = 42; transversal axis $F = 13.1$; df = 2; $p < 0.001$; treatment $F = 45.9$; df = 1; $p < 0.001$; interaction: $F = 26.9$; df = 2; $p < 0.001$). Finally, reduced epithelial thickness in the basal part of the gill was only observed in the distal end of the lamellae (two-way ANOVA; df error = 36; transversal axis $F = 2.47$; df = 2; treatment $F = 6.4$; df = 1; $p < 0.05$; interaction: $F = 4.9$; df = 2; $p < 0.05$).

4. Discussion

4.1. The physiological response of *N. meinerti* to hypo-osmotic shock

Crabs facing WW exposure have to deal with an abrupt change in environmental salinity. For most intertidal euryhaline decapods, a hypo-osmotic shock induces an increase in their RR (King, 1965; Paital and Chainy, 2012; Rivera-Ingraham et al., 2016). However, species that do not invade brackish environments normally respond by decreasing their O₂ consumption (King, 1965). As an amphibious species located landward in the upper part of the mangrove forest, the spider crab *N. meinerti* also decreased its RR immediately after exposure to FW (over a 5 h period) and thus, does not require extra energy for hyper-osmoregulation. This is supported by the fact that the onset to anaerobic metabolism (represented by $p_c\text{O}_2$) occurs at a lower $p\text{O}_2$ for FW-acclimated animals. Acclimation to low salinity also induces a functional remodeling of the posterior gills with, notably, a hypertrophy of the osmoregulatory epithelial lamellae through various well-studied mechanisms (Henry and Watts, 2001; Lovett et al., 2006; Lucu et al., 2008; Neufeld et al., 1980; Roy et al., 2007; Torres et al., 2007). All these changes are linked to an increase in specific activity of NKA accompanied by an increased expression of other ion transporters and supporting enzymes (i.e. carbonic anhydrase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ co-transporter, V-type H⁺-ATPase and arginine kinase) (Lucu and Towle, 2003; Pequeux, 1995). Therefore, exposure to FW is expected to induce

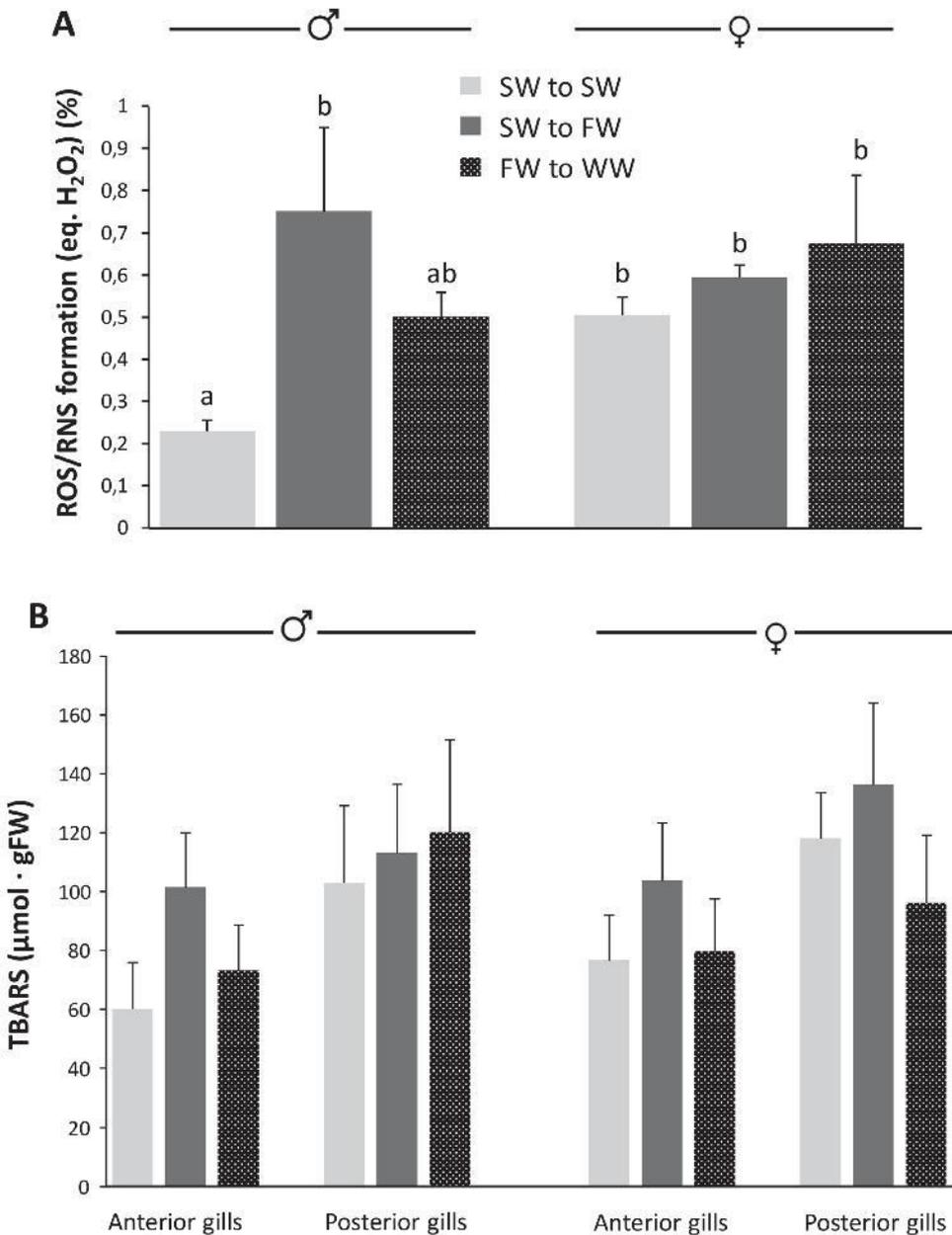


Fig. 5. Free radical formation in hemolymph (A) and oxidative damage (B) results (here, TBARS concentration) in anterior and posterior gills of male and female Spider crabs. Different letters represent statistically significant differences at $p < 0.05$. Results obtained from a two-way ANOVA (A).

a higher RR increase in posterior gills compared to anterior gills, as observed for the Mediterranean green crab *Carcinus aestuarii* (Rivera-Ingraham et al., 2016). The transfer of spider crabs to FW induces a branchial RR increase but a larger increase is observed in the anterior gills (3.6-fold increase) compared to posterior gills (1.8-fold increase). The oxygen consumption is almost 2-times higher in anterior gills than in posterior gills. Anterior gills are usually considered to deal with passive gas fluxes across the lamellar epithelia with limited or no cost. However, our results indicate that the anterior gills of the spider crab are, surprisingly, energetically demanding in FW. This suggests possible alterations in mitochondrial functioning in the anterior gills under FW conditions. A detailed study should be undertaken to test this hypothesis. Posterior gills have constitutively high NKA activity levels, and may not therefore have to be further optimized when exposed to FW. This could explain why NKA activity remains unchanged when crabs are transferred from SW to FW, as observed for other bimodal and terrestrial crabs (Tsai and Lin, 2007; Theuerkauff et al., submitted). The lack of functional reorganization in the posterior gills could thus reduce the required energy budget of these gills. This is most probably due to

the evolutionary transitory status of these bimodal crabs from a marine to a terrestrial environment (Morris, 2001; Weihrauch et al., 2004), with a possible involvement of other key enzymes such as the apical-type H⁺-ATPase that is involved also in acid-base balance and nitrogen excretion (Weihrauch et al., 2001).

4.2. The consequences of WW exposure

Exposure to the WW effluent not only produces a hypo-osmotic shock, but is also expected to be a source of numerous household pollutants altering the physicochemical properties of FW. Numerous studies have already reported that crabs exposed to pollutants such as metals usually respond by decreasing their metabolic demand, as measured by oxygen consumption (Barbieri and Doi, 2011; Barbieri and Paes, 2011; Capparelli et al., 2016; Depledge, 1984; Spicer and Weber, 1991). However, other pollutants such as high ammonium-N or nitrite levels, copper and organophosphate insecticides can increase crustacean respiration and heart rates (Bamber and Depledge, 1997; Barbieri, 2010; Barbieri et al., 2014; Chen and Lai, 1992; Chen and Lin, 1992;

Table 2

Results for the three-way ANOVAs on TBARS concentration (A), SOD activity (B), CAT activity (C) and on gill epithelial thickness (D). Factors, df (degrees of freedom), MS (variance) and value of *F* ratio are shown. Statistically significant effects are indicated by asterisks: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

| A | | | |
|---------------------|----|---------|----------|
| TBARS concentration | | | |
| Factors | df | MS | F |
| Sex (A) | 1 | 2715.5 | 0.9065 |
| Gill (B) | 1 | 22223.9 | 7.4185** |
| Treatment (C) | 2 | 2817.0 | 0.9403 |
| A x B | 1 | 40.6 | 0.0136 |
| A x C | 2 | 2130.7 | 0.7112 |
| B x C | 2 | 1654.4 | 0.5522 |
| A x B x C | 2 | 1407.3 | 0.4698 |
| Error | 51 | 2995.7 | |

| B | | | |
|---------------|----|---------|------------|
| SOD activity | | | |
| Factors | df | MS | F |
| Sex (A) | 1 | 25.7731 | 24.9973*** |
| Gill (B) | 1 | 5.5257 | 5.3594* |
| Treatment (C) | 2 | 5.1213 | 4.9672* |
| A x B | 1 | 2.3103 | 2.2407 |
| A x C | 2 | 1.5716 | 1.5243 |
| B x C | 2 | 2.4192 | 2.3464 |
| A x B x C | 2 | 1.1856 | 1.1500 |
| Error | 53 | 1.0310 | |

| C | | | |
|---------------|----|---------|------------|
| CAT activity | | | |
| Factors | df | MS | F |
| Sex (A) | 1 | 299.86 | 4.9766* |
| Gill (B) | 1 | 3087.59 | 51.2425*** |
| Treatment (C) | 2 | 625.90 | 10.3876*** |
| A x B | 1 | 24.72 | 0.4102 |
| A x C | 2 | 122.44 | 2.0320 |
| B x C | 2 | 131.63 | 2.1845 |
| A x B x C | 2 | 157.79 | 2.6186 |
| Error | 51 | 60.25 | |

| D | | | |
|---------------------------|----|---------|-------------|
| Gill epithelial thickness | | | |
| Factors | df | MS | F |
| Gill (A) | 1 | 11.9069 | 217.9083*** |
| Longitudinal axis (B) | 2 | 0.9265 | 16.9552*** |
| Treatment (C) | 1 | 1.1406 | 20.8734*** |
| A x B | 2 | 0.4726 | 8.6495*** |
| A x C | 1 | 0.5076 | 9.2889** |
| B x C | 2 | 0.1332 | 2.4384 |
| A x B x C | 2 | 0.4051 | 7.4144** |
| Error | 66 | 0.0546 | |

Rodriguez and Monserrat, 1991; Vosloo et al., 2002). These effects also depend on environmental factors such as temperature, salinity, pH and the developmental stage of crustaceans (Barbieri and Doi, 2011; Romano and Zeng, 2013) which may explain the variable effects that WW (mixed with surface waters) have on crabs in the field. When spider crabs are directly transferred to WW, high respiration rates were immediately observed at both whole animal and excised-gill levels. This increase must be the animal's response to meet the need for oxygen (respiratory stress), compensate for osmotic misbalance (namely, NKA activity loss in anterior gills), and possibly accelerate fatty acid catabolism or lipid peroxidation to fuel the stress-induced energetic demand, as seen with copper exposure (Reddy and Bhagyalakshmi, 1994; Vosloo et al., 2002).

The impact of pollutants in various estuarine environments on crustacean osmoregulatory capacity has already been reported, as for example in *C. maenas* (Bamber and Depledge, 1997) and in *Uca rapax*

(Capparelli et al., 2016). The mechanisms of acute pollutant toxicity that entail the loss of osmoregulatory ability, as observed in this study of spider crabs exposed to WW, have also been widely described. This is often due to the loss of activity of key membrane-bound ion transporters such as NKA (present study) or carbonic anhydrase (Bjerregaard and Vislie, 1986; Thurberg et al., 1973; Vitale et al., 1999), notably in the gills.

However, these observed effects could, to some extent, be due to the high ammonia-N levels of the WW. Household WW usually contains large amounts of nitrate and phosphate (Henze and Comeau, 2008). This is also the case for the effluent released in the Malamani mangrove forest (Table 1), with ammonia-N levels that are about 20 times higher than those measured in the surrounding FW (Herteman et al., 2011).

4.3. Is ammonia-induced stress a major problem caused by WW exposure?

High ammonium-N levels are one of the environmental pressures that can increase crustacean respiration rates (Barbieri, 2010; Chen and Lai, 1992; Chen and Lin, 1992) and impair their osmoregulatory capacity, especially at low salinity (Chen and Chen, 1996; Harris et al., 2001; Rebelo et al., 1999; Young-Lai et al., 1991). Moreover, gill NKA activity is expected to increase in response to elevated ammonia-N levels in decapod crustaceans (Furriel et al., 2004; Garçon et al., 2007; Jiann-Chu and Nan, 1992; Masui et al., 2002; Ren et al., 2015; Wang et al., 2003) to fuel active ammonia-N excretion from the hemolymph (Weihrauch et al., 2004). Anterior gills are likely to be more involved in ammonia-N excretion than posterior gills (Romano and Zeng, 2010; Weihrauch et al., 1999). Given the large amount of ammonia-N in the water, the effects of WW on spider crab osmoregulation observed in this study are therefore surprising. However, a similarly striking observation has already been reported for the marine Dungeness crabs *Metacarcinus magister*, in which an exposure to high levels of environmental ammonia (1 mM) for 2 days induced a down-regulation of the NKA (α -subunit) attributed to a toxic effect of ammonia (Martin et al., 2011). Furthermore, exposure to high ammonia-N levels usually induces damage to gill gas exchange mechanisms (Rebelo et al., 2000). However, no morphological changes were observed along the extremely thin epithelium of the anterior gill lamellae (respiratory) in spider crabs exposed to WW, nor was there any evidence of necrosis or any other ultrastructural damage. This could be explained by the short exposure time considered in this study. However, for the posterior gill epithelium, which is twice as thick as that found in the anterior gills, thickness was reduced by half in the apical part and by one third in the middle part of the gills due to WW exposure. Only a limited area close to the raphe and towards the basal side of the gills remained unmodified. Such a drastic reduction of the surface area must limit the osmoregulatory capacity of the gills and could be partly responsible for the observed osmotic imbalance. Ammonia-rich environments may also induce oxidative stress but there is little literature describing this in crustaceans (Pinto et al., 2016).

4.4. The consequences of WW exposure on the redox balance

The changes in the metabolic demand on coastal organisms is induced by exposure to salinity changes and to pollutant exposure and often result in modified ROS/RNS production, obliging organisms to consequently adapt their antioxidant defenses (Espinosa and Rivera-Ingraham, 2016; Rivera-Ingraham et al., 2013; Rodriguez-Ariza et al., 1993). ROS/RNS formation in the hemolymph of spider crabs significantly increases due to FW transfer in males alone. A similar result has already been observed in *Carcinus aestuarii*, where a 68% increase was observed in ROS production due to FW transfer (Rivera-Ingraham et al., 2016). However, compared to FW, exposure to WW did not alter ROS/RNS formation in the hemolymph or oxidative markers (MDA), suggesting that animals are able to maintain redox homeostasis, thus efficiently avoiding oxidative damage. This redox homeostasis is likely

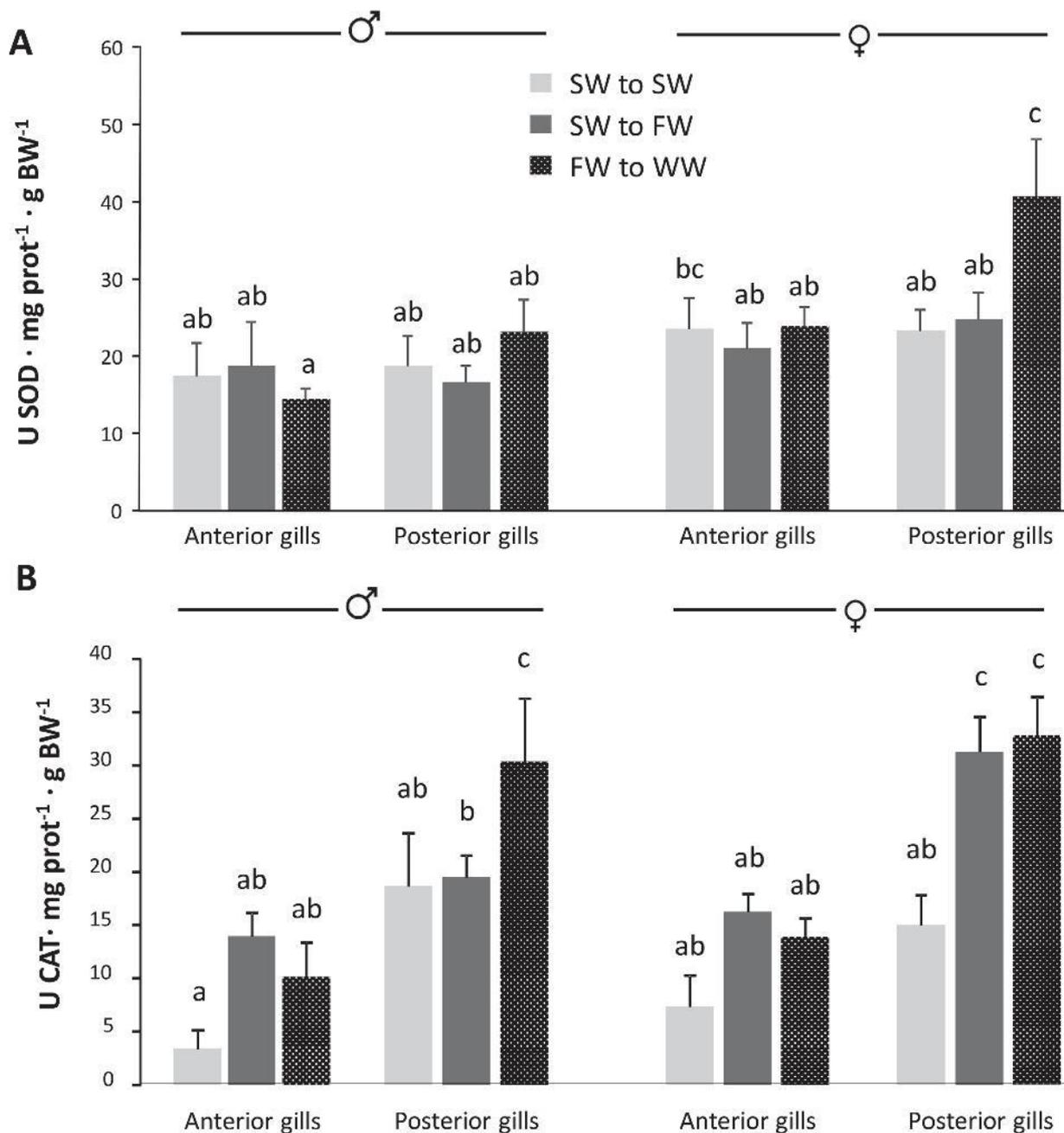


Fig. 6. Antioxidant defenses in anterior and posterior gills of male and female *N. meinerti* exposed to SW, FW or WW. A: SOD activity in $\text{mg prot}^{-1} \cdot \text{g BW}^{-1}$; B: CAT activity in $\text{mg prot}^{-1} \cdot \text{g BW}^{-1}$. Different letters represent statistically significant differences at $p < 0.05$. Results obtained from a three-way ANOVA.

achieved through an efficient antioxidant system and/or well-coupled mitochondrial functioning, and is also observed with the TBARS results obtained at the gill level. It is also interesting to note that the anterior and posterior gills, although significantly increasing their RR due to FW/WW exposure, do not show any changes in their antioxidant defenses (except certain gender-specific differences which will be discussed below) or MDA concentrations. This suggests that despite their increased activity to fuel ion balance homeostasis, the mitochondria are probably well coupled and thus have a good redox homeostasis (Salin et al., 2015). However, this is not the case for other species such as the mussel *Mytella guyanensis*, in which the TBARS content in the digestive gland increased when animals are exposed to domestic wastewater but some antioxidant activities remained unchanged (e.g. SOD activity) while others such as CAT activity increased with pollutant exposure (Torres et al., 2002).

Compared to anterior gills, posterior gills maintain higher constitutive levels of CAT and SOD activities and MDA levels, suggesting that these tissues are under higher redox stress than anterior gills. This is most probably due to their higher osmoregulatory function, and has also been observed in other crab species such as *C. aestuarii* (Rivera-Ingraham et al., 2016). The mechanisms involved in maintaining an efficient antioxidant defense appear to be sex-dependent: SOD activity is prioritized in females, while catalase activity sharply increases in males. This sex-dependent response for ROS production and oxidative stress-related parameters has already been observed in other coastal invertebrates (Correia et al., 2003; Paital and Chainy, 2013). It would be interesting to study these sex-related differences in the antioxidant response from a phylogenetic perspective, given that male and female mangrove crabs have different activity patterns and are subjected to different environmental constraints (Allen and Levinton, 2014;

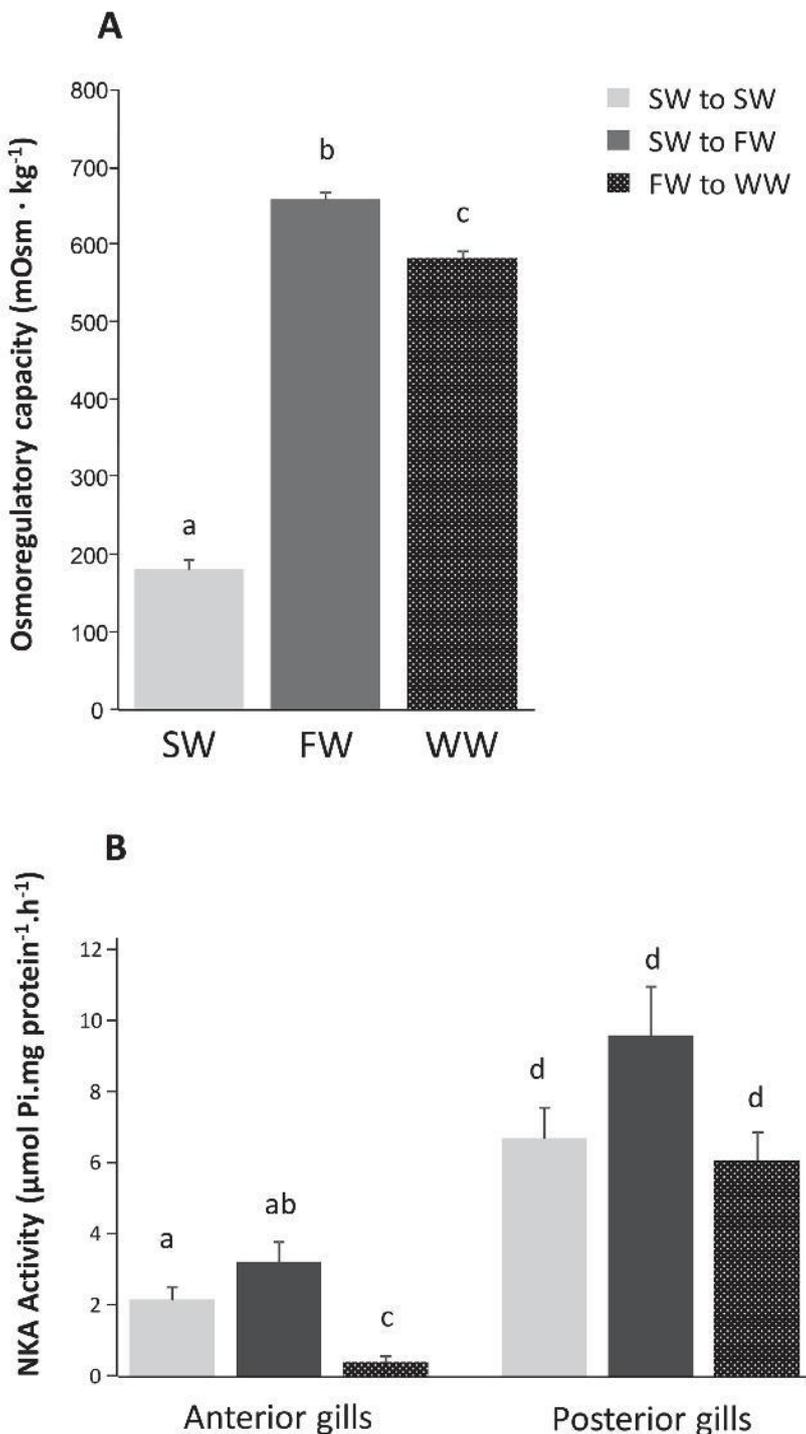


Fig. 7. Osmoregulatory capacity of *N. meinerti* exposed to SW, FW or WW (A); NKA activity (in $\mu\text{mol Pi mg protein}^{-1} \text{h}^{-1}$) measured in anterior (with mainly a respiratory role) and posterior gills (with important osmoregulatory function) (B). Different letters represent statistically significant differences at $p < 0.05$. Results obtained from a one-way ANOVA (A) and a two-way ANOVA (B).

Munguia et al., 2017).

Other biological factors such as age or reproduction stage and environmental factors (e.g. season) also modulate the oxidative stress response, as evidenced by many authors (Correia et al., 2003; Lushchak, 2011; Paital and Chainy, 2013; Pérez et al., 2011). Taken together, this highlights the necessity of taking these parameters into account when focusing on crabs, and especially for amphibious species with bimodal breathing capacities.

5. Conclusion

Overall, this study demonstrates that respiratory and ionoregulatory

processes of spider crabs are rapidly affected by WW exposure, which is accompanied by an acute increase in metabolic demand. Although these mangrove crabs are capable of maintaining good redox homeostasis, they cannot maintain the functional and morphological gill organization that is required for correct osmoregulation in freshwater under these pollution conditions. These physiological challenges may explain why this crab species leaves the discharge area. Further studies should concentrate on identifying the key components of this WW discharge (e.g. ammonia-N levels, metals). It is also relevant to further investigate the subcellular mechanisms involved in male and female redox homeostasis and determine how mitochondrial and electron transport chain efficiency may be affected by exposure to domestic

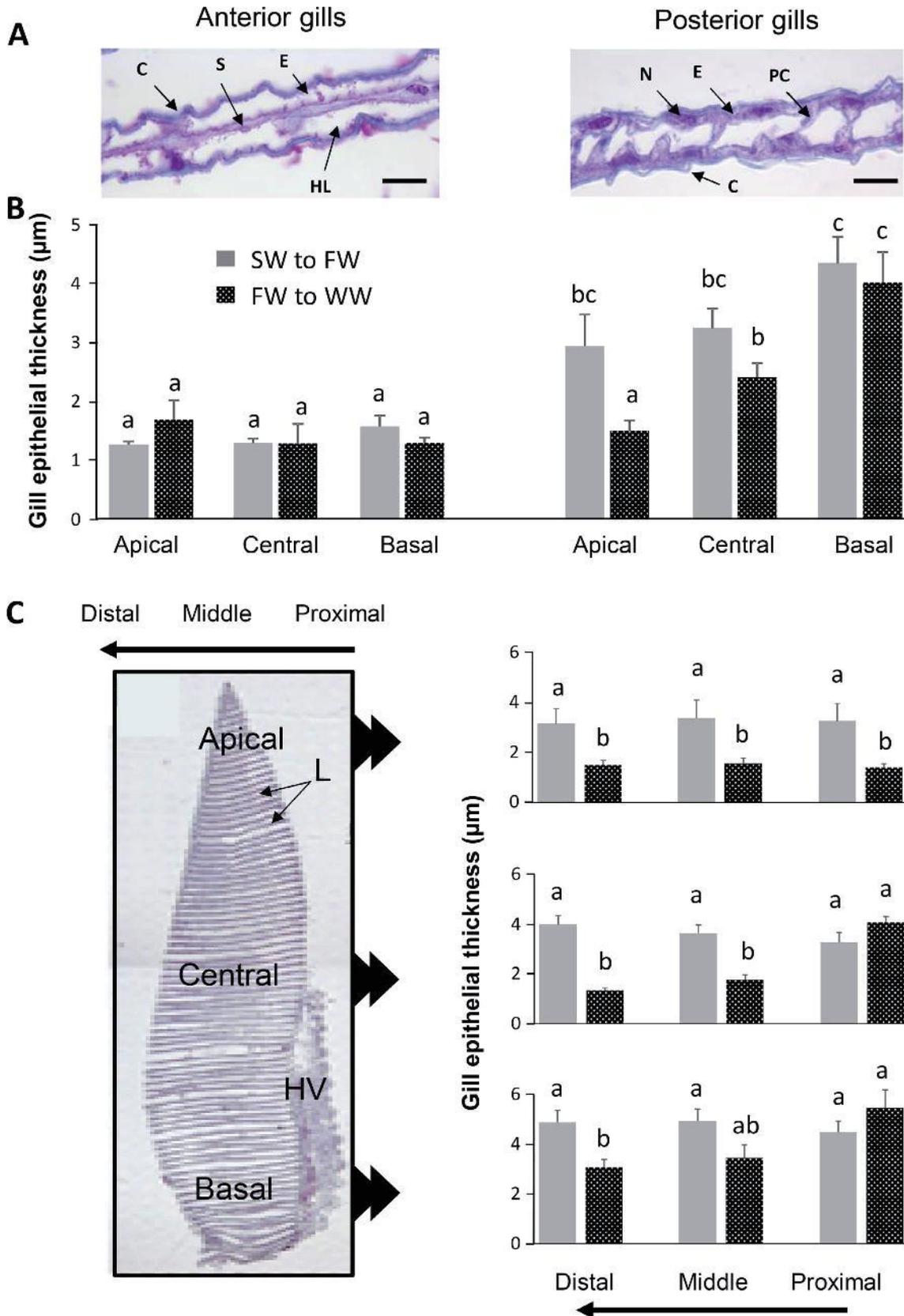


Fig. 8. Gill histology and morphometry. **A:** representative images of histological sections corresponding to *N. meinerti* anterior (left) and posterior (right) gills stained using the Masson's Trichrome Staining Protocol. Gill epithelial thickness measurements across the longitudinal axes of anterior and posterior gills (**B**) and transversal axes (**C**) of posterior gills only from crabs exposed to FW and WW. Different letters represent statistically significant differences at $p < 0.05$. Results obtained from a three-way ANOVA (**B**) and a two-way ANOVA (**C**). **C:** cuticle; **E:** epithelium; **HL:** hemolymphatic lacunae; **HV:** hemolymphatic vessels; **L:** gill lamellae; **N:** nucleus; **PC:** pillar cells. Scale bars: 20 µm.

effluents. Other WW contamination routes, i.e. through the digestive tract, should also be considered along with a field assessment taking into account the intertidal environmental conditions.

Acknowledgements

The authors are thankful to the Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte (SIEAM) and especially Kissimati Abdallah for her help on the field and to Claire Gollety for statistical advice. The authors also sincerely thank Mrs. Joanna Murno from Munro Language services for her help in polishing the manuscript. Additional thanks go to the two anonymous referees for their helpful and constructive comments on the original version of this manuscript. This study was partly funded by the Marie Curie Actions EU grant FP7-PEOPLE-2013-IEF (grant number 622087-“IAS-Life”) awarded to GRI and by the French National Agency for Water (ONEMA), which is now part of the French Agency for Biodiversity (AFB).

References

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205, 1831–1841. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jeb.2011.04.007>.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Allen, B.J., Levinton, J.S., 2014. Sexual selection and the physiological consequences of habitat choice by a fiddler crab. *Oecologia* 176, 25–34. <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-014-3002-y>.
- Amaral, V., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009. Effects of vegetation and sewage load on mangrove crab condition using experimental mesocosms. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 300–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2009.07.007>.
- Bamber, S.D., Depledge, M.H., 1997. Responses of shore crabs to physiological challenges following exposure to selected environmental contaminants. *Aquat. Toxicol.* 40, 79–92. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00040-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00040-4).
- Barbieri, E., Doi, S.A., 2011. The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the Pink Shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 44, 251–263. <http://dx.doi.org/10.1080/10236244.2011.617606>.
- Barbieri, E., Paes, E.T., 2011. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. *Chemosphere* 84, 9–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.092>.
- Barbieri, E., Bondioli, A.C.V., de Melo, C.B., Henriques, M.B., 2014. Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquac. Res.* 47, 1260–1268. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12583>.
- Barbieri, E., 2010. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture* 306, 329–333. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.009>.
- Bartolini, F., Penha-Lopes, G., Limbu, S., Paula, J., Cannicci, S., 2009. Behavioural responses of the mangrove fiddler crabs (*Uca annulipes* and *U. inversa*) to urban sewage loadings: results of a mesocosm approach. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1860–1867. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.07.019>.
- Bjerregaard, P., Vislie, T., 1986. Effect of copper on ion- and osmoregulation in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* 91, 69–76.
- Boonsong, K., Piyatiratitivorakul, S., Patanaponpaiboon, P., 2003. Potential use of mangrove plantation as constructed wetland for municipal wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 257–266.
- Bouchard, J.-M., Poupin, J., Cleva, R., Dumas, J., Dinhut, V., 2013. Land, mangrove and freshwater decapod crustaceans of Mayotte region (Crustacea Decapoda). *Atoll Res. Bull.* 592, 1–69.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Cannicci, S., Bartolini, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., Litulo, C., Macia, A., Mrabu, E.J., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009. Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 305–317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.021>.
- Capparelli, M.V., Abessa, D.M., McNamara, J.C., 2016. Effects of metal contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol.* – Part C Toxicol. Pharmacol. 185–186, 102–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.004>.
- Chen, J.C., Chen, C.T., 1996. Changes of osmotic and electrolyte concentrations in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* – C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 114, 35–38. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02110-8](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(95)02110-8).
- Chen, J.C., Lai, S.H., 1992. Oxygen consumption and ammonia nitrogen excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* 102, 129–133.
- Chen, J.C., Lin, C.Y., 1992. Effect of ammonia on growth of *Penaeus penicillatus* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp.* 101, 443–447. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90067-H](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(92)90067-H).
- Copeland, D.E., Fitzjarrell, A.T., 1968. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* rathbun) with notes on modified mitochondria. *Zeitschrift für Zellforsch.* 92, 1–22. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00339398>.
- Correia, A.D., Costa, M.H., Luis, O.J., Livingstone, D.R., 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 289, 83–101. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00040-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00040-6).
- Depledge, M.H., 1984. Disruption of circulatory and respiratory activity in shore crabs (*Carcinus maenas* (L.)) exposed to heavy metal pollution. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp.* 78, 445–459. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(84\)90113-0](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(84)90113-0).
- Duggleby, R.G., 1984. Regression analysis of nonlinear Arrhenius plots: an empirical model and a computer program. *Comput. Biol. Med.* 14, 447–455. [http://dx.doi.org/10.1016/0010-4825\(84\)90045-3](http://dx.doi.org/10.1016/0010-4825(84)90045-3).
- Dyer, M.F., Uglow, R.F., 1978. Heart and scaphognathite beat behaviour in laboratory-held *Crangon crangon* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 32, 209–218. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(78\)90117-X](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(78)90117-X).
- Emmerson, W.D., McGwynne, L.E., 1992. Feeding and assimilation of mangrove leaves by the crab *Sesarma manerti* de Man in relation to leaf-litter production in Mgzana, a warm-temperate southern African mangrove swamp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 157, 41–53. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90073-J](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(92)90073-J).
- Espinosa, F., Rivera-Ingraham, G.A., 2016. Subcellular evidences of redox imbalance in well-established populations of an endangered limpet. Reasons for alarm? *Mar. Pollut. Bull.* 109, 72–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.019>.
- Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., Fenwick, J.C., 1983. Ca²⁺-dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes-I. Identification of Ca²⁺-activated ATPase activities with non-specific phosphatase activities. *Comp. Biochem. Physiol. B* 76, 745–754. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90388-7](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(83)90388-7).
- Furriel, R.P.M., Masui, D.C., McNamara, J.C., Leone, F.A., 2004. Modulation of gill Na⁺, K⁺-ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 301, 63–74. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.a.20008>.
- Fusi, M., Giomi, F., Babbini, S., Daffonchio, D., Mcquaid, C.D., Porri, F., Cannicci, S., 2015. Thermal specialization across large geographical scales predicts the resilience of mangrove crab populations to global warming. *Oikos* 124, 784–795. <http://dx.doi.org/10.1111/oik.01757>.
- Fusi, M., Beone, G.M., Suci, N.A., Sacchi, A., Trevisan, M., Capri, E., Daffonchio, D., Din, N., Dahdouh-Guebas, F., Cannicci, S., 2016. Ecological status and sources of anthropogenic contaminants in mangroves of the Wouri River Estuary (Cameroon). *Mar. Pollut. Bull.* 109, 723–733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.104>.
- Garçon, D.P., Masui, D.C., Mantelatto, F.L.M., McNamara, J.C., Furriel, R.P.M., Leone, F.A., 2007. K⁺ and NH₄⁺ modulate gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: fine tuning of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol. A – Mol. Integr. Physiol.* 147, 145–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.020>.
- Gillikin, D.P., De Wachter, B., Tack, J.F., 2004. Physiological responses of two ecologically important Kenyan mangrove crabs exposed to altered salinity regimes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 301, 93–109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2003.09.024>.
- Grisham, M.B., 2012. Detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. In: Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. (Eds.), *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 329–343.
- Gross, W.J., Lasiewski, R.C., Dennis, M., Rudy, P., 1966. Salt and water balance in selected crabs of Madagascar. *Comp. Biochem. Physiol.* 17, 641–660. [http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X\(66\)90594-9](http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X(66)90594-9).
- Harris, R., Coley, S., Collins, S., McCabe, R., 2001. Ammonia uptake and its effects on ionoregulation in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *J. Comp. Physiol. B* 171, 681–693. <http://dx.doi.org/10.1007/s003600100219>.
- Henry, R.P., Watts, S.A., 2001. Early carbonic anhydrase induction in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus* during low salinity acclimation is independent of ornithine decarboxylase activity. *J. Exp. Zool.* 289, 350–358.
- Henze, M., Comeau, Y., 2008. Wastewater characterization. In: Henze, M., Van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A., Brdjanovic, D. (Eds.), *Biological Wastewater Treatment: Principles Modelling and Design*. IWA Publishing, London, UK, pp. 33–52.
- Herteman, M., Fromard, F., Lams, L., 2011. Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: a field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol. Eng.* 37, 1283–1291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>.
- Herteman, M., 2010. Evaluation des capacités bioremédiatrices d'une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. Université paul Sabatier – Toulouse III.
- INSEE, 2012. Recensement générale de la population à Mayotte. Insee infos, pp. 61.
- Jeanson, M., Anthony, E.J., Dolique, F., Cremades, C., 2014. Mangrove evolution in Mayotte island, Indian Ocean: a 60-year synopsis based on aerial photographs. *Wetlands* 34, 459–468. <http://dx.doi.org/10.1007/s13157-014-0512-7>.
- Jiann-Chu, C., Nan, Fan-Hua, 1992. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*. *Aquat. Toxicol.* 23, 1–10. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90008-B](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(92)90008-B).
- Jitthaisong, O., Dhanmanonda, P., Chunkao, K., Teejuntuk, S., 2012. Water quality from Mangrove forest: the King's royally initiated Laem Phak Bia Environmental Research and Development Project: Phetchaburi Province, Thailand. *Mod. Appl. Sci.* 6, 1–8. <http://dx.doi.org/10.5539/mas.v6n8p1>.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J.A., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., Ischiropoulos, H., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.
- King, E.N., 1965. The oxygen consumption of intact crabs and excised gills as a function

- of decreased salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* 15, 93–102.
- Kristensen, E., 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J. Sea Res.* 59 (1), 30–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.004>.
- Lee, S.Y., Primavera, J.H., Dahdouh-Guebas, F., Mckee, K., Bosire, J.O., Cannicci, S., Diele, K., Fromard, F., Koedam, N., Marchand, C., Mendelssohn, I., Mukherjee, N., Record, S., 2014. Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: a reassessment. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23, 726–743. <http://dx.doi.org/10.1111/geb.12155>.
- Lee, S.Y., 1998. Ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: a review. *Mar. Freshw. Res.* 49, 335–343. <http://dx.doi.org/10.1071/MF99078>.
- Leung, J.Y.S., Cai, Q., Tam, N.F.Y., 2016. Comparing subsurface flow constructed wetlands with mangrove plants and freshwater wetland plants for removing nutrients and toxic pollutants. *Ecol. Eng.* 95, 129–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.016>.
- Li, C., Gao, F., Jin, W.H., Chen, Z.S., 2011. Saline municipal wastewater treatment by constructed mangrove wetland. 2011 International Conference on Electronics, Communications and Control, ICECC 2011 – Proceedings 2825–2828. <http://dx.doi.org/10.1109/ICECC.2011.6067977>.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia Martínez, P., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 112, 265–276.
- Lovett, D.L., Colella, T., Cannon, A.C., Lee, D.H., Evangelisto, A., Muller, E.M., Towle, D.W., 2006. Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.* 210, 132–139.
- Lucu, C., Towle, D.W., 2003. Na⁺ + K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. – A Mol. Integr. Physiol.* 135, 195–214. [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00664-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00664-3).
- Lucu, C., Pavičić, J., Ivanković, D., Pavičić-Hamer, D., Najdek, M., 2008. Changes in Na⁺ / K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. – A Mol. Integr. Physiol.* 149, 362–372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.026>.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.
- Martin, M., Fehsenfeld, S., Sourial, M.M., Weihrach, D., 2011. Effects of high environmental ammonia on branchial ammonia excretion rates and tissue Rh-protein mRNA expression levels in seawater acclimated Dungeness crab *Metacarcinus magister*. *Comp. Biochem. Physiol. – A Mol. Integr. Physiol.* 160, 267–277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.012>.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris.
- Masú, D.C., Furiel, R.P.M., McNamara, J.C., Mantelatto, F.L.M., Leone, F.A., 2002. Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol. – C Toxicol. Pharmacol.* 132, 471–482. [http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00110-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00110-2).
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. An enzymic function for erythrocyte (hemocytin). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Morris, S., 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 204, 979–989.
- Munguia, P., Backwell, P.R.Y., Darnell, M.Z., 2017. Thermal constraints on microhabitat selection and mating opportunities. *Anim. Behav.* 123, 259–265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.11.004>.
- Neufeld, G.J., Holliday, C.W., Pritchard, J.B., 1980. Salinity adaptation of gill Na, K-ATPase in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 211, 215–224. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1402110210>.
- Ouyang, X., Guo, F., 2016. Paradigms of mangroves in treatment of anthropogenic wastewater pollution. *Sci. Total Environ.* 544, 971–979. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.013>.
- Pérez, A.F., Malanga, G., Puntarulo, S., 2011. Reproductive conditions associated to changes in the lipid-soluble antioxidant capacity and the damage to lipids in the sea urchins *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea). *Rev. Mar. Cost.* 3, 183–194.
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2012. Effects of salinity on O₂ consumption, ROS generation and oxidative stress status of gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 155, 228–237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.08.009>.
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2013. Seasonal variability of antioxidant biomarkers in mud crabs (*Scylla serrata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 87, 33–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.006>.
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Kristensen, E., Paula, J., 2009a. Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1694–1703. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.015>.
- Penha-Lopes, G., Torres, P., Narciso, L., Cannicci, S., Paula, J., 2009b. Comparison of fecundity, embryo loss and fatty acid composition of mangrove crab species in sewage contaminated and pristine mangrove habitats in Mozambique. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 381, 25–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2009.08.009>.
- Pequeux, 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 15, 1–60. <http://dx.doi.org/10.11113/193724095X00578>.
- Pinto, M.R., Lucena, M.N., Faleiros, R.O., Almeida, E.A., McNamara, J.C., Leone, F.A., 2016. Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquat. Toxicol.* 170, 13–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.021>.
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ragionieri, L., Fratini, S., Vannini, M., Schubart, C.D., 2009. Phylogenetic and morphometric differentiation reveal geographic radiation and pseudo-cryptic speciation in a mangrove crab from the Indo-West Pacific. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 825–834. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.008>.
- Ragionieri, L., Fratini, S., Schubart, C.D., 2012. Revision of the *Neosarmatium meinerti* species complex (Decapoda: Brachyura: Sesamidae), with descriptions of three pseudocryptic Indo-West Pacific species. *Raffles Bull. Zool.* 60, 71–87.
- Rebelo, M.F., Santos, E.A., Monserrat, J.M., 1999. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda) Dana, 1851: accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol. – A Mol. Integr. Physiol.* 122, 429–435. [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00026-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00026-4).
- Rebelo, M.F., Rodriguez, E.M., Santos, E.A., Ansaldo, M., 2000. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. – C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 125, 157–164. [http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00093-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00093-6).
- Reddy, P.S., Bhagyalakshmi, A., 1994. Lipid peroxidation in the gill and hepatopancreas of *Oziotelphusa senex senex* fabricius during cadmium and copper exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 704–710. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00196943>.
- Ren, Q., Pan, L., Zhao, Q., Si, L., 2015. Ammonia and urea excretion in the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N. *Comp. Biochem. Physiol. – Part A Mol. Integr. Physiol.* 187, 48–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.04.013>.
- Rivera-Ingraham, G.A., Malanga, G., Puntarulo, S., Pérez, A.F., Ruiz-Tabares, A., Maestre, M., Gonzalez-Aranda, R., Espinosa, F., Garcia-Gomez, J.C., 2013. Antioxidant defenses and trace metal bioaccumulation capacity of *Cymbula nigra* (Gastropoda: Patellidae). *Water Air Soil Pollut.* 224, 1458–1471. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-013-1458-8>.
- Rivera-Ingraham, G.A., Barri, K., Boel, M., Farcy, E., Charles, A.-L., Geny, B., Lignot, J.-H., 2016. Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: is oxidative adaptation determined by gill function? *J. Exp. Biol.* 219, 80–89. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.128595>.
- Rodrigues, E.T., Pardal, M.Á., 2014. The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environ. Int.* 70, 158–182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.018>.
- Rodriguez, E.M., Monserrat, J.M., 1991. Acute and chronic effects of parathion and 2,4 D on the oxygen consumption of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 41, 211–210.
- Rodriguez-Ariza, A., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J.R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Barcena, J.A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci. Total Environ.* 134, 109–116. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80009-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80009-9).
- Romano, N., Zeng, C., 2010. Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations. *Comp. Biochem. Physiol. – C Toxicol. Pharmacol.* 151, 222–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.011>.
- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Rev. Fish. Sci.* 21, 1–21. <http://dx.doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>.
- Roy, L.A., Davis, D.A., Saoud, I.P., Henry, R.P., 2007. Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities. *Comp. Biochem. Physiol. – A Mol. Integr. Physiol.* 147, 404–411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.003>.
- Salin, K., Auer, S.K., Rudolf, A.M., Anderson, G.J., Cairns, A.G., Mullen, W., Hartley, R.C., Selman, C., Metcalfe, N.B., GJ, A., Ag, C., Mullen, W., Re, H., 2015. Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species *in vivo*. *Biol. Lett.* 11, 201505. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0538>.
- Smith, T.J., Boto, K.G., Frusher, S.D., Giddins, R.L., 1991. Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest productivity. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 33, 419–432. [http://dx.doi.org/10.1016/0272-7714\(91\)90081-L](http://dx.doi.org/10.1016/0272-7714(91)90081-L).
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>.
- Spicer, J.L., Weber, R.E., 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 100, 339–342. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90005-E](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(91)90005-E).
- Thurberg, F.P., Dawson, M.A., Collier, R.S., 1973. Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of estuarine crabs. *Mar. Biol.* 23, 171–175. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00389481>.
- Torres, Aloísio, Pires Testa, M., Gáspari, C., Beatriz Masutti, C., Maria Neves, M., Panitz, C., Curi-Pedrosa, R., Alves De Almeida, E., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 923–932. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00142-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00142-X).
- Torres, G., Charmantier-Daures, M., Chifflet, S., Anger, K., 2007. Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in the gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. – A Mol. Integr. Physiol.* 147, 460–465. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.020>.
- Tsai, J.-R., Lin, H.-C., 2007. V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J. Exp. Biol.* 210, 620–627. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.02684>.
- Turcios, A.E., Papenbrock, J., 2014. Sustainable treatment of aquaculture effluents—what can we learn from the past for the future? *Sustainability* 6, 836–856. <http://dx.doi.org/10.3390/su6020836>.
- Uchiyama, M., Mihara, M., 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by

- thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 86, 271–278. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1).
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. – C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122, 121–129. [http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10094-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10094-4).
- Vosloo, A., Aardt, W.J., Van Mienie, L.J., 2002. Sublethal effects of copper on the freshwater crab *Potamonautes warreni*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 133, 695–702.
- Wang, A.L., Wang, W.N., Wang, Y., Shang, L.X., Liu, Y., Sun, R.Y., 2003. Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption, ammonia-N excretion and Na⁺/K⁺ ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 220, 833–841. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00536-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00536-7).
- Wehrauch, D., Becker, W., Postel, U., Luck-Kopp, S., Siebers, D., 1999. Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. *J. Comp. Physiol. – B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 169, 25–37. <http://dx.doi.org/10.1007/s003600050190>.
- Wehrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D., Towle, D.W., 2001. Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J. Exp. Biol.* 204, 25–37.
- Wehrauch, D., Morris, S., Towle, D.W., 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491–4504. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.01308>.
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., Shipin, O.V., 2009. Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol. Eng.* 35, 898–907. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.021>.
- Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., Lan, C.Y., 1997. Mangrove wetlands as wastewater treatment facility: a field trial. *Hydrobiologia* 49–59. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1003040920173>.
- Yang, Q., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Luan, T.G., Su, W.S., Lan, C.Y., Shin, P.K.S., Cheung, S.G., 2008. Potential use of mangroves as constructed wetland for municipal sewage treatment in Futian, Shenzhen, China. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 735–743. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.037>.
- Ye, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 2001. Livestock wastewater treatment by a mangrove pot-cultivation system and the effect of salinity on the nutrient removal efficiency. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 512–520. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00196-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00196-X).
- Young-Lai, W., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., 1991. Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*. *Mar. Biol.* 110, 293–300. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01313716>.
- Yu, R.Q., Chen, G.Z., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., Lan, C.Y., 1997. Benthic macrofauna of the mangrove swamp treated with municipal wastewater. *Hydrobiologia* 347, 127–137. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1003027520750>.

4.2.3 Conclusion

Les crabes exposés aux eaux usées augmentent la ventilation de leur cavité branchiale en multipliant par deux le nombre de battements des scaphognathites. Ils consomment aussi trois fois plus d'oxygène lorsqu'ils sont transférés de l'eau de mer aux eaux usées alors que le transfert de l'eau de mer à l'eau douce n'influence ni sa ventilation ni sa consommation d'oxygène. Au niveau des branchies isolées, l'exposition à l'eau douce augmente leur consommation en oxygène, surtout au niveau des branchies antérieures, mais sans effet des eaux usées qui donnent les mêmes résultats que l'eau douce. L'exposition aux eaux usées a affecté la capacité osmorégulatrice des crabes, leur pression osmotique diminuant de 80 mOsm·kg⁻¹ par rapport à l'eau douce. L'activité de la NKA branchiale a également diminué suite à l'exposition aux eaux usées, avec une chute drastique au niveau des branchies antérieures (l'enzyme n'y est pratiquement plus active alors qu'elle est déjà plus faible que dans les branchies postérieures). L'analyse histologique des branchies a confirmé que les branchies postérieures sont deux fois plus épaisses que les antérieures, mais a également révélé que l'épithélium des branchies postérieures est réduit chez les crabes exposés aux eaux usées. Ainsi, son épaisseur est réduite au niveau du pôle apical de la branchie et dans la partie distale (la partie la plus éloignée du raphé) au niveau du pôle médian et basal. C'est donc une réduction de la partie osmorégulatrice de ces branchies (*Figure 51*) qui pourrait expliquer la diminution de la capacité osmorégulatrice observée à l'échelle de l'organisme entier.

L'analyse de la balance oxydative a montré des différences en fonction du sexe, la production d'EROs dans l'hémolymphe étant plus importante chez les femelles exposées à un choc osmotique. Cependant, aucune différence significative entre les traitements ni en fonction du sexe n'a pu être observé pour les dommages aux lipides. Ceux-ci sont plus importants dans les

branchies postérieures qui sont métaboliquement plus actives du fait de leur implication dans l'osmorégulation. Au niveau des défenses antioxydantes, la SOD ne varie pas chez les mâles alors que son activité augmente de 50 % chez les femelles exposées aux eaux usées. La catalase quant à elle, montre une activité différente entre les mâles et femelles mais aussi entre les branchies antérieures et postérieures. De plus, son activité augmente avec la dessalure chez les femelles, mais seulement suite à l'exposition aux eaux usées chez les mâles.

Les eaux usées induisent donc un déséquilibre de la régulation ionique et énergétique, mais pas de la balance oxydative grâce à une modification des enzymes antioxydantes dont la réponse est sexe-spécifique. Ces challenges pourraient expliquer que les crabes n'arrivent pas à se maintenir dans les zones d'écoulement des eaux usées sur le long terme, surtout d'un point de vue énergétique.

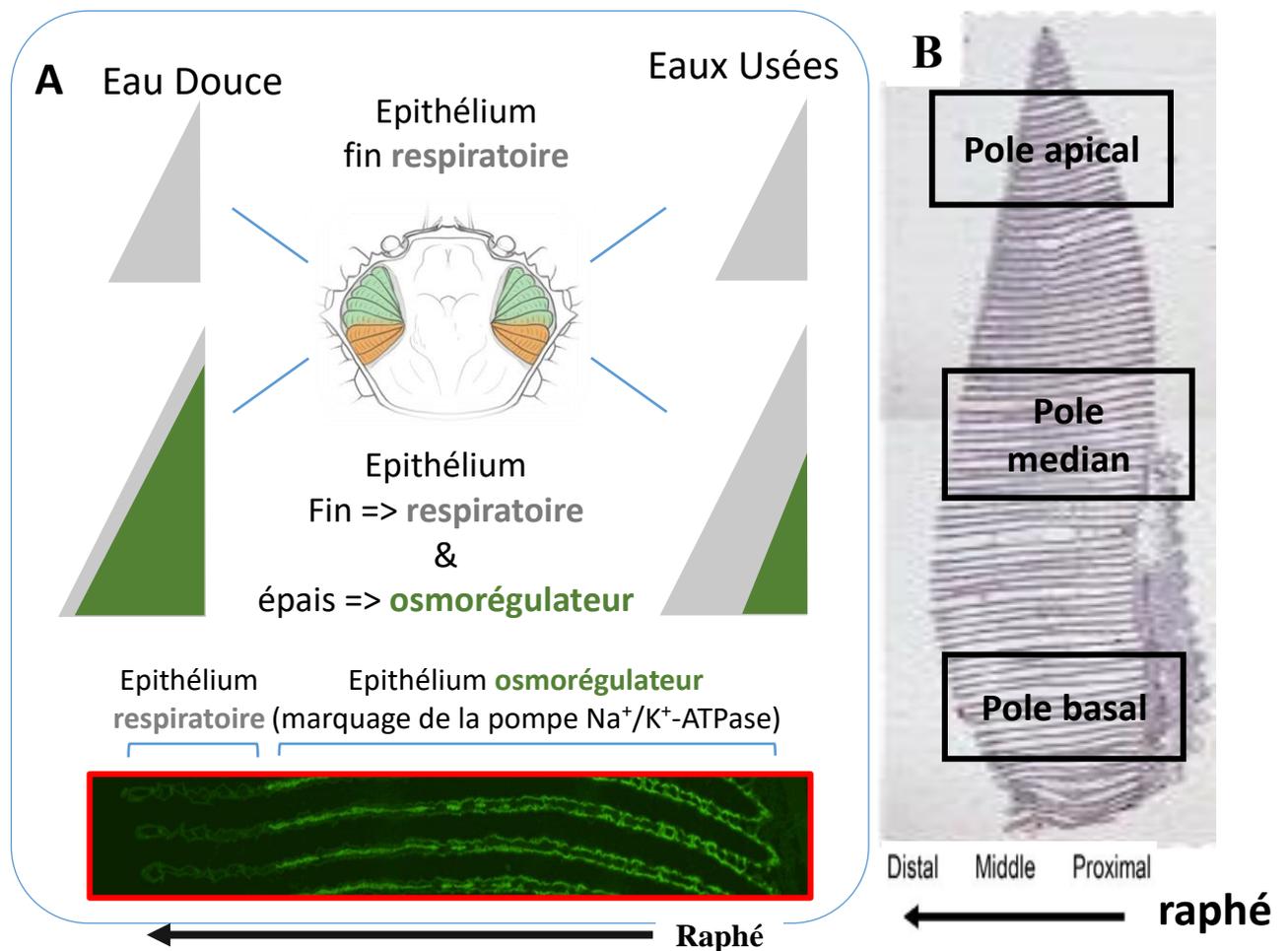


Figure 51 : Schéma des modifications histopathologiques induites par l'exposition aux eaux usées au niveau de la branchie postérieure de *N. meinerti* (A). Cette réduction de l'épithélium osmorégulateur est encore plus importante au niveau du pole apical et médian de la branchie et principalement du côté distal. Schéma rappelant les différents axes branchiaux (B).

4.3 Effets des eaux usées domestiques sur le crabe de mangrove *Tubuca urvillei*

4.3.1 Introduction

Tubuca urvillei est une espèce qui a totalement disparue de la zone de rejet (Capdeville et al., 2018), ce qui peut entraîner des conséquences importantes sur le fonctionnement de l'écosystème du fait de son rôle d'ingénieur de l'écosystème (voir §2.3). Plusieurs hypothèses ont été émises par Herteman (2010), la principale étant que la modification de l'écosystème due à une canopée plus importante qui limite la lumière au sol et dès lors, la croissance du biofilm dont *T. urvillei* se nourrit. En effet, cette espèce est majoritairement présente au niveau des drains où la canopée est ouverte ainsi que dans les clairières. Cependant, cette espèce pourrait profiter de cet apport de nutriments qui devrait aussi bénéficier au biofilm.

Si *T. urvillei* est un fort hyper-osmorégulateur (voir §3.2), il est, cependant, très sensible aux très faibles salinités proches de l'eau douce (50 % de mortalité en dessous de 50 mOsm·kg⁻¹ après 72h d'exposition). Cette sensibilité à la très forte dessalure du milieu distingue *T. urvillei* par rapport aux deux autres espèces étudiées. Cependant, une telle caractéristique est communément observée chez les autres espèces de crabe violoniste (Khanyile, 2012; Thurman et al., 2010). Cette espèce peut donc être une bonne indicatrice de l'impact des contaminants des eaux usées pour une espèce déjà sensible au choc osmotique.

Le protocole expérimental considéré a donc pris en compte une première acclimatation en eau de mer, puis une exposition directe de ce crabe à l'eau douce d'une part (choc osmotique) et aux eaux usées (choc osmotique associé à la toxicité des éléments polluants présents) d'autre part. En parallèle, des animaux maintenus en eau de mer (contrôles) sont aussi considérés. Les analyses utilisées suite à ces expositions sont les mêmes que celles déjà décrites (cf. paragraphe précédent). Les boîtes des circuits étant relativement grandes pour les individus de *T. urvillei* collectés, un accès à l'air individuel a été aménagé pour que les crabes puissent être partiellement émergés. De plus, la consommation en oxygène dans l'air après des expositions à l'eau douce, aux eaux usées et à l'eau de mer a été mesurée afin d'identifier comment *T. urvillei* réagit une fois émergé (mesures effectuées 2h après l'immersion). A noter que les interactions eaux usées - système digestif ne sont pas étudiées dans ce travail mais pourraient

constituer une voie majeure de l'impact des eaux usées. Compte tenu du dimorphisme sexuel important, seuls des individus mâles ont été utilisés.

4.3.2 Résultats et discussion

Les poids des crabes entre les différentes conditions ne sont pas significativement différents (anova 1 facteur, $F=0,78$, $ddl=2$, $p>0,05$). La petite masse des branchies de *T. urvillei* n'a pas permis de mesurer la SOD ni le MDA.

Tout comme chez *N. meinerti*, la consommation de *T. urvillei* augmente considérablement dans les eaux usées. Après 40 minutes, cette consommation est 4 fois plus élevée en eaux usées qu'en eau douce et en eau de mer, et est maintenue pendant au moins 2h à ce niveau (Figure 52A). En eau douce et en eau de mer, une légère baisse non significative est constatée, probablement attribuable au stress initial lorsque les animaux ont été transféré dans les chambres métaboliques. Après cette exposition, les crabes continuent de respirer à un niveau élevé (Figure 52B). Cette nouvelle mesure (consommation d'oxygène dans l'air) montre que *T. urvillei* continue d'être affecté après la fin de l'exposition en eaux usées. L'effet sur la consommation en oxygène peut mener à une réduction de la fitness du crabe, celui-ci ayant moins d'énergie disponible pour subvenir à d'autres besoins tels que la protection à une température anormale (Pörtner, 2010).

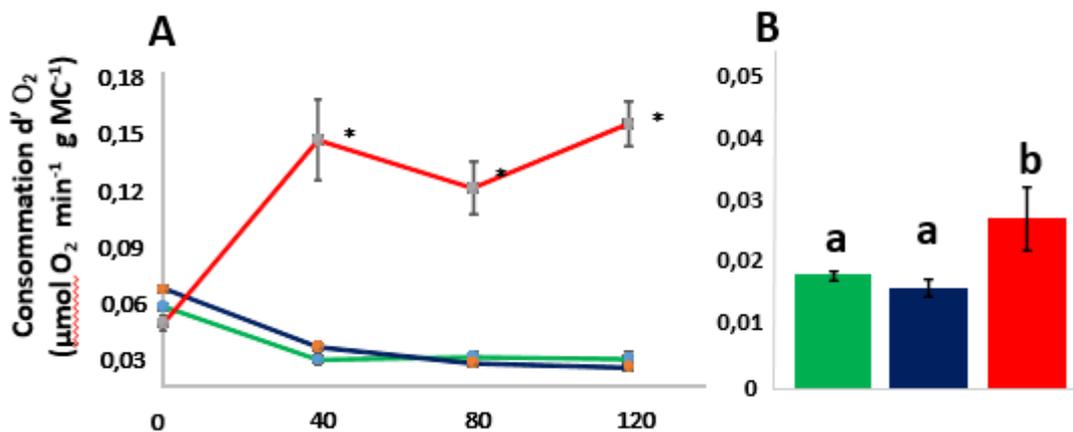


Figure 52 : Consommation en oxygène de *T. urvillei* déplacé de l'eau de mer en eau de mer (vert), en eau douce (bleu) et en eaux usées (rouge) pendant deux heures (A) et après cette exposition dans l'air (B). Les astérisques représentent des différences significatives ($p<0,05$).

Les PO de crabes (Figure 53A) exposés à l'eau douce et aux eaux usées sont plus basses que celles des crabes en eau de mer (anova 1 facteur, $F= 52,3$, $ddl= 2$, $p<0,001$) mais ne sont pas différentes entre elles contrairement à ce qui a été observé pour *N. meinerti*, tout comme les activités de la NKA (Figure 53B).

Tableau 3: Résultats de l'Anova à deux facteurs (branchie, traitement) des activités de la NKA (A) et de la catalase (B). Degré de liberté (ddl), variance (V), statistique de Fisher (F). Les différences statistiques sont en gras: $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***)

| Facteurs | A activité NKA | | | B activité CAT | | |
|----------------|----------------|-------|-------|----------------|---------|-----------------|
| | ddl | V | F | ddl | V | F |
| Branchie (Br) | 1 | 0,75 | 2,9 | 1 | 3149630 | 38,87*** |
| Traitement (T) | 2 | 0,85 | 3,3 | 2 | 1177365 | 14,53*** |
| T x Br | 2 | 0,002 | 0,008 | 2 | 106237 | 1,31 |
| Erreur | 30 | 0,26 | | 37 | 81028 | |

Il semble donc que la capacité osmorégulatrice de *T. urvillei* ne soit pas impactée par les eaux usées. Cependant, ceci pourrait être dû au fait que l'exposition à une eau douce représente déjà un stress important pour *T. urvillei* par rapport à *N. meinerti*. En effet, après 72h en eau douce, on observe 50 % de mortalité chez *T. urvillei*, bien que celui-ci soit un meilleur hyperosmorégulateur en eau saumâtre (Theuerkauff et al., 2018b). Cette sensibilité pourrait être spécifique à la population de Mayotte. En effet, il a déjà été observé des patterns différents entre des populations de crabes violonistes d'une même espèce comme c'est le cas pour *Minuca minax*, *Leptuca pugilator* et *Minuca pugnax* (Thurman, 2003). Néanmoins, cette sensibilité chez *T. urvillei* est rapportée également pour des populations d'Afrique du Sud (Khanyile, 2012). Ceci pourrait donc être généralisable à la partie Ouest de l'Océan Indien mais serait à confirmer. L'activité de la NKA (Figure 53B) au niveau des branchies antérieures est étonnamment élevée par rapport aux résultats obtenus précédemment sur les trois branchies les plus postérieures (§3.2). Cependant, les branchies utilisées ici sont la troisième et la cinquième branchie et la différence entre les 4^{èmes} et 5^{èmes} n'était déjà pas significative en eau de mer. Les valeurs retrouvées ici pour la 5^{ème} branchie sont toutefois cohérentes avec la première étude. De plus, il est possible que cette activité au niveau de la branchie antérieure soit liée à la régulation de l'ammonium qui s'effectue principalement au niveau des branchies antérieures et qui implique également la NKA ainsi que la H⁺-ATPase (Weihrach et al., 2017, 1998).

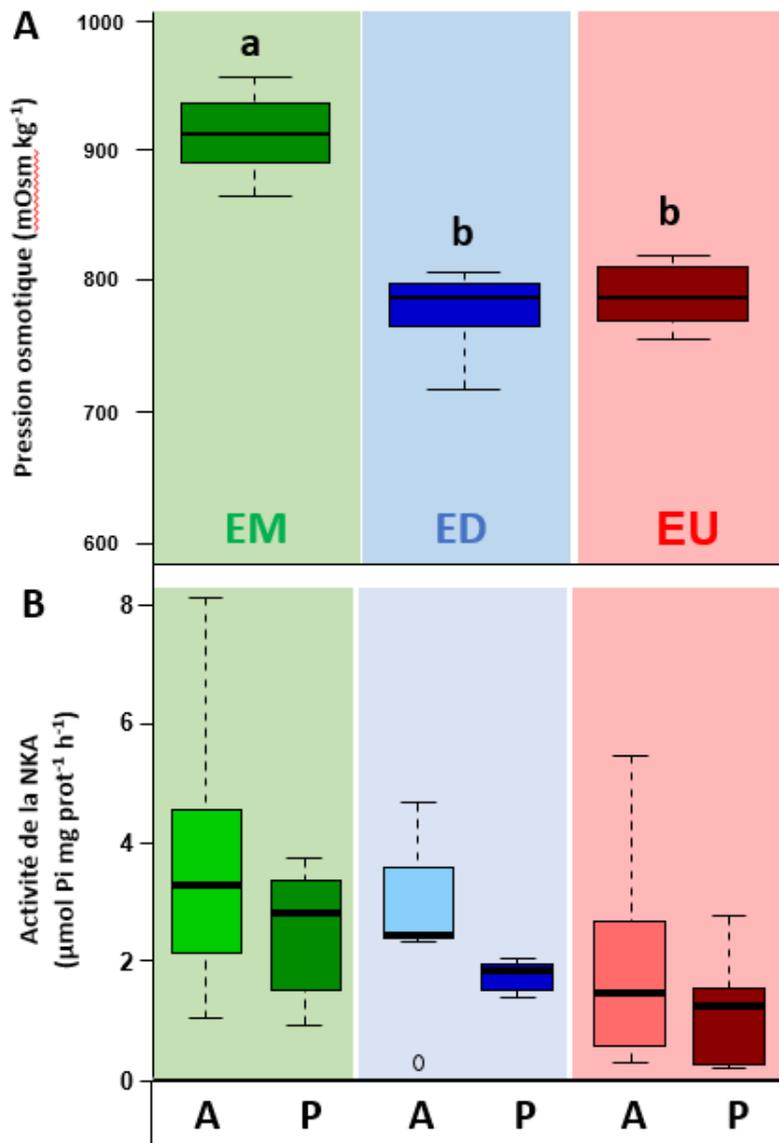


Figure 53 : Pressions osmotiques (A) et activité de la NKA branchiale (B) de *Tubuca urvillei* après 5h en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Branchies antérieures (A) et postérieures (P).

La production d'EROs dans l'hémolymphe (

Figure 54A) diminue chez les crabes exposés à l'eau douce (anova 1 facteur, $F=5,93$, $ddl= 2$, $p<0,05$) mais pas au niveau des crabes exposés aux eaux usées, tout comme l'activité de la catalase (

Figure 54B) mais uniquement au niveau de la branchie postérieure. A nouveau, il n'y a pas de différence significative entre les données obtenues à partir des animaux exposés à l'eau de mer et aux eaux usées. Ainsi, contrairement à l'eau saumâtre ($400 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$, §3.2), l'eau douce induit une modification de la balance oxydative chez *T. urvillei*. Tout comme chez *N. meinerti*, on observe une différence bien marquée au niveau de la régulation du stress osmotique entre

les branchies antérieures et postérieures avec une activité de la catalase plus importante au niveau des branchies postérieures. Cette différence pourrait être liée à la fonction osmorégulatrice (fonction coûteuse en énergie) de ces branchies induisant donc un métabolisme mitochondrial plus important et, dès lors, une production d'EROs plus forte (Rivera-Ingraham et al., 2016a). D'autre part, le fait que la catalase ne diminue pas en eaux usées au niveau de la branchie postérieure pourrait être liée à la présence de polluants afin de compenser une production d'EROs plus importante. En effet, l'activité de la catalase peut augmenter suite à une exposition à des polluants (Lushchak, 2011; Torres et al., 2002).

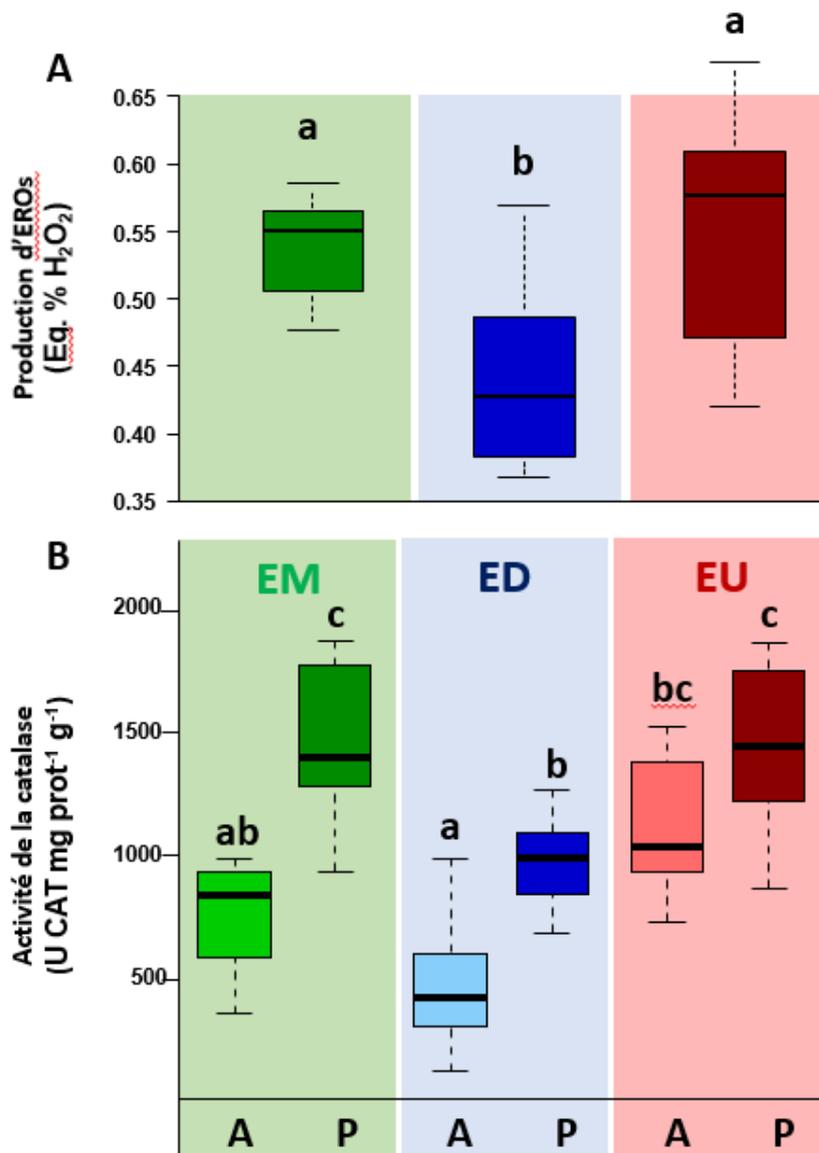


Figure 54 : Production d'EROs dans l'hémolymphe (A) et activité de la catalase branchiale (B) après 5h d'exposition en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Branchies antérieures (A) et postérieures (P).

4.4 Effets des eaux usées domestiques sur le crabe de mangrove *Parasesarma guttatum*

4.4.1 Introduction

Parasesarma guttatum est l'espèce dominante dans le faciès à *Cerriops* de la mangrove de Malamani (Capdeville et al., 2018). Il s'agit aussi d'une espèce présente dans toutes les mangroves de l'ouest de l'océan Indien (Gillikin and Schubart, 2004). Son genre *Parasesarma* est lui très représenté dans l'ensemble de l'Océan Indien avec pas moins de 19 espèces (Davie, 2003).

Il s'agit d'un crabe relativement petit, avec une carapace mesurant au maximum 26 mm de largeur et 21 mm de longueur. Il vit sur le sédiment et peut être observé occasionnellement sur les palétuviers mais uniquement au niveau des racines (Fratini et al., 2005; Ruwa, 1990; Vannini et al., 1997). Si cette espèce ne creuse pas de terrier, contrairement à *N. meinerti* et *T. urvillei*, elle peut, tout de même, entretenir des crevasses lorsque les abris manquent (Gillikin and Schubart, 2004). Elle est néanmoins considérée comme espèce ingénieure de l'écosystème du fait de son rôle dans le recyclage de la matière organique et du renouvellement des palétuviers par la prédation que *P. guttatum* occasionne sur les feuilles et les propagules. *P. guttatum* est connu par exemple pour éliminer rapidement toute litière tombée au sol dans les mangroves Kenyanes (Slim et al., 1997). Contrairement aux autres espèces présentes dans la zone de rejet, *P. guttatum* est impacté positivement par le rejet des eaux usées (voir §1.2.2). En effet, si la plupart des Ocypodidae ont disparus de la zone de rejet, les autres Sesarmidae disparaissent également ou voient leur proportion dans la population diminuer (Capdeville et al., 2018).

P. guttatum a donc été exposé aux eaux usées domestiques de Malamani et à de l'eau douce après une acclimatation initiale en eau de mer. Sa réponse physiologique au niveau de la balance énergétique, osmorégulatrice et redox a été étudiée expérimentalement. Tout comme pour *T. urvillei*, seuls des individus mâles ont été utilisés.

4.4.2 Résultats et discussion

P. guttatum diminue fortement sa consommation en oxygène lorsqu'il est exposé aux eaux usées, jusqu'à ne plus en consommer après 2h d'exposition (Figure 55A). Il pourrait être ainsi

en dépression métabolique pour réduire son métabolisme basal et optimiser sa survie en utilisant son énergie pour les fonctions vitales (Guppy and Withers, 1999; Hand and Hardewig, 1996), et ce, jusqu'à l'anoxie. Plusieurs études ont montré que des polluants tels que certains métaux peuvent réduire le taux respiratoire (Barbieri and Doi, 2011; Barbieri and Paes, 2011; Capparelli et al., 2016; Depledge, 1984; Spicer and Weber, 1991), mais aucune ne montre une telle réduction. Cette dépression du métabolisme aérobie est singulière et pourrait être liée à un arrêt de l'activité ventilatoire ou à des dommages histologiques au niveau des branchies comme cela a été observé pour *Neohelice granulata* exposé à de fortes concentrations en ammonium (Rebelo et al., 2000). Les eaux usées domestiques de Malamani contiennent jusqu'à 100 mg·l⁻¹ d'ammonium (Herteman, 2010) ce qui induit chez plusieurs espèces de crustacés, une augmentation de la consommation en oxygène (Barbieri, 2010; Barbieri and Paes, 2011; Chen and Lin, 1991, 1992a; Dutra et al., 2016). Cette réduction de la respiration aérobie doit entraîner une forte hypoxie fonctionnelle au niveau des tissus et des cellules des crabes. La survie de *P. guttatum* dépendra donc de sa tolérance à l'hypoxie. En effet, les crabes peuvent résister à l'hypoxie en favorisant le métabolisme anaérobie via la glycolyse (Geihs et al., 2013) avant de rentrer en dépression métabolique si l'exposition est prolongée. De manière générale, les espèces mobiles ont tendance à être moins tolérantes (Sagasti et al., 2001), car elles peuvent plus facilement éviter les zones anoxiques.

L'hypoxie peut également affecter le comportement. Par exemple, le polychète bioturbateur *Malacoceros fuliginosus* quitte les terriers dans lesquels il vit (dans le sédiment) pour rejoindre la colonne d'eau lorsque la concentration en oxygène atteint un niveau critique (Diaz and Rosenberg, 1995). Cette réaction est commune à de nombreux autres invertébrés (Riedel et al., 2014). Quitter son terrier représente donc un risque important et engendre une exposition au milieu aérien privé d'abri. L'anoxie réduit également la territorialité et l'agressivité des crabes (Riedel et al., 2014; Sneddon et al., 1999), ce qui pourrait également bénéficier à *P. guttatum* qui est une espèce opportuniste.

L'anoxie induite par les eaux usées pourrait également influencer une étape importante dans le cycle de vie des crabes telle que le recrutement. En effet, plusieurs études (Das and Stickle, 1994; Kodama and Horiguchi, 2011; Tankersley and Wieber, 2000) ont démontré que les stades mégaloopes et les juvéniles de différentes espèces sont affectés et que leur survie pourrait être réduite dans les zones comportant une couche anoxique. Les espèces benthiques évitent les épisodes d'anoxie chronique mais ne peuvent éviter des phénomènes imprévisibles (Bell and

Eggleston, 2005). En effet, lors de ces épisodes, le risque de prédation ou de blessures pourrait forcer ces espèces à rester dans leur abri.

Cependant, et contrairement à *N. meinerti* et *T. urvillei*, *P. guttatum* consomme la même quantité d'oxygène dans l'air après qu'il ait été immergé en eau de mer, en eau douce ou en eaux usées (Figure 55B). Ceci qui laisse à penser que les branchies sont toujours fonctionnelles et que le stress est moins persistant que chez les autres espèces. Toutefois, sa respiration aérienne doit être assurée par ses poumons situés également dans la cavité branchiale (voir §3.3).

Il n'y a pas de différence significative au niveau de la consommation en oxygène entre l'eau de mer et l'eau douce, confirmant que ce crabe est un bon hyper/hypo-osmorégulateur. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus chez *T. urvillei* et *N. meinerti* mais différent de ceux observés chez la plupart des décapodes euryhalins (King, 1965; Paital and Chainy, 2012; Rivera-Ingraham et al., 2016a). Ces crabes sont ainsi préparés en permanence aux changements de salinité. En effet, pour de nombreuses espèces de crabe telles que *Carcinus maenas* des réarrangements de la structure de leur branchie lors d'un passage en eau douce s'opèrent, ce qui entraîne donc une dépense énergétique importante (Barra et al., 1983; Compere et al., 1989; Pequeux, 1995), contrairement à ce qui est observé pour *N. meinerti* et *T. urvillei* chez qui aucune différence n'est observée entre l'eau douce et l'eau de mer (Theuerkauff et al., 2018b). Ainsi, la machinerie impliquée en milieu hypo et hyper-osmotique est déjà en place peu importe le milieu.

Au niveau branchial, on observe une différence significative de la respiration entre les branchies antérieures et postérieures mais pas entre les différentes conditions (Figure 56, Tableau 4). Les branchies antérieures consomment donc d'avantage que les postérieures avec respectivement $22,1 \pm 8,7$ et $3,45 \pm 1,8 \mu\text{mol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Les branchies antérieures seraient donc plus adaptées à la respiration tout comme cela a été observé chez *N. meinerti* et *T. urvillei* ainsi que chez plusieurs autres espèces de crabe (Rivera-Ingraham et al., 2016a). Ceci confirme l'hypothèse développée par Copeland et Fitzjarrell (1968) sur la spécialisation des branchies chez certains crabes : les branchies antérieures ont un épithélium fin adapté à la respiration tandis que les branchies postérieures possèdent un épithélium plus épais composé de nombreux ionocytes, cellules spécialisées dans l'osmorégulation et très riches en mitochondries

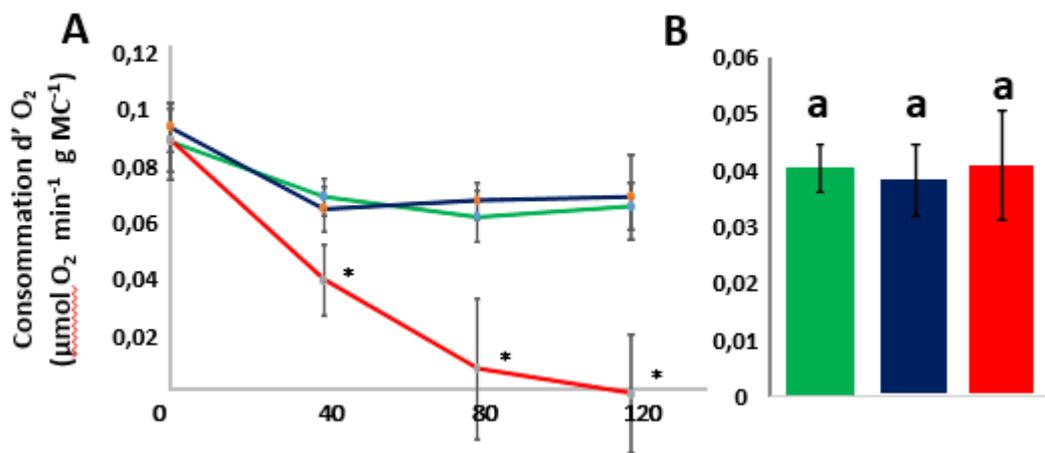


Figure 55 : Consommation en oxygène de *P. guttatum* déplacé de l'eau de mer en eau de mer (vert), en eau douce (bleu) et en eaux usées (rouge) pendant deux heures (A) et après cette exposition dans l'air (B). Les astérisques représentent des différences significatives ($p < 0,05$).

Cependant, il n'y a pas d'effet des eaux usées sur la pression osmotique. En effet, si la dessalure induit bien une diminution de la PO, il n'y a pas de différence entre les eaux usées et l'eau douce (Figure 57A, Tableau 4). Par contre, l'activité de la NKA varie selon le type de branchie et la condition d'exposition avec des activités supérieures pour les branchies postérieures (Figure 57B et Tableau 5). Si l'activité de la NKA de la branchie postérieure augmente avec la dessalure, les eaux usées induisent tout de même une diminution de l'activité de la NKA par rapport à l'eau douce. L'augmentation de l'activité suite à la dessalure est typiquement observée chez les crustacés exposés à un milieu hypo-osmotique. Cela permet à l'organisme d'absorber un maximum d'ions pour maintenir son homéostasie interne (Lucu and Towle, 2003; Pequeux, 1995; Siebers et al., 1982; Towle et al., 1976). L'ammonium présent dans les eaux usées devrait donc induire une augmentation de l'activité de la NKA afin de l'excréter en dehors des cellules (Weihrauch et al., 2004), comme cela a été observé chez la plupart des crustacés (Garçon et al., 2007; Leone et al., 2017; Ren et al., 2015). Toutefois, Martin et al. (2011) ont montré que l'ammonium peut aussi induire une diminution de l'activité de la NKA branchiale chez *Metacarcinus magister*, espèce qui tolère de fortes concentrations en ammonium dans l'hémolymphe sans signe de faiblesse.

Tableau 4 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis entre les 3 milieux d'exposition (eau de mer, eau douce et eaux usées) pour la consommation d'O₂ des branchies isolées (RR), la pression osmotique (PO) de l'hémolymphe et la production d'EROs. ddl= degré de liberté ; X²= valeur du Chi² ; *= différence significative.

| | X ² | ddl | p value |
|-----|----------------|-----|------------|
| RR | 87,853 | 5 | < 2,2e-16* |
| PO | 15,759 | 2 | 0,0003784* |
| ROS | 8,7654 | 2 | 0,01249* |

Tableau 5 : Résultats de l'ANOVA à deux facteurs sur l'activité enzymatique de la NKA (A), SOD (B) et catalase (C) selon la condition d'exposition (eau de mer, eau douce et eaux usées) et le type de branchie (antérieure ou postérieure). ddl= degré de liberté; MS= variance; F ratio. Les effets significatifs sont notés avec des astérisques : ** (p<0,01) *** (p<0,001).

| (A) | | Activité enzymatique de la NKA | | |
|----------------------|-----|-------------------------------------|-------------|--|
| Facteur | ddl | MS | F | |
| Condition (D) | 2 | 0,11936 | 6,8336** | |
| Type de Branchie (E) | 1 | 2,61415 | 149,6676*** | |
| D*E | 2 | 0,23233 | 13,3013*** | |
| (B) | | Activité enzymatique de la SOD | | |
| Facteur | ddl | MS | F | |
| Condition (D) | 2 | 78172 | 0,8326 | |
| Type de Branchie (E) | 1 | 99539 | 1,0601 | |
| D*E | 2 | 12086 | 0,1287 | |
| (C) | | Activité enzymatique de la catalase | | |
| Facteur | ddl | MS | F | |
| Condition (D) | 2 | 78927 | 0,8788 | |
| Type de Branchie (E) | 1 | 110538 | 1,2307 | |
| D*E | 2 | 31603 | 0,3519 | |

En revanche, la balance oxydative des crabes exposés aux eaux usées est altérée. Si la dessalure n'induit pas de stress oxydatif, les crabes exposés aux eaux usées ont, cependant, 27 % d'EROs en plus dans l'hémolymphe (Figure 58A, Tableau 4). Au niveau des activités des enzymes antioxydantes, il n'y a pas de différence ni entre les conditions expérimentales ni entre les branchies, que ce soit pour l'activité de la SOD (Figure 58B, Tableau 5B) ou de la catalase (Figure 58C, Tableau 5C). Encore une fois, l'ammonium présent dans les eaux usées pourrait être à l'origine de ces modifications et/ou agir en synergie avec d'autres contaminants. En effet,

ce dérèglement de la balance a déjà été observé chez la crevette *Macrobrachium amazonicum* (Pinto et al., 2016) ou encore l'amphipode *Monoporeia affinis* (Gorokhova et al., 2013). *P. guttatum* est donc tolérant à la dessalure, qui n'induit pas de production d'espèce réactive de l'oxygène, contrairement à ce qui est observé chez de nombreuses espèces (Rivera-Ingraham et al., 2016a, 2016b; Rodriguez-Ariza et al., 1993). Par exemple, la production d'EROs augmente de 68 % chez le crabe vert *Carcinus aestuarii* après un transfert en eau douce (Rivera-Ingraham et al., 2016a). Cette production d'EROs pourrait être liée au très fort métabolisme induit chez ces espèces lors du choc hypo-osmotique, qui entraîne une surconsommation d'O₂ contrairement à *P. guttatum*. Or, les mitochondries sont le principal lieu de production des

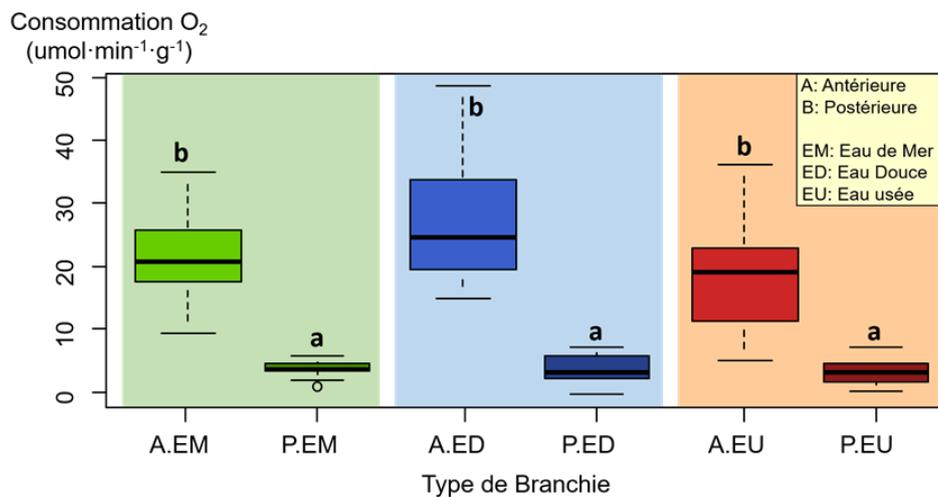


Figure 56 : Consommation en oxygène des branchies antérieures (A) et postérieures (B) après une exposition de 5h en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Les lettres représentent des différences significatives ($p < 0,05$).

EROs chez les animaux, cette respiration pourrait alors être à l'origine de cette production d'EROs (Barja, 2007; Zorov et al., 2014) bien que cette hypothèse soit remise en question (Salin et al., 2015). Une autre hypothèse est que les mécanismes de défenses de *P. guttatum* soient plus efficaces et mieux adaptés au stress osmotique. Alors que la production d'EROs dans l'hémolymph augmente suite à l'exposition aux eaux usées, ce n'est pas le cas des mécanismes antioxydants (SOD, catalase). Ces EROs vont potentiellement induire des dommages importants à l'ADN et aux lipides (voir §2.5.4.2) et ainsi induire un stress oxydant. C'est le cas au niveau de la glande digestive de la moule *Mytella guyanensis*, chez qui les dommages aux lipides ont augmenté après une exposition aux eaux usées alors que l'activité de la SOD reste inchangée (Torres et al., 2002). Le stress oxydant peut également causer une dégénération ou

une inactivation des pompes membranaires comme la NKA chez les mammifères (Ostadal et al., 2004).

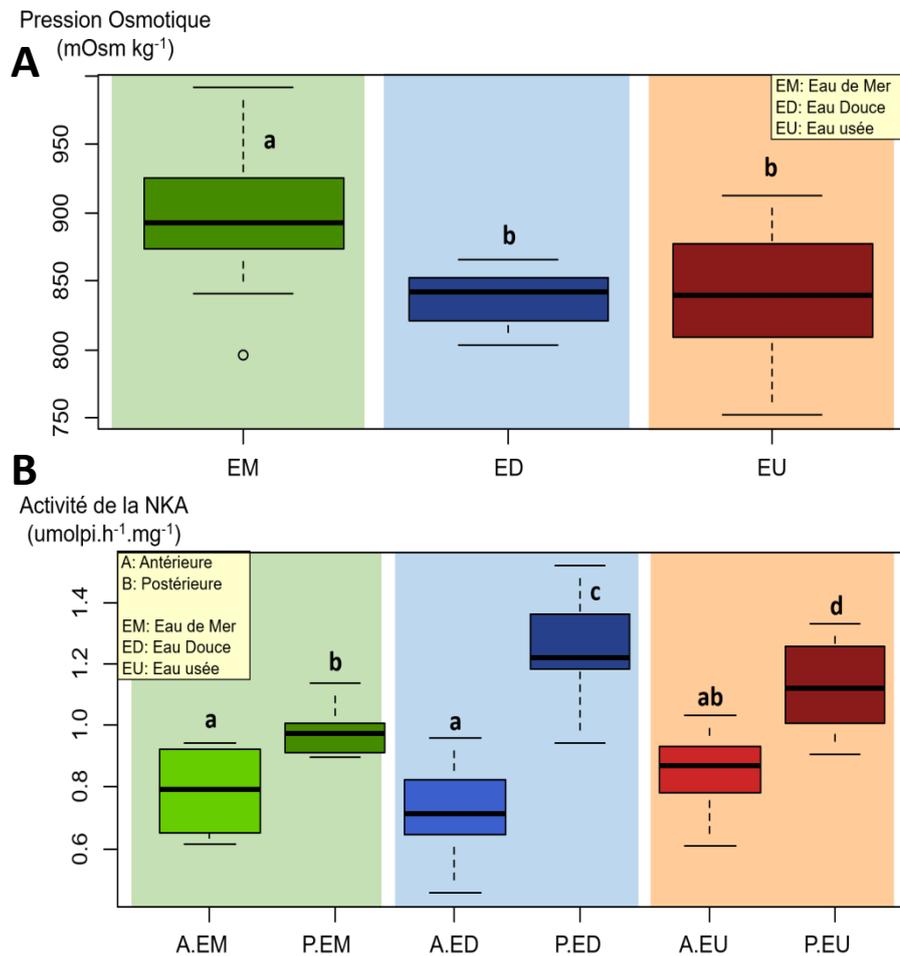


Figure 57 : Pressions osmotiques de l'hémolymphe (A) et activité de la NKA branchiale (B) de *P. guttatum* après 5h en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Branchies antérieures (A) et postérieures (P).

L'anoxie fonctionnelle décrite ci-dessus peut également être à l'origine d'un stress oxydant au niveau des tissus, et plus précisément, lors de la période de réoxygénation (Hermes-Lima et al., 2015). Bien que les EROs soient produit principalement au niveau de la mitochondrie lors du métabolisme aérobie, leur production pourrait être régulée de manière différente que la consommation d'O₂ (Barja, 2007). Ainsi, la production d'H₂O₂ est même inversement proportionnelle au métabolisme chez la truite commune (Salin et al., 2015). Lorsque la plupart des organismes entrent en anoxie, le métabolisme diminue fortement tout comme l'activité

mitochondriale et la production d'EROs qui est ainsi fortement limitée par l'absence d'O₂ (Figure 59). Lorsque l'oxygène est de nouveau disponible, il y a alors une très forte production d'EROs qui produit des dommages importants pouvant mener jusqu'à l'apoptose (Hermes-Lima et al., 2015; Moreira et al., 2016).

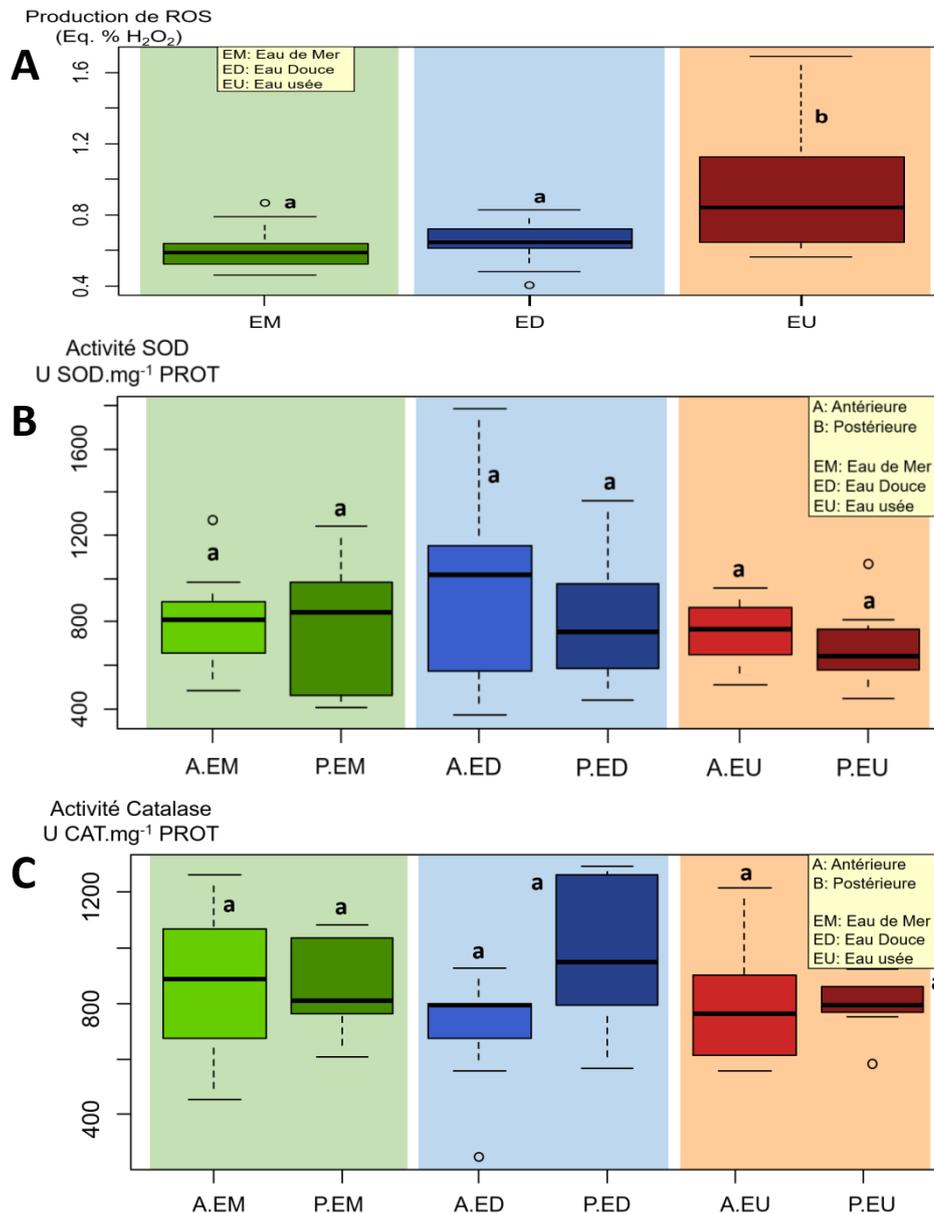


Figure 58 : Production d'EROs dans l'hémolymph (A), activité de la SOD (A) et de la catalase branchiale (C) après 5h d'exposition en eau de mer (EM), eau douce (ED) et eaux usées (EU). Branchies antérieures (A) et postérieures (P).

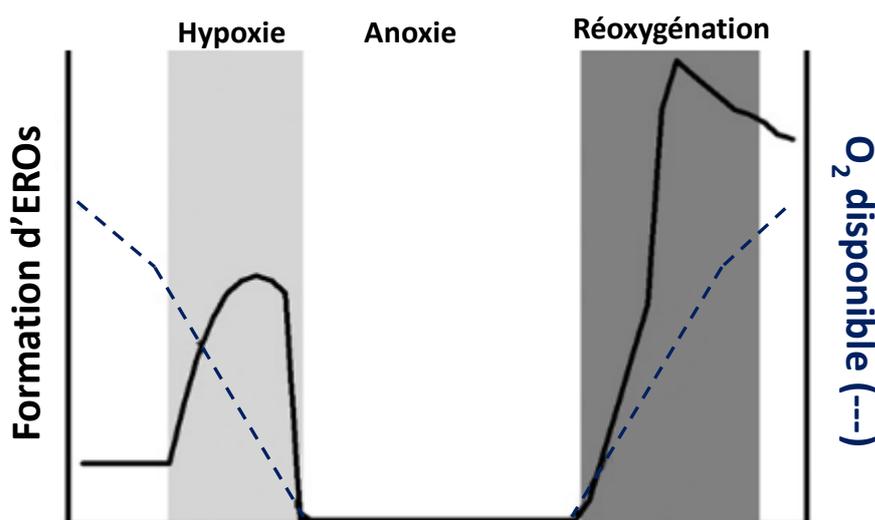


Figure 59 : Modèle de l'évolution de la quantité d'EROs durant l'hypoxie puis l'anoxie chez les organismes pratiquant une préparation au stress oxydatif. Modifié d'après Welker et al. (2013).

Chez les organismes subissant régulièrement des situations d'anoxie, les EROs diminuent et les cellules se préparent à un excès d'EROS en synthétisant davantage d'antioxydants : c'est une préparation au stress oxydatif (Moreira et al., 2016). *P. guttatum* semble donc tolérant à l'hypoxie (du moins au niveau de la catalase et de la SOD), car il ne suit pas ce pattern présent chez de nombreuses espèces. Par exemple, l'activité de la SOD augmente pendant l'anoxie chez la crevette décapode *Litopenaeus vannamei* et diminue pendant la réoxygénation, alors que les dommages aux lipides (MDA) diminuent pendant la période d'anoxie mais augmentent brusquement lors de la réoxygénation (Li et al., 2016b). C'est également le cas pour le vert plat marin *Macrostomum lignano* qui, suite à un choc hypo-osmotique, rentre en dépression métabolique tout en augmentant la synthèse de la glutathion-S-transférase (Rivera-Ingraham et al., 2016b). La quantité d'EROs produite lors de l'hypoxie puis pendant l'anoxie chez ces organismes (Figure 59) pourrait faire partie du signal permettant la synthèse accrue des antioxydants, leur rôle en tant qu'activateurs de facteurs de transcriptions est en effet de plus en plus étudié (Moreira et al., 2017; Oliveira et al., 2018; Welker et al., 2013). Ainsi, ils agiraient sur les facteurs Nrf2, HIF-1, NK-κB, p53 et FoxO qui enclencheraient l'expression d'antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (Hermes-Lima et al., 2015). Les EROs sont même également impliqués dans l'activation de facteurs de transcriptions liés à l'osmorégulation chez la souris (Zhou et al., 2005) et l'homme (St-Louis et al., 2012) mais aucune étude ne porte à ce jour sur les organismes marins.

Ce stress oxydatif peut également affecter le métabolisme énergétique pendant l'hypoxie et la réoxygénation (Abele et al., 2007; Clanton, 2007), ce métabolisme pouvant également être impacté lors de la récupération via un taux métabolique important (connu sous le nom de « dette

en oxygène ») (Capparelli et al., 2016; Herreid, 1980; Kurochkin et al., 2009; Lewis et al., 2007). Ainsi, le crabe araignée *Maja brachydactyla* surconsomme du dioxygène pendant 15 à 20h après un épisode d'anoxie (Cerezo Valverde et al., 2012).

En terme énergétique, un autre organe mérite d'avantage d'attention : l'hépatopancréas. Il est lui aussi soumis à un stress oxydatif important après un épisode d'anoxie lors de la réoxygénation (Parrilla-Taylor and Zenteno-Savín, 2011; Zenteno-Savín et al., 2006). De plus, cet organe voit son fonctionnement modifié dans ces situations cycliques d'anoxie, comme peut l'induire le rejet cyclique d'eaux usées dans la mangrove de Malamani. En effet, Brown-Peterson et al. (2008) ont montré que les épisodes cycliques d'anoxie présentent des impacts sur la physiologie des décapodes différents que l'anoxie chronique avec notamment, un shift métabolique vers la néoglucogénèse (voir glossaire) au niveau de l'hépatopancréas. Ainsi, la gestion des réserves énergétiques est modifiée, permettant de maintenir le taux de glucose dans l'hémolymphe.

4.5 Comparaison des trois espèces

4.5.1 Physiologie comparée

4.5.1.1 Métabolisme

Le métabolisme basal pour *P. guttatum*, que ce soit dans l'eau ou dans l'air, est plus important que pour *N. meinerti* et *T. urvillei*, (Figure 60), ces deux espèces présentant un métabolisme semblable. Cette différence peut être liée au comportement très actif de *P. guttatum*, que ce soit pour la recherche des feuilles de palétuviers ou pour échapper aux prédateurs. En effet, Seibel et Drazen (2007) ont montré que la mobilité des organismes a un effet important sur le métabolisme basal. Ainsi, les espèces qui ont les plus fortes consommations en oxygène correspondent souvent aux plus mobiles, comme chez les Crangonidae benthiques (González-Ortegón et al., 2013). La consommation en oxygène des trois espèces semble plus forte dans l'eau que dans l'air. Davantage de données permettraient de tester cette hypothèse mais également de comparer les espèces entre elles et de comparer leurs différences au regard de leur degré de terrestrialisation (O'mahoney and Full, 1984). Les résultats obtenus sont cohérents avec la littérature, qui pointent également un impact important de la température (Fusi et al., 2016b, 2015). Or, l'impact des eaux usées n'a ici été testé qu'à 25°C et pourrait bien être encore d'avantage marqué à des températures supérieures qui induisent des consommations en

oxygène encore plus importantes (Fusi et al., 2016b). En effet, les rejets d'eaux usées sont planifiés selon l'agenda de marée et peuvent donc avoir lieu à toute heure du jour ou de la nuit, or les températures moyennes journalières varient entre 20 et 32°C le long de l'année, mais peuvent atteindre des extrêmes plus importants.

La réaction aux eaux usées est très différente chez *P. guttatum* qui rentre en dépression métabolique contrairement aux deux autres espèces pour lesquelles la consommation en oxygène explose. Il conviendrait d'étudier plus en détail cette réaction, qui ne semble pas être accompagnée de dégâts importants au niveau des branchies (Ludovic Lemoine com. pers.) et qui n'empêche pas le crabe d'avoir un métabolisme normal dans l'air après une exposition de 2h. Cet arrêt de la consommation en oxygène pourrait donc être davantage lié à un arrêt de la ventilation de la cavité branchiale par les scaphognathites.

La réaction de *P. guttatum* est plus rare étant donnée son amplitude. Une diminution de la consommation d'oxygène a déjà été observée chez de nombreux organismes exposés à des métaux (Barbieri and Doi, 2011; Barbieri and Paes, 2011; Capparelli et al., 2016; Depledge, 1984; Spicer and Weber, 1991) ou encore chez la carpe *Cyprinus carpio* (Ramakritinan et al., 2005) exposée à un effluent d'une distillerie mais rarement aussi forte. Burnett et al. (2006) ont montré une réduction de moitié de la respiration chez le crabe *Callinectes sapidus* suite à une infection bactérienne (*Vibrio campbellii*, Gammaproteobacteria). Les aspects potentiellement néfastes de la charge en bactéries des eaux usées sont discutés au paragraphe 6.2.

L'augmentation de la respiration est une réaction courante chez de nombreux organismes marins exposés à des polluants comme le naphtalène (Vijayavel and Balasubramanian, 2006), l'ammonium (Barbieri, 2010; Barbieri and Paes, 2011; Chen and Lai, 1992; Chen and Lin, 1992b), ou encore les insecticides (Rodriguez and Monserrat, 1991). Cette augmentation suite à un stress fait suite à une fréquence plus importante du battement des scaphognathites comme observée ici, accompagnée d'un rythme cardiaque plus soutenu (Bamber and Depledge, 1997; Wilkens et al., 1985).

Pinder et al. (1993) ont montré une réaction intéressante à l'hypercapnie chez le crabe semi-terrestre *Cardisoma guanhumi* qui peut soit entrer en apnée lorsque la pression partielle de CO₂ augmente brutalement (avec un arrêt du battement des scaphognathites mais avec des rythmes cardiaques qui restent normaux), soit augmenter sa consommation en oxygène (avec hyperventilation) lorsque l'hypercapnie est progressive. L'excrétion du CO₂ chez les crabes intertidaux et terrestres est un procédé complexe. Elle a lieu dans la branchie et les poumons

(crabes bimodaux et terrestres) mais l'importance de chaque organe dépend de l'espèce. Ainsi, *Ocypode cordimanus* l'excrète principalement via les poumons, *Mictyris longicarpus* ainsi que *Geograpsus grayi* et *Gecarcoidea natalis* utilisent autant les poumons que les branchies, alors que *Geograpsus crinipes* et *Cardisoma hirtipes* utilisent, eux, principalement leurs branchies (Farrelly and Greenaway, 1994). Chez les Grapsidae comme *N. meinerti* et *P. guttatum*, les branchies ne seraient pas impliquées dans l'excrétion du CO₂ (Morris, 2002).

Les Ocypodidae disposent eux d'un branchiostégite transformé en poumon dont l'efficacité est variable selon les espèces en fonction du nombre de ramifications et de leur complexité. Néanmoins, leur degré de terrestrialisation a récemment été revu à la hausse, via la visualisation par moulage du poumon qui a révélé une grande complexité et une grande efficacité (Paoli et al., 2015). Ainsi, et comme confirmé par les outils moléculaires (Shih et al., 2016; Tsang et al., 2014), les crabes violonistes auraient développé ce caractère chez un ancêtre commun avec les crabes fantômes (Ocypodinae) qui, bien que toujours inféodés à la mer, sont clairement adaptés à la vie terrestre pour la respiration (Hartnoll et al., 2014). Ils dépendent néanmoins toujours de leurs branchies pour le relargage du CO₂ hémolympatique (Lin and Tsai, 2012). Cette adaptation à la respiration aérienne chez de nombreux Ocypodoidea intertidaux serait même associée à la fermeture de leur terrier à marée haute, piégeant une bulle dans le terrier dont ils seraient dépendant pour respirer (Fusi et al., 2015; Maitland, 1986).

Il serait également intéressant d'approfondir les connaissances sur la tolérance de *P. guttatum* à l'hypoxie, ainsi que les conséquences de la réoxygénation chez *P. guttatum* (la réoxygénation peut causer un stress oxydatif important), et de la comparer aux deux autres espèces. Ces connaissances sont d'autant plus importantes que l'hypoxie est un phénomène de plus en plus fréquent dans les écosystèmes marins, notamment à cause des eaux usées (Diaz and Rosenberg, 2008). De plus, il serait également intéressant de mesurer le métabolisme de ces trois espèces lorsqu'elles reviennent dans l'eau de mer après une exposition en eaux usées.

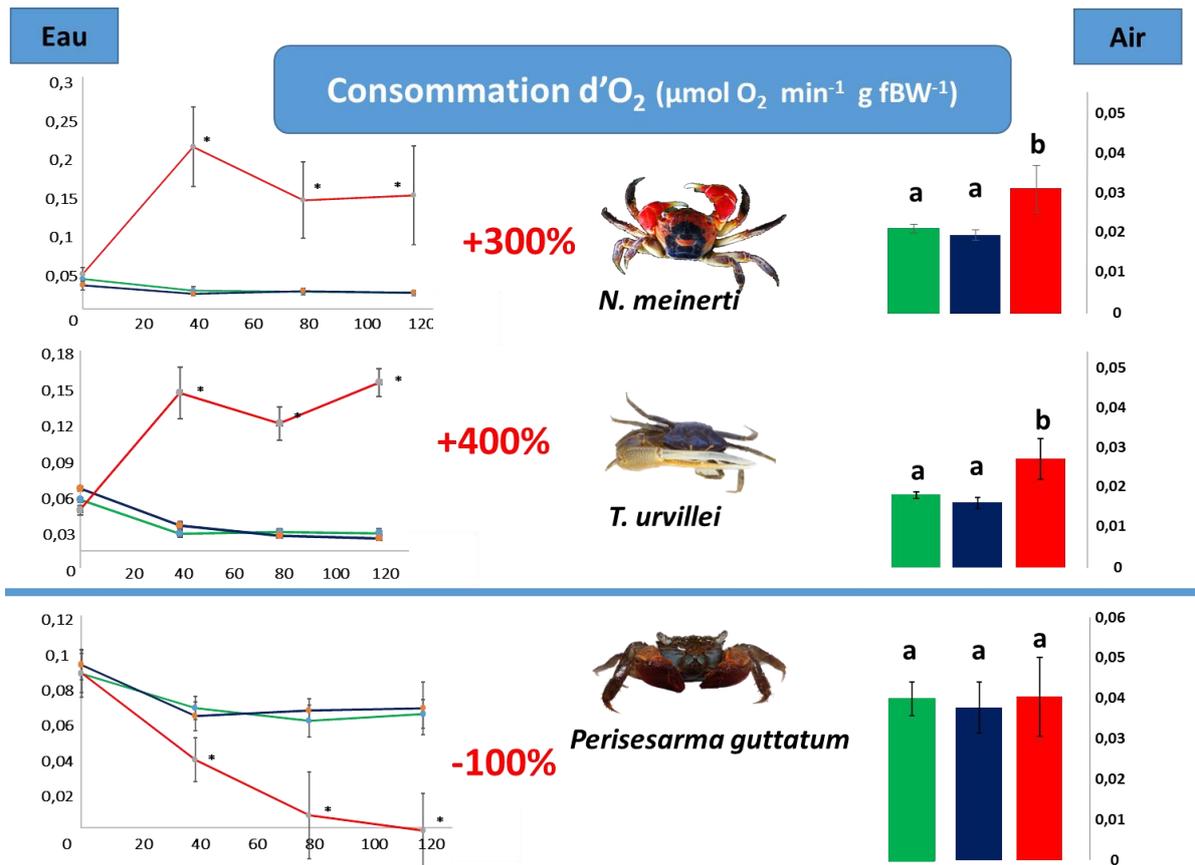


Figure 60 : Comparaison du métabolisme (consommation en O₂) après un passage de l'eau de mer à l'eau de mer (vert), eau douce (bleu) et eaux usées (rouge) pendant 2h, suivi du métabolisme aérien après la fin de cette exposition.

4.5.1.2 Osmorégulation

Les trois espèces de crabe de mangrove présentent de fortes similitudes : ils sont tous hyper-hypo-osmorégulateurs et montrent une différenciation entre les branchies antérieures, spécialisées dans la respiration et les postérieures, spécialisées dans l'osmorégulation (Compere et al., 1989; Péqueux et al., 1988). Les eaux usées ont un impact sur l'osmorégulation des Sesamidae uniquement, réduisant la capacité osmorégulatrice de *N. meinerti* et réduisant les activités de la NKA dans ses branchies antérieures et dans les branchies postérieures de *P. guttatum* (Figure 61). Bien que la NKA soit impliquée dans l'excrétion de l'ammonium, cette diminution pourrait être liée à la concentration importante de l'ammonium présente dans les eaux usées, comme observé chez le crabe *Dungeness Metacarcinus magister* (Martin et al., 2011). La diminution de la NKA chez *P. guttatum* pourrait être liée à la réduction de son métabolisme. En effet, Ramnanan et Storey (2006) ont montré que celle-ci pouvait être fortement réduite lors d'une dépression métabolique telle que l'estivation. La diminution de la

capacité osmoréglatrice est représentative de la condition physiologique de *N. meinerti* (Lignot et al., 2000). Ce crabe est donc plus sensible que les deux autres espèces malgré le fait qu'il soit le plus fort hyper-hypo-osmoréglateur. De nombreux polluants peuvent affecter la capacité osmoréglatrice des crabes tels que les hydrocarbures, les métaux ou encore l'ammonium (Bamber and Depledge, 1997; Capparelli et al., 2016; Rebelo et al., 1999; Romano and Zeng, 2010).



N. meinerti

| Animal | Hémolymphe | | Branchie | | | | |
|------------------|------------|----------|------------|---|-------------|---|---|
| | ♀ | ♂ | Antérieure | | Postérieure | | |
| | | | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | |
| R _{eau} | = | | R | ↗ | ↗ | = | = |
| R _{air} | = | PO ↘ ↘ | NKA | = | = | = | = |
| | | EROs = ↗ | SOD | = | = | = | = |
| | | | CAT | = | = | ↗ | = |
| | | | MDA | = | = | = | = |

| Animal | Hémolymphe | | Branchie | | | | |
|------------------|------------|----------|------------|---|-------------|---|---|
| | ♀ | ♂ | Antérieure | | Postérieure | | |
| | | | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | |
| R _{eau} | ↗ | | R | = | = | = | = |
| R _{air} | ↗ | PO ↘ ↘ | NKA | ↘ | ↘ | = | = |
| | | EROs = = | SOD | = | = | ↗ | = |
| | | | CAT | = | = | = | ↗ |
| | | | MDA | = | = | = | = |

Population ↘



T. urvillei

| Animal | Hémolymphe | | Branchie | | |
|------------------|------------|-------------|------------|-------------|---|
| | Antérieure | Postérieure | ♂ | | |
| | | | Antérieure | Postérieure | |
| R _{eau} | = | | R | / | / |
| R _{air} | = | PO ↘ | NKA | = | = |
| | | EROs | SOD | / | / |
| | | | CAT | = | ↘ |
| | | | MDA | / | / |

| Animal | Hémolymphe | | Branchie | | |
|------------------|------------|-------------|------------|-------------|---|
| | Antérieure | Postérieure | ♂ | | |
| | | | Antérieure | Postérieure | |
| R _{eau} | ↗ | | R | / | / |
| R _{air} | ↗ | PO = | NKA | = | = |
| | | EROs ↗ | SOD | / | / |
| | | | CAT | ↗ | ↗ |
| | | | MDA | / | / |

Population ↘



P. guttatum

| Animal | Hémolymphe | | Branchie | | |
|------------------|------------|-------------|------------|-------------|---|
| | Antérieure | Postérieure | ♂ | | |
| | | | Antérieure | Postérieure | |
| R _{eau} | = | | R | = | = |
| R _{air} | = | PO ↘ | NKA | = | ↗ |
| | | EROs = | SOD | = | = |
| | | | CAT | = | = |
| | | | MDA | / | / |

| Animal | Hémolymphe | | Branchie | | |
|------------------|------------|-------------|------------|-------------|---|
| | Antérieure | Postérieure | ♂ | | |
| | | | Antérieure | Postérieure | |
| R _{eau} | ↘ | | R | = | = |
| R _{air} | = | PO = | NKA | = | ↘ |
| | | EROs ↗ | SOD | = | = |
| | | | CAT | = | = |
| | | | MDA | / | / |

Population ↗

Figure 61 : Synthèse des variations des différents biomarqueurs après passage en eau douce par rapport à l'eau de mer (bleu) et en eaux usées par rapport à l'eau douce (rouge) chez *Neosarmatium meinerti*, *Tubuca urvillei* et *Parasarma guttatum*.

4.5.1.3 Balance oxydative

L'étude menée en milieu contrôlé indique que les crabes réagissent à une exposition aux eaux usées en augmentant leurs défenses antioxydantes, sans augmentation des EROs chez *N. meinerti* contrairement à *P. guttatum* et *T. urvillei*. Le déséquilibre de la balance oxydative peut avoir un impact significatif sur l'homéostasie interne des animaux sauvages et ainsi influencer leur fitness (Beaulieu and Costantini, 2014; Regoli and Giuliani, 2014; Valavanidis et al., 2006). En effet, un stress oxydatif important se caractérise par des dommages sur de nombreux composants cellulaires (lipides, ADN, protéines,...) pouvant déclencher l'apoptose (cf §2.5.4.2) et compromettre ainsi la survie et la reproduction des animaux (Costantini, 2008). Cependant, nous n'avons pas obtenus de résultat prouvant un stress oxydatif à proprement parler, les dommages dus au stress oxydatif ayant été mesuré uniquement chez *N. meinerti* et n'ayant pas montré de différence significative induite par les eaux usées (Figure 61). Toutefois, les 3 espèces montrent une augmentation de leurs défenses antioxydantes, ce qui nécessite un investissement énergétique qui ne pourra pas être attribué à d'autres fonctions telles que la reproduction, la défense immunitaire, etc. et donc également réduire la fitness (Monaghan et al., 2009). Il serait intéressant cependant de regarder à d'autres niveaux (protéines, ADN) les dommages pouvant être induit par les EROs, particulièrement chez *T. urvillei* et *P. guttatum* dont les EROs dans l'hémolymphe augmentent suite à l'exposition aux eaux usées. De nombreux facteurs de stress favorisant la formation d'EROS peuvent être présents dans les eaux usées tels que des résidus pharmaceutiques (Freitas et al., 2016), des métaux lourds (Blewett and Wood, 2015; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2007), l'hypoxie (Li et al., 2016b), le nitrate, l'ammonium (Pinto et al., 2016) et bien d'autres (Lushchak, 2011; Penha-Lopes et al., 2011).

Neosarmatium meinerti est la seule espèce qui ne montre pas de production d'EROs dans son hémolymphe. Cette espèce semble donc avoir des défenses antioxydantes efficaces et/ou un fonctionnement des mitochondries plus efficace (Salin et al., 2015). Par contre, une réponse sexe-spécifique de la balance oxydative face aux eaux usées a été identifiée chez *N. meinerti*. Les études portant sur les deux autres espèces n'ont porté que sur des mâles du fait d'un dimorphisme sexuel important. Cette différence de réponse est particulièrement importante par rapport aux conséquences qu'elle peut avoir sur la population, la santé d'un seul sexe ne pouvant suffire pour avoir une vue exhaustive des effets sur la population. Des différences comportementales entre mâles et femelles chez les crabes de mangrove (Allen and Levinton, 2014), notamment en termes de territorialité et d'agressivité pourraient expliquer les résultats obtenus. Toutefois, l'étude de « caging » n'a pas montré ces différences (voir §5.2). Le stress

dans ces conditions environnementales (dilution de l'effluent, etc.) pourrait ne pas être assez important pour les mettre en évidence. Des différences sexe-spécifique dans la réponse au stress oxydatif ont déjà été démontrées chez le crabe vert *Carcinus maenas* (Pereira et al., 2009) et d'autres invertébrés (Correia et al., 2003; Espinosa and Rivera-Ingraham, 2016; Radhika et al., 1998) mais il y a un manque de données disponibles pour bien évaluer ce type d'effet (Abele et al., 2012a). De plus, de nombreux facteurs biologiques tels que l'âge, le stade de maturité et les saisons influencent la réponse au stress oxydatif (Beaulieu et al., 2013; Correia et al., 2003; Lushchak, 2011; Paital and Chainy, 2012; Pérez et al., 2011; Regoli et al., 2002). L'analyse des résultats doit donc se faire avec précaution avant de pouvoir extrapoler par rapport à la réalité écologique.

Il conviendrait de mesurer également la respiration mitochondriale afin d'avoir un meilleur aperçu des mécanismes respiratoires. C'est en effet au niveau des mitochondries que sont naturellement produits les EROs, mais c'est également ces mitochondries qui vont fournir l'énergie nécessaire pour faire face à un stress. Il est donc normal d'avoir observé des dommages aux lipides (MDA) plus importants au niveau des branchies postérieures, qui sont impliquée dans l'osmorégulation via la présence de nombreuses cellules riches en mitochondries (ionocytes) et métaboliquement très actives (Compere et al., 1989). A l'échelle de la cellule, l'osmorégulation et le stress oxydatif sont donc liés énergétiquement (Figure 62). De plus, la NKA et d'autres ATPases peuvent être régulées par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Kurella et al., 1997; Rohn et al., 1996, 1993). Une expérience récente a confirmé l'influence des EROs (et plus particulièrement le H_2O_2) sur l'activité de la NKA chez le crabe vert *Carcinus maenas* (Rivera-Ingraham et al., en prép.) ce qui démontre l'étroite relation entre osmorégulation et stress oxydatif (Rivera-Ingraham and Lignot, 2017). Mais le H_2O_2 peut potentiellement avoir des conséquences beaucoup plus profondes sur le fonctionnement et les processus d'acclimatation au niveau cellulaire : le peroxyde d'hydrogène a un rôle connu de signalisation intra et intercellulaire. Il possède une longue durée de vie, il est très mobile et peut facilement traverser la membrane cellulaire via les aquaporines (Miller et al., 2010) et ainsi circuler parmi les cellules voisines. Hormis la source intracellulaire de H_2O_2 (provenant des mitochondries), le H_2O_2 peut être produit en dehors des cellules par les hémocytes qui le produisent lors de la phagocytose de bactéries pathogènes (Holmblad and Söderhäll, 1999; Labreuche et al., 2006). Or, les bactéries sont fréquentes et en grande quantité dans les eaux usées (voir paragraphe 6.2). Quel que soit son lieu de production, le peroxyde d'hydrogène est hormétique : à petite dose il va agir comme messenger et avoir un effet au niveau du noyau où il

va activer des facteurs de transcriptions d'antioxydants comme cela a déjà été démontré chez différentes espèces de poissons (Giuliani and Regoli, 2014; Zheng et al., 2010). Mais à plus forte dose, il peut être nocif et provoquer l'apoptose via les caspases (Simon et al., 2000). De plus, l'action des EROs sur le noyau permet une action directe (antérograde) sur les mitochondries pour induire leur biogénèse, comme cela a été démontré chez les plantes (Suzuki et al., 2012). La forte consommation en oxygène pourrait être liée directement à une possible augmentation dans la densité des mitochondries. Un marqueur de la densité en mitochondries tel que la citrate synthase permettrait de confirmer cet hypothèse.

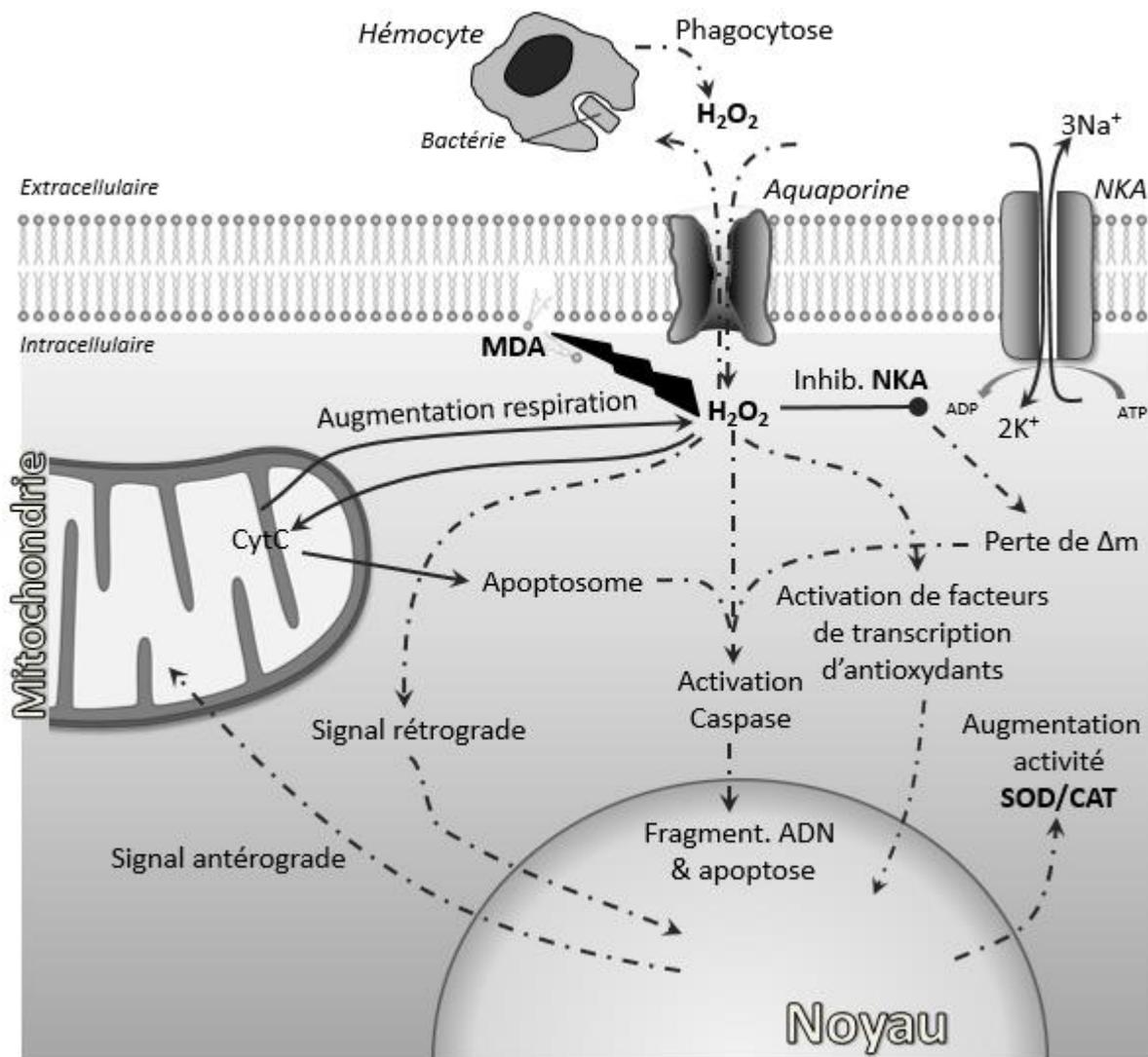


Figure 62: Schéma représentant le lien entre stress oxydatif et osmorégulation : l'osmorégulation est un processus coûteux en ATP, induisant ainsi une importante respiration mitochondriale qui est à l'origine de la production des EROs tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les biomarqueurs mesurés sont représenté en gras. Modifié d'après Rivera-Ingraham et al. (en prép.).

4.5.2 De l'écosystème au laboratoire et vice versa

Si les 3 espèces sont présentes dans la zone de rejet, elles ne sont pas pour autant toutes impactées de la même manière. Ainsi, *P. guttatum* qui ne fait pas de terrier et n'est pas fidèle à un abri unique (Flores et al., 2002), ce qui peut lui permettre de fuir l'écoulement du rejet pour se réfugier dans des zones épargnées (ex : buttes). En effet, le rejet s'écoule sur le sédiment de manière hétérogène entre les buttes formées autour des racines en suivant la topographie du sédiment qui est très hétérogène (obs. pers.). Les individus restent tout de même dans la zone, car ils sont inféodés à une zone d'environ 16 m² (Skov et al., 2002). *N. meinerti* et *T. urvillei* sont quant à eux très fidèles à un unique terrier (Skov et al., 2002) qui une fois rempli d'eaux usées ne laisse pas le choix aux individus : rester à l'abri mais être exposé aux eaux usées ou sortir et prendre des risques.

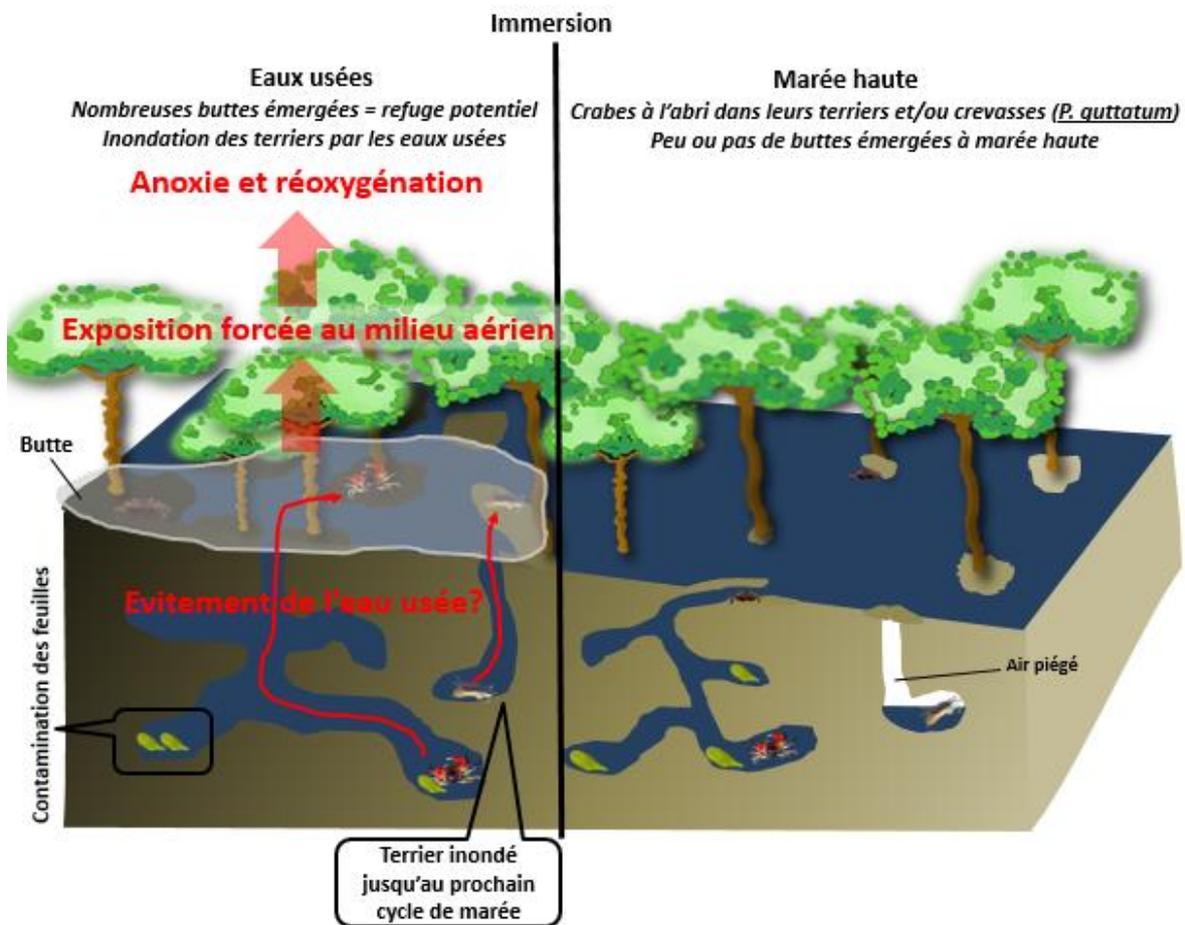


Figure 63 : Schéma conceptuel montrant la différence entre une immersion par une marée haute et par les eaux usées : les terriers seront inondés (les crabs violonistes devraient ne pas avoir le temps de boucher leur terrier, hypothèse à vérifier) mais de nombreuses buttes seront émergées et pourront servir de refuge face aux eaux usées.

Par exemple, les crabes fuyant leur terrier se verraient d'avantage confronter à la forte compétition intra et inter-spécifique qui existe chez les crabes de mangrove pour la reproduction, l'accès à la nourriture et à un territoire (Cannicci et al., 2018; Fratini et al., 2000; Nobbs and Blamires, 2017). De plus, ils seront davantage exposés à la respiration aérienne et aux variations des paramètres abiotiques. En effet, les organismes intertidaux comme les crabes de mangrove sont exposés à de larges variations de paramètres environnementaux telles que la température (Helmuth et al., 2006; Kelly et al., 2012). Par exemple, il est connu qu'ils évitent une température importante en s'abritant dans leur terrier où la température est plus constante (Hogarth, 2012; Munguia et al., 2017). Or, quelques heures dans l'air peuvent modifier la température du corps des animaux vivant dans la zone intertidale jusqu'à 25°C (Hofmann and Somero, 1996), ce qui peut induire des dommages au niveau cellulaire et biochimique via, par exemple, le stress oxydatif (Abele et al., 2002; Pörtner, 2002). *P. guttatum* est plus sensible aux variations de température que *T. urvillei* (Fusi et al., 2015) mais il devrait bénéficier de la fermeture de la canopée induite par les eaux usées (Herteman et al., 2011).

Ainsi, les résultats obtenus en laboratoire ne sont pas forcément représentatifs de la réalité écologique. Des expériences sur le comportement de ces espèces vis-à-vis des eaux usées permettraient d'optimiser les designs expérimentaux utilisés en laboratoire, et ainsi, mieux comprendre le challenge physiologique rencontré par ces différentes espèces. Par exemple, ces analyses permettraient de déterminer le temps d'exposition dans l'eau ou encore le temps d'exposition moyen dans l'air avant éventuellement de retrouver un abri ou un microhabitat non pollué. *Parasesarma guttatum* pourrait ne jamais être exposé plus de quelques minutes aux eaux usées et pourrait donc éviter la formation d'EROs ainsi que l'investissement dans les défenses antioxydantes observées dans nos expériences en laboratoire.

Parasesarma guttatum devrait également bénéficier de la disparition des grands Sesarmidae comme *N. meinerti* et *N. smithii* qui entrent en compétition directe avec lui pour la litière (Fratini et al., 2000). En effet, contrairement à ces derniers qui enfouissent les feuilles dans leurs terriers, *P. guttatum* les mange rapidement à l'endroit où il les trouve et ne les ramène pas à son abri (Dahdouh-Guebas et al., 1999, 1997). La modification de la communauté pourrait ainsi entraîner des conséquences importantes sur le réseau trophique et donc au niveau de l'écosystème. La capacité à manger des feuilles et des propagules dépend de la capacité à rester longtemps émergé. Or ce facteur est important dans la régulation du renouvellement des palétuviers (Bosire et al., 2004). Les Sesarmidae se nourrissent non seulement de feuilles mais également de la matière organique du sédiment (Bouillon et al., 2004) et pourraient donc bénéficier de

l'apport en MO du rejet contrairement aux Ocypodidae dont la signature isotopique est reliée au microphytobenthos (Bouillon et al., 2004). Toutefois, le microphytobenthos pourrait profiter aussi de l'apport en nutriments des eaux usées et donc bénéficier indirectement aux Ocypodidae. Néanmoins, celui-ci est probablement impacté par la fermeture de la canopée qui réduit la lumière disponible dans la zone impactée par rapport à la zone témoin (Capdeville et al., 2018; Herteman, 2010). Bouchez et al. (2013) n'ont toutefois pas observé de changement dans la biomasse du biofilm phototrophe, mais ont tout de même démontré un changement dans sa communauté avec une part plus importante de diatomées et d'algues vertes. De plus, ils ont également montré que la zone impactée était fortement enrichie en bactéries, elles aussi avec une diversité différente. Ces micro-organismes font également partie du régime alimentaire des Ocypodidae (Cannicci et al., 2008) et pourraient contribuer à expliquer la disparition des crabes violonistes. Dès lors, il conviendrait d'étudier plus en détail les organes liés à l'alimentation, tel que l'hépatopancréas.

Si *P. guttatum* entre en dépression métabolique engendrant ainsi une hypoxie fonctionnelle, déjà discutée ci-dessus, *N. meinerti* et *T. urvillei* sont très probablement confrontés à une hypoxie environnementale suite à l'infiltration d'eaux usées (pauvre en O₂) dans leurs terriers. De plus, la faible salinité des eaux usées peut accentuer les effets de l'hypoxie. En effet, Legeay et Massabuau (2000) ont montré que la tolérance à l'hypoxie du crabe vert *Carcinus maenas* était fortement réduite lors d'un stress osmotique.

La capacité de *P. guttatum* à tolérer les eaux usées *in situ* et à remplacer les autres espèces en termes de densité mais au prix d'une perte de biodiversité (Capdeville et al., 2018) risque tout de même d'avoir des répercussions sur l'écosystème et principalement au niveau de son fonctionnement. En effet, cette espèce n'est pas bioturbatrice contrairement aux autres espèces qui disparaissent et il y a une perte de la diversité fonctionnelle. Certains rôles remplis par des organismes ne le seront plus. C'est d'autant plus important que les eaux usées s'infiltrent dans le sédiment via les terriers des crabes. Sans ces derniers, les eaux usées se répandraient davantage, augmentant la zone d'impact voire, dans le pire des cas, seront déversées dans le lagon sans avoir pu être bio-épurées par les palétuviers. Ce dernier scénario serait catastrophique pour les communautés coralliennes adjacentes qui sont très sensibles à l'eutrophisation et aux eaux usées (Pastorok and Bilyard, 1985; Szmant, 2002).

Enfin, il faut rappeler que pour les 3 expériences menées dans cette étude, les eaux usées provenant de la station de Malamani ont été collectées en saison sèche avec une composition qui varie forcément d'une expérience à l'autre. Cependant, nos résultats ont permis de dégager

des tendances claires : une atteinte des mécanismes osmorégulateurs (NKA), des défenses antioxydantes (SOD et/ou CAT) et du métabolisme énergétique (consommation d'O₂).

**Chapitre 5: Effets des rejets des eaux usées
in situ : « caging » et suivi environnemental
par cartographie**

5.1 Introduction

Après avoir évalué l'impact des eaux usées en laboratoire sur différents marqueurs physiologiques, nous avons pu les étudier *in situ*. Ainsi, 20 *N. meinerti* ont été installés pour moitié dans la zone de rejet, et pour l'autre moitié dans une zone légèrement en amont et non impactée par ces rejets. Ils furent ainsi maintenus pendant 3 semaines dans des terriers artificiels. Aucune étude n'avait jusqu'à présent pu étudier directement l'effet d'eaux usées domestiques dans une zone de rejet naturelle. Tout réside dans l'originalité du site développé par le SIEAM avec l'expertise d'Ecolab à l'initiative de François Fromard. Sur ce site, les eaux usées sont déversées selon un horaire et un calendrier précis sur des parcelles définies. Ainsi, une heure avant la marée basse, et ce, une marée basse sur deux (donc environ une fois par 24h), 10m³ d'eaux usées domestiques pré-traitées sont dispersées sur une parcelle de 675m² via un réseau de tuyaux perforés. Ainsi, ces eaux vont pouvoir s'infiltrer dans le sédiment (principalement via le réseau de terriers de crabe) et être traitées par les palétuviers et les micro-organismes (Bouchez et al., 2013; Capdeville et al., 2018; Herteman et al., 2011).

De plus, la densité de terriers de crabe a été mesurée et cartographiée autour du rejet dans les zones d'écoulement, et corrélée à la salinité. Il en ressort que le rejet induit une diminution de la salinité autour de la zone de rejet, dont la dispersion dans le site et en aval peut ainsi être observée. Les terriers de crabe sont moins nombreux dans la zone de dispersion du rejet, et sont corrélés (Figure 64) avec la diminution de salinité ($r=0,58$, $df=30$, $p<0,001$).

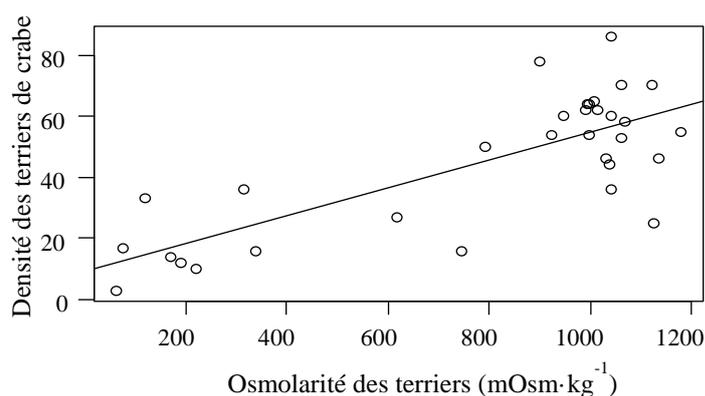


Figure 64 : Corrélation entre l'osmolalité (salinité) et le nombre de terriers de crabe autour de la zone de rejet. Les points dont l'osmolalité est inférieure à celle de l'eau de mer (≈ 950 mOsm·kg⁻¹) sont sous l'influence du rejet.

Les crabes exposés pendant 3 semaines dans les terriers artificiels ont une plus faible capacité osmorégulatrice bien que les activités de la pompe à sodium dans les branchies antérieures et postérieures ne soient pas affectées. Il n'y a pas de dégâts aux lipides ni dans les branchies

antérieures ni dans les branchies postérieures et l'activité de la catalase reste inchangée. Toutefois, l'activité de la SOD est réduite dans les deux types de branchies chez les crabes exposés aux eaux usées, révélant une modification de la balance oxydative. Tout comme en laboratoire, l'activité de la pompe à sodium et les dégâts aux lipides ainsi que l'activité de la catalase sont plus importants dans les branchies postérieures que dans les branchies antérieures ; aussi bien dans la zone témoin que dans la zone impactée.

Ces résultats montrent que les crabes élaborent moins de terriers dans les zones d'écoulement des eaux usées révélant soit un impact sur les populations soit sur le comportement des crabes. Les eaux usées perturbent la fonction osmorégulatrice ainsi que la balance redox de *N. meinerti*, ce qui confirme les effets déjà observés en laboratoire. Ainsi, tout rejet d'eaux usées dans la mangrove devrait être accompagné d'un suivi minutieux des populations de crabe du fait de leur importance pour l'écosystème mais aussi dans l'efficacité du traitement.

5.2 Wastewater bioremediation by mangrove ecosystem impacts crab ecophysiology: *in situ* experiment

Dimitri Theuerkauff^{1,2*}, Georgina A. Rivera-Ingraham¹, Sophia Lambert², Yann Mercky^{1,2}, Mathilde Lejeune^{1,2}, Elliott Sucré^{1,2} and Jehan-Hervé Lignot¹

¹) UMR MARBEC (University of Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD), Montpellier, France

²) Centre Universitaire de Mayotte, Route Nationale 3, BP 53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

*) Address for correspondence: dimitri.theuerkauff@umontpellier.fr

Abstract

Mangroves are tidal wetlands often under strong anthropogenic pressures despite the numerous ecosystem services they provide. Pollution from urban runoffs is one of these threats, but nevertheless mangrove trees are used as a bioremediation tool for wastewater (WW) treatment. However, this practice can impact mangrove crabs which are key engineer species of the ecosystem. Using an experimental area with controlled WW releases, this study aimed to determine from an ecological and ecotoxicological perspective, the effects of WW on the mangrove crab *Neosarmatium meinerti*. Burrow density and salinity levels (used as a proxy of WW dispersion) were recorded, mapped and a 3-week caging experiment was performed. Hemolymph osmolality, gill Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) activity and gill redox balance were assessed in anterior and posterior gills of *N. meinerti*. Burrow density decreased according to salinity decreases around the discharged area. Crabs from the impacted area had a lower osmoregulatory capacity without changes in gill NKA activity and the decrease of the superoxide dismutase activity indicates changes in redox metabolism. However, both catalase activity and oxidative damage remained unchanged in both areas but were higher in posterior gills. These results indicate that WW release may induce osmoregulatory and redox imbalances, potentially explaining the decrease in crab density. Based on these results we conclude that WW release should be carefully monitored as crabs are key players involved in the bioremediation process.

Keywords: Mangrove, Bioturbation, Wastewater, Ecophysiology, Oxidative stress, Osmoregulation

1 Introduction

Mangroves are critically threatened by human activities worldwide (Duke et al., 2007; Polidoro et al., 2010) although their ecological and socioeconomic importance are now well documented (Alongi, 2008; Barbier, 2015; Lee et al., 2014; Nagelkerken et al., 2008; Vo et al., 2012; Walters et al., 2008). They cover 137,760 km² in 118 tropical and subtropical countries and territories (Giri et al., 2011) and are characterized by their unique coastal forest between land and sea.

Among the different possible threats, mangroves receive nutrients and pollutants from urban runoffs (Fusi et al., 2016a; Lesirma, 2016; MacDonnell et al., 2017). However, mangrove trees are capable of absorbing excess in nutrient load (Reef et al., 2010) and are thus used in many tropical countries as a bioremediation tool for wastewater treatment (Jitthaisong et al., 2012; Lee et al., 2014; Li et al., 2011; Molnar et al., 2013; Turcios and Papenbrock, 2014; Wong et al., 1997; Yang et al., 2008). Whether natural or constructed mangrove wetlands (mesocosm), they are used for treating WW from aquaculture, sewage or others sources (Leung et al., 2016; Ouyang and Guo, 2016; Wu et al., 2008a). Moreover, recent studies in China showed that natural mangroves are the optimal paradigm under three scenarios of municipal WW treatment (Ouyang and Guo, 2018). However, to eliminate excess nutrient and organic load, mangrove plants may bioaccumulate metals (Analuddin et al., 2017; Birch et al., 2015; Nguyen et al., 2017; Richter et al., 2016), and even immobilize some wastewater-borne pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons and polybrominated diphenyl ethers in the shape of iron plaques formed on their roots (Farzana et al., 2016; Pi et al., 2017). They can also even mitigate different antibiotics (Li et al., 2016; Liu et al., 2016). While most of these studies focus on plant or microbial communities, previous studies looking at the impact of WW on mangrove macrofauna showed contradictory effects (Amaral et al., 2009b; Bartolini et al., 2009; Cannicci et al., 2009; Capdeville et al., 2018; Fusi et al., 2016a; Penha-Lopes et al., 2009b; Yu et al., 1997). Thus, further focusing on the specific physiological consequences for macrofauna are needed.

Among the macrofauna, burrowing mangrove crabs such as *Neosarmatium meinerti* (Sesarmidae, de Man, 1887) are key engineer species playing a key role in the mangrove ecosystem: their bioturbation and organic matter degradation activities are crucial in element transfer within the matter cycle and allow the maintenance of sediment biochemical heterogeneity (Emmerson and McGwynne, 1992; Kristensen, 2008; Lee, 1998; Penha-Lopes et al., 2009a; Smith III et al., 1991). They are also involved in the bioremediation process since their burrows allow WW to enter the sediment and to be absorbed by mangrove trees. Crab

burrows also increase the air-sediment layer up to 400 % and thus, impact microbial and geochemical processes (Kristensen and Kostka, 2013).

It is therefore crucial, in the context of the usage of mangroves for biofiltering, to determine if these crabs are impacted by WW discharge. In the long term, it could induce profound and global modifications of the ecological functioning of the mangrove ecosystem. Regular wastewater discharges may decrease crab abundance as shown for juvenile of blue crabs (*Portunus pelagicus*) along a pollution gradient from an outfall of secondary treated effluent (Wear and Tanner, 2007). Moreover, previous studies showed that WW may also impact crab community structures (Capdeville et al., 2018) or even their bioturbation activities (Bartolini et al., 2011). Previous results obtained by our group under laboratory conditions showed that WW exposure induces a burst of oxygen consumption, osmotic and redox imbalances (Theuerkauff et al., 2018a). This study aims to compare laboratory results with field experimentation using the same WW discharge. To do this, we here merge the use of ecological markers (e.g. crab burrow density) with physiological indicators of cell homeostasis (e.g. osmoregulation and energy-redox parameters) carried out in encaged crabs to adequately evaluate the efficiency and challenges in the usage of mangroves as biofilters.

2 Materials and methods

2.1 Study area

To assess the impact of WW on mangrove crabs, two areas were selected in the Malamani mangrove (Boueni's bay, Mayotte island, 12°55'1"S, 45°9'23") located in the Comoros Archipelago (Fig. 1A, B, C). This experimental site is used since 2008 to evaluate the capacities of the mangrove ecosystem for natural WW treatment (Bouchez et al., 2013; Herteman et al., 2011). Briefly, WW is collected from the village of Malamani (400 population equivalent), stored and decanted in a pre-treatment (Imhoff) tank. About 10 m³ of this pretreated WW is daily discharged 1h before low tide every 24h through pierced pipes (Fig. 1E) on three 45m x 15m plots. In this study, only the plot dominated by *Cerriops tagal* and oriented perpendicular to the main coastline was considered (Fig. 1B,C). This area is designated as the "impacted area". A second area is used as a control and is located in the same mangrove belt, also dominated by *Cerriops tagal*, but is not subjected to WW discharge (Fig. 1 C). The chemical composition of the pretreated WW is reported in Table 1 while more *in situ* physicochemical parameters were reported by Capdeville (2018).

Table 1: Chemical characterization of SW, brackish water (from rivulet) and WW (partly modified from Herteman, 2010 and published in Theuerkauff et al., 2018a). N.A. = data not available. Seawater was collected at low tide in crab burrows from a pristine area and in the rivulet (Fig 1B). Further environmental data is available in Capdeville (2018).

| | SW | | Rivulet | | WW | |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Min. value | Max. value | Min. value | Max. value | Min. value | Max. value |
| NH ₄ -N(μM) | 6 | 18 | 8 | 49 | 325 | 3800 |
| PO ₄ (μM) | 0.05 | 0.3 | 4 | 40 | 50 | 180 |
| Salinity (ppt) | 35.6 | 40.4 | 8.9 | 20.8 | 0.3 | 1.0 |
| pH | 6.96 | 7.40 | na | na | 6.0 | 7.5 |

2.2 Salinity and crab burrow mapping

A field survey was conducted in March 2015 to collect data on WW dispersion and crab burrow density in Malamani mangrove. Four 80 m-long transects covering the impacted area as well as the control zone were established parallel to the shore. For each transect, 8 plots (located approximately 10m from each other) were monitored. These plots were in all cases established on flat bottoms only, since it is where WW flows and infiltrates the sediment through the crab burrows. The geographical coordinates of these plots were recorded using a GPS system (Garmin GPSMAR®78S). Salinity variation around the WW discharge was used as a proxy of WW dispersion. Salinity was measured from 1.5 ml samples collected from the interstitial water in burrows. The osmotic pressure (OP) of these samples was measured in duplicate by freezing point depression osmometry using an Advanced™ Micro-Osmometer, model 3300 (Advanced Instruments, Inc.) using 20 μl per sample. The number of crab burrows in a 1 m² was also counted at each plot and used as an estimator of crab density (Mouton and Felder, 1996). Data was analysed using a cubic spline interpolation of H. Akima for irregular data (Akima, 1978). To perform the interpolation on water salinity and count of crab burrows, the package “akima” from R software was used. The geographical projection used for Mayotte Island is UTM 38S of the geographical system RGM04. The results of the interpolation should only be used for comparative purpose and must be considered as approximations.

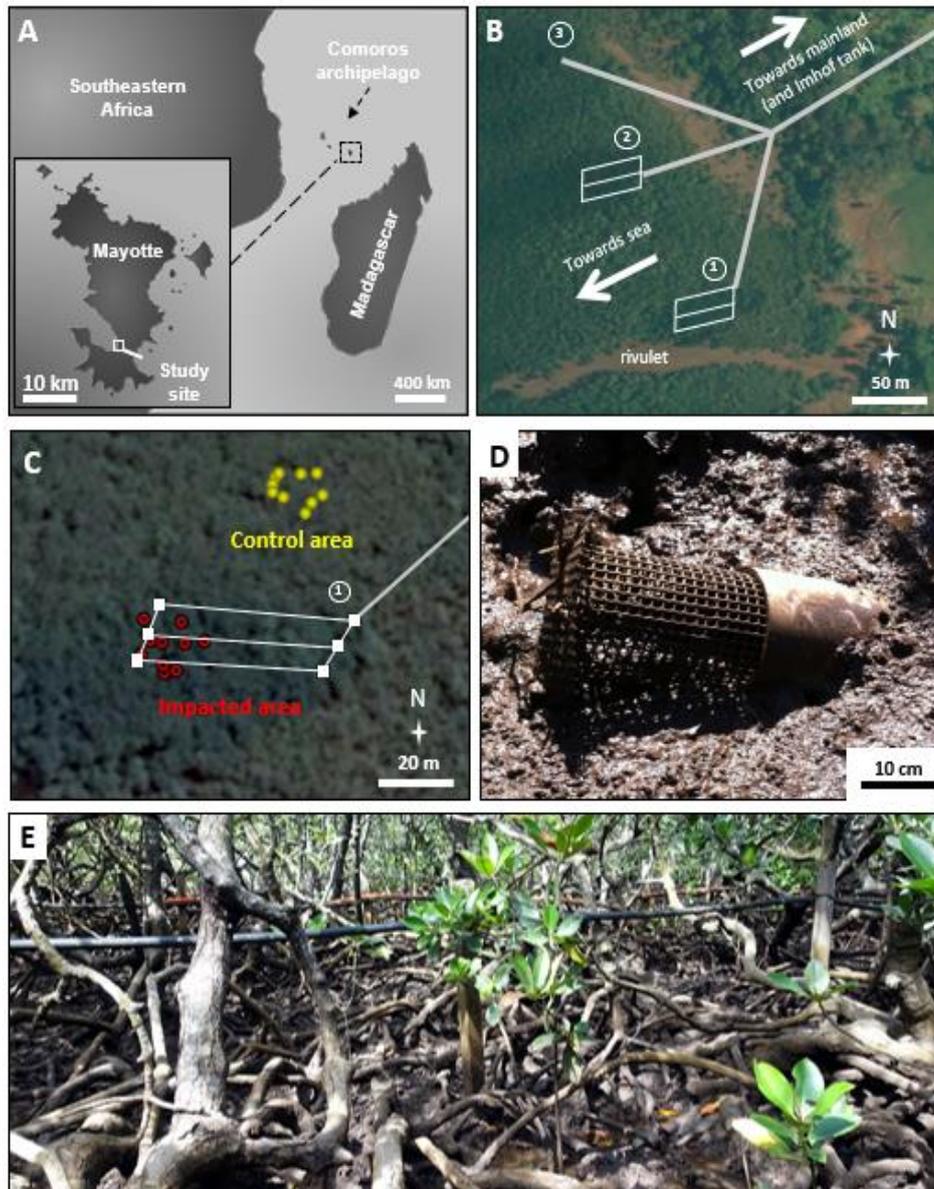


Figure 1: Location of the Comoros archipelago and the study site in Mayotte (A); aerial view of the experimental setup in the mangrove of Malamani (B) and of the control and impacted areas (C); artificial burrow (D); pierced pipes discharging WW in the impacted area (E). Crabs as well as water samples used for chemical analyses were collected within the *Avicenia marina* and *Cerriops tagal* belts in non-impacted sites. In B, the experimental parcels 1 and 2 corresponds to the *Cerriops tagal* and *Avicenia marina* belts, respectively. 3 corresponds to the overflow discharging site. Only the parcel 1 was considered in this study. In C, artificial burrows (n=20) are indicated by red (impacted, n=10) and yellow (control, n=10) circles. In B and C, grey lines represent the WW transporting pipes and the white lines represent the WW discharging drains.

2.3 Animal collection, caging and sampling

Twenty adult of *Neosarmatium meinerti* (in intermolt stage C3, as confirmed through epipodite examination) were collected in September 2015 from an undisturbed area of the Malamani mangrove at low tide. According to recent studies, specimens identified as *N. meinerti* found in Mayotte could in fact be *Neosarmatium africanum* (Bouchard et al., 2013; Ragionieri et al., 2012, 2009), but are attributed to *N. meinerti* until confirmation is obtained by DNA sequencing. Immediately after collection, an equal number of crabs were individually introduced in artificial burrows (Fig. 1D) in the impacted and control area (Fig. 1C). Each artificial burrow consisted of a closed grid cylinder of 6 cm wide and 50 cm long inserted into a perforated PVC pipe ensuring adequate water flow. These artificial burrows were partially buried with an angle of 45° (Fig. 1D). After 3 weeks, in October 2015, the crab and some water from each burrow were collected and brought to the field laboratory located about 350 m from the experimental site. For each crab, a hemolymph sample was obtained using a 0.5-ml syringe by inserting the needle between the cephalothorax and the first pereopod. This sample was directly used for OP determination using 20 µl per sample in duplicate as described above. Crabs were then weighted and anesthetized on ice for gill sampling. Gill pairs were divided in 2 groups according to their osmoregulatory function (Copeland and Fitzjarrell, 1968; Neufeld et al., 1980; Theuerkauff et al., 2018b). Anterior pairs 1 to 4 were considered as respiratory gills, while posterior pairs 5 to 8 were considered as both respiratory and osmoregulatory gills. The anterior and posterior gills were flash frozen in liquid nitrogen, stored separately into a container filled with liquid nitrogen (Voyageur 5, Air liquide). After sampling completion, frozen samples were transported to the University Center of Mayotte and then preserved at -80 °C for further analyses (see details in sections 2.4 and 2.5). Crab molting stages were checked again after gill dissection to avoid handling-associated stress and only animals in intermolt stage (C3) were considered.

2.4 Assessments of antioxidant defenses and oxidative damage in gills

For each crab, antioxidant defenses were quantified as the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and measured spectrophotometrically in anterior and posterior gills (right-sided gills 3 and 5). All frozen samples were diluted to 1:40 and 1:10 (w:v) for SOD and CAT measurements, respectively, in a 50 mmol l⁻¹ KPi buffer with 120 mmol l⁻¹ KCl (pH=7.0). Tissue homogenization was achieved using 3 steel balls (Retsch, n°. FR0120) in a Mixer Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Germany; 30s at 30 beats s⁻¹). SOD activity was determined in supernatants after centrifugation (3min, 13000 rpm, 4°C) using the protocol of McCord and

Fridovich (1969) modified by Livingstone et al. (1992). CAT activity was measured in supernatants following the decomposition of H₂O₂ in a 50 mmol l⁻¹ KPi buffer according to the assay developed by Aebi (1984). All measurements were carried out at least in triplicate using a microplate reader (Tecan Infinite M200, TECAN, Männendorf, Switzerland). Samples were preserved on ice at all times and results were expressed per mg of proteins quantified in triplicates according to Bradford (1976) with BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) as standard. Oxidative damage was estimated as the concentration of malondialdehyde (MDA), a product resulting from lipid peroxidation, in right-sided anterior and posterior gills (gills 4 and 6, respectively). MDA was quantified through measurements of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using the protocol originally described by Uchiyama and Mihara (1978) and further modified by Abele et al. (2002).

2.5 Assessment of Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) activity

NKA activity was determined on right-sided anterior and posterior gills (2 and 7, respectively) by homogenizing tissues separately as described above in a buffer composed of 250 mM sucrose, 5 mM MgCl₂ (pH= 7.4) in a 1:6 (w:v) ratio. After centrifugation (3min, 13000 rpm, 4°C), protein concentration in supernatants was determined as described above, and all samples were diluted to achieve equal protein concentrations. The specific NKA ouabain-sensitive activity in these supernatants, was measured using a protocol adapted from Flik et al. (1983) but with 3 mM ATP, 5 mM MgCl₂ and ouabain adjusted to 2.8 mM.

2.6 Statistics

All statistical analyses were performed in R version 3.3.2 (R Core Team, 2015) with RStudio Version 0.99.891 (RStudio, Inc). The Shapiro-Wilk test was used to test normality and the Bartlett test was used to test the homogeneity of variances. If data did not meet the assumptions of normality and homogeneity of variance, they were log transformed.

A two-way ANOVA was performed on crab body weight (sex and treatment), oxidative damage, antioxidant defenses and NKA activities according to gill position and treatment. All factors were considered as orthogonal and fixed. All ANOVA tests were followed by a Tukey's HSD *post hoc* comparison test and significance level was $p < 0.05$. Hemolymph osmotic pressures are reported on the osmotic curve previously published (Theuerkauff et al., 2018b) and residuals are compared by a Student t-test.

3 Results

3.1 Two-dimensional mapping of sediment surface salinity and crab burrow density

Salinity values of the crab burrow residual water ranged from $64 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$ to $1360 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$. Due to the effect of the effluent, salinity values decreased in the impacted area but also outside the impacted area towards the sea (Fig. 2), indicating that WW expands from the discharge area. The spatial analysis for the crab burrow density demonstrates a similar pattern since the lowest density was found at the center of the impacted area (Fig. 3). This crab density distribution is explained at 62.01 % (Adjusted R^2 performed on non-interpolated data; $F_{1,30} = 51.59$; $p = 5.419 \times 10^{-8}$) by the OP variation of the interstitial water.

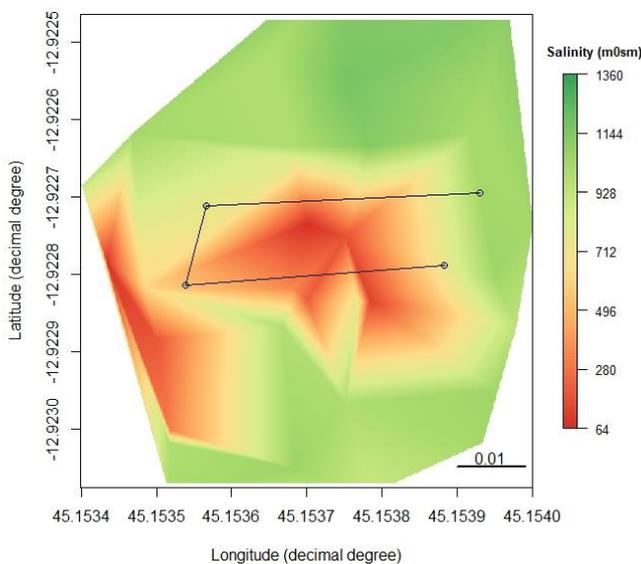


Figure 2: Interpolation of salinity around the discharged area (black lines).

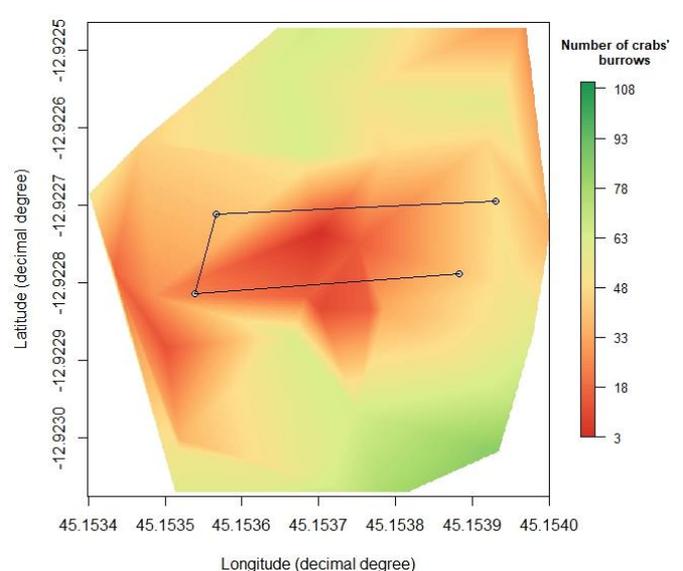


Figure 3: Interpolation of crab burrows density around the discharged area (black lines).

3.2 Crab size

Crab body weight was significantly different between males and females ($47.4 \text{ g} \pm 8.9 \text{ g}$ and $31.1 \text{ g} \pm 2.6 \text{ g}$, respectively) but not between treatments (two-way ANOVA; df error = 16; sex $F = 34.2$; df = 1; $p < 0.001$; treatment $F = 1.3$; df = 1; interaction: $F = 2.9$; df = 1). Except for weight, no sex-related differences were recorded and thus, only pooled results are shown. No mortality was recorded throughout the experiment.

Table 2: Results for the two-way ANOVAs on NKA activity (A), SOD activity (B), CAT activity (C) and TBARS concentration (D). Factors, df (degrees of freedom), MS (variance) and value of F ratio are shown. Statistically significant effects are indicated by asterisks: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

| Factors | A NKA activity | | | B SOD activity | | | C CAT activity | | | D TBARS | | |
|------------------|----------------|---------|-------------------|----------------|--------|-------------------|----------------|---------|-------------------|---------|--------|-------------------|
| | df | MS | F | df | MS | F | df | MS | F | df | MS | F |
| Gill | 1 | 25.3037 | 40.2015*** | 1 | 0.8671 | 3.4778 | 1 | 1601.05 | 27.5590*** | 1 | 119780 | 27.6657*** |
| Treatment | 1 | 0.7165 | 1.1384 | 1 | 6.1532 | 24.6805*** | 1 | 54.82 | 0.9436 | 1 | 7133 | 1.6475 |
| Gill x Treatment | 1 | 0.0359 | 0.0570 | 1 | 0.0187 | 0.0749 | 1 | 28.49 | 0.4904 | 1 | 121 | 0.0280 |
| Error | 36 | 0.6294 | | 36 | 0.2493 | | 33 | 58.10 | | 27 | 4330 | |

3.3 Osmotic pressure and NKA activity

Hemolymph OP of crabs collected from the impacted area was significantly lower compared to the OP collected from crabs of the control area (Fig. 4A, Student t-test, $p < 0.01$). OP of the water collected from the artificial burrows was also lower in the impacted area (Student t-test, $p < 0.01$). However, when considering the residuals (Fig.4 B) between hemolymph OP observed on the field and hemolymph OP (predicted at the same salinity using the osmotic curve published by Theuerkauff et al., 2018b), a significant decrease is observed for crabs collected from the impacted area (one-sided Student t-test, $p < 0.01$). However, differences were not significant for those crabs caged in the control area (2-sided Student t-test, $p = 0.94$). Gill NKA activity (Fig. 4C) showed no significant differences between crabs of the two areas but NKA activity was 2.8 higher in posterior gills compared to anterior gills (two-way ANOVA, table 2A).

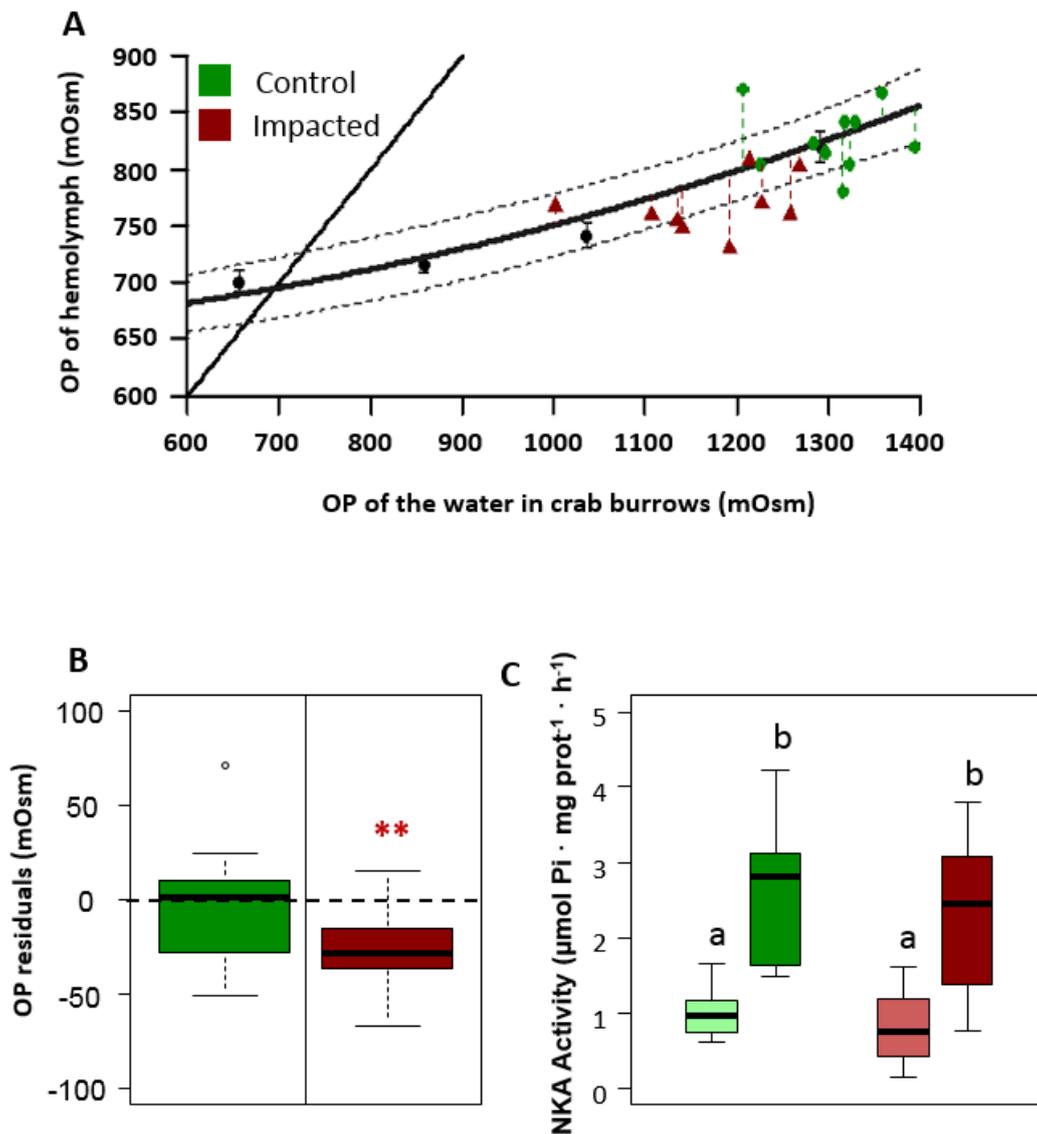


Figure 4: Hemolymph osmotic pressure according to water (from artificial burrow) osmotic pressure (A); OP residuals (B) and Na^+/K^+ -ATPase activity in anterior and posterior (light and dark boxes respectively) gills (C). Dotted lines correspond to 95 % confidence interval of the osmotic curve of *N. meinerti* (see Theuerkauff et al., 2018b). Different letters represent statistically significant differences at $p < 0.05$ from two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test. Boxplots show medians (central crossbars), 25th and 75th percentiles (boxes) and whiskers which extent to the most extreme data point which is no more than 1.5 times the interquartile, data point outside this range are represented by an open circle.

3.4 Oxidative stress

SOD activity (Fig. 5A) did not differ between anterior and posterior gills (two-way ANOVA, table 2B) unlike CAT activity (Fig. 5B, two-way ANOVA, table 2C). But, for both gill types, SOD activity was significantly lower in crabs collected from the impacted area compared to crabs from the control area. Branchial MDA concentration (Fig. 5C) was the same for impacted

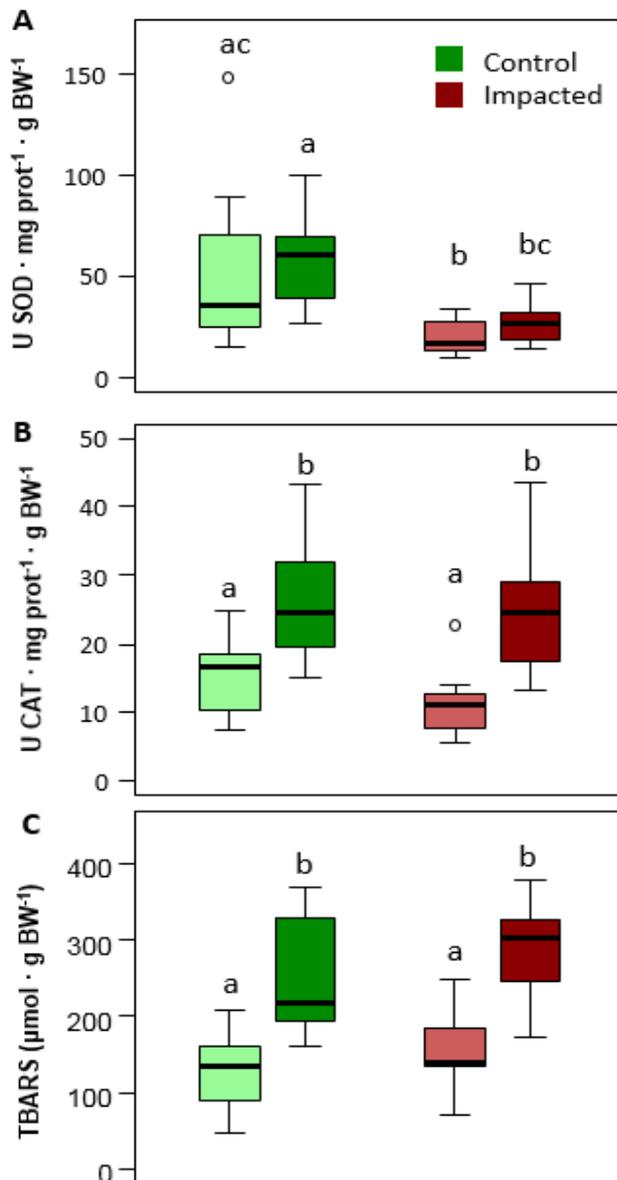


Figure 5: Redox parameters in anterior and posterior (light and dark boxes, respectively) gills of *N. meinerti*: SOD activity (A); CAT activity (B) and oxidative damage (C) measured by TBARS concentration. Different letters represent statistically significant differences at $p < 0.05$ according to a two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test. Boxplots show medians (central crossbars), 25th and 75th percentiles (boxes) and whiskers which extend to the most extreme data point which is no more than 1.5 times the interquartile, data point outside this range are represented by an open circle.

and control crabs but differed according to gill type (two-way ANOVA, table 2D). For both impacted and control animals, the MDA content of posterior gills was 1.9 times higher compared to the anterior gills (two-way ANOVA, table 2D).

4 Discussion

To our knowledge, this study corresponds to the first *in situ* ecotoxicological assessment of the effects of regular and controlled urban WW discharges on crab physiology in a natural mangrove. This new approach using a caging experimental protocol in a natural mangrove forest is complementary to previous studies that focused on artificial mesocosms (Amaral et al., 2009b; Bartolini et al., 2009; Penha-Lopes et al., 2012, 2009a) or to *in situ* studies using

sampled crabs in polluted mangroves (Amaral et al., 2009a; Penha-Lopes et al., 2009b). As already discussed by Capdeville (2018), the response of the crab community and the individual physiological response may be linked to WW discharge but also to the induced environmental modifications. Indeed, different feedback effects are possible since WW discharges induce major changes in the mangrove plant (Herteman et al., 2011) and microbial communities (Bouchez et al., 2013) which are the food source for most of the mangrove crab species.

4.1 Decrease of crab burrow density as a consequence of WW release

As already demonstrated, eutrophication occurs in the impacted area (Bouchez et al., 2013; Capdeville et al., 2018; Herteman et al., 2011). However, this increase in nutrient concentration is highly variable spatially and is mainly due to the unequal dispersion of the WW in the impacted area (different microrelief conditions). WW flows on the soil according to surface roughness and infiltrates the sediment through the crab burrows. Therefore, flat bottoms are highly exposed to wastewater runoffs, while mounds surrounding mangrove trees are likely to be preserved from direct exposure to the effluent water. Consequently, in this study visual countings only concentrated to the flat bottom areas. This methodological choice may explain why a clear decrease in crab density was observed in the impacted area. This differs from previous results provided by Capdeville (2018). In their study, they did not record differences in crab abundance between impacted and control areas in 2012 and 2014 but crab burrows were counted from 1 m² areas containing 50 % of flat bottoms and 50 % tree mounds (Capdeville, pers. com.). Even if crabs could take refuge on the tree mounds, the decrease in crab burrow density reported from flat bottoms should limit WW infiltration and alter the bioremediation processes as well as their engineering role. This decrease in burrow density strongly correlates with the salinity decrease and is consistent with previous observations (Herteman, 2010) showing WW dispersion around the impacted area. Our results contrast with those obtained in other similar mangrove forests in Kenya and Mozambique by Cannicci et al. (2009) and Bartolini et al. (2011). In these studies an increase in fiddler crab biomass was observed in a peri-urban mangrove receiving WW. However, these authors also found a negative effect of the effluent on ecosystem functionality marked by a decrease in crab bioturbation activities which is a cryptic ecological degradation according to Dahdouh-Guebas et al. (2005a). Nevertheless, it is difficult to compare these different studies since WW composition is highly variable both in time and space (local dispersion and WW origin).

4.2 Osmoregulatory disruption

Caged *N. meinerti* in the impacted area experienced a decreased osmoregulatory capacity even if gill NKA activities were not modified. This has already been reported using similar crabs maintained in laboratory conditions and exposed for 5h to the same WW effluent (Theuerkauff et al., 2018a). This decrease in osmoregulatory capacity is representative of the animal physiological condition (Lignot et al., 2000) and could be due histological damage in the gill epithelia (Theuerkauff et al., 2018a). Such morphological damages have already been described when considering the toxic effect of ammonia (Leone et al., 2017) which can reach high levels in the WW discharged in the area. Given that NKA pumps are also involved in the excretion of ammonia-N, as already discussed in Theuerkauff et al. (2018a), this pattern may reveal a trade-off between osmoregulation and ammonia excretion since NH_4^+ can substitute and compete with K^+ in NKA and other K^+ channels (Weihrauch and Donnell, 2017).

4.3 Oxidative stress modulation

As previously observed in laboratory conditions, posterior gills maintain higher CAT activities and MDA levels compared to anterior gills (Theuerkauff et al., 2018a). This pattern also occurs in *C. aestuarii* (Rivera-Ingraham et al., 2016a) and is probably linked to the osmoregulatory function of these gills (Rivera-Ingraham and Lignot, 2017). Osmoregulation is an energy-demanding process as ATPase pumps are key players for active ion transport. Therefore, in decapod crabs, posterior gills exhibit numerous mitochondria and a high abundance and activity of NKA (Copeland and Fitzjarrell, 1968; Lignot and Charmantier, 2015; Pequeux, 1995). This is also the case for *N. meinerti* (Theuerkauff et al., 2018b; this work). These pumps are located in specialized ionocytes (aka mitochondria-rich cells), and mitochondria are considered as the major ROS producers in aquatic animals (Abele et al., 2007). This may explain the higher MDA levels recorded in the posterior gills. Also, compared to anterior gills, their high CAT activities may be an adaptation to maintain redox homeostasis in these gills (Rivera-Ingraham et al., 2016a). Long-term exposure under field conditions did not induce oxidative damage in either anterior or posterior gills but a marked decrease in SOD activity is observed in both tissues. This redox unbalance may be explained by a wide variety of different stressor and/or molecules contained in WW (see reviews by (Abele et al., 2012b; Lushchak, 2011). For example, such decrease has already been reported after exposure to heavy metals (Jasinska et al., 2015; Ling et al., 2011) or even infections (Neves et al., 2000; Rameshthangam and Ramasamy, 2006). Moreover, such changes make work in synergy with environmental factors such as temperature,

as observed for the Cape River crab after exposure to silver nanoparticles AgNP (Walters et al., 2016) or levels of oxygen (Li et al., 2016b; Oliveira et al., 2005).

4.4 Oxidative stress and gender

Gender-related variability in the oxidative stress response has already been reported in the shore crab *Carcinus maenas* (Pereira et al., 2009) and other invertebrates (Correia et al., 2003; Espinosa and Rivera-Ingraham, 2016; Radhika et al., 1998) even if most papers on aquatic organisms lack information about gender (Abele et al., 2012a). Previous laboratory conditions reported gender differences in response to WW exposure (Theuerkauff et al., 2018a) which could potentially lead to sex-dependent tolerance to a pathological environment (Fanjul-Moles and Gonsebatt, 2012). However, these differences were not reported in this field study probably because, waters in the field are temporally and spatially diluted. Nevertheless, these gender-related differences should be taken into account when considering other species or stress intensity.

5 Conclusion

In situ experiments are crucial and complementary to laboratory studies. Also, chronic exposure to multiple and variable stressors under dynamic conditions already revealed variable effects according to environmental fluctuating factors such as salinity, temperature or pH (Barbieri and Doi, 2011; Romano and Zeng, 2013). Since WW composition is highly variable, potential additive, synergic or antagonist responses to these stressors may also vary. Therefore, WW bioremediation in natural mangroves should therefore require specific field impact studies and case-by-case follow-ups by the competent authorities. What appears already evident is that crab abundance can significantly be decreased in WW-impacted areas. If the observed effects on osmoregulation and oxidative stress could explain the decrease in crab burrow density, they cannot contribute, however, to answer whether crabs escape and/or avoid the discharged area (flat bottoms) or if they die in these areas and are unable to recruit. Behavioral studies may provide a significant insight. Moreover, WW could also induce strong anoxia in crab burrows. As already evidenced in laboratory conditions, *N. meinerti* unsustainably increase their respiration rates (Theuerkauff et al., 2018a). They may also try to escape from their burrows and breathe air preferentially. Therefore, more data on oxygen distribution in the sediment and on the sensitivity of *N. meinerti* to hypoxia are needed. It is also necessary to study other crab species living in the mangrove forest such as fiddler crabs or others Sesamidae (e.g.

Parasesarma guttatum) which may be more or less sensitive according to Capdeville (2018) and personal observations. Furthermore, a high diversity of burrowing species must create a higher sediment heterogeneity, which is crucial for bioturbation efficiency and, thus, for optimal ecosystem functioning, as already reported for other invertebrates (Pischedda, (2008). Further studies should also look at the digestive tract and especially the hepatopancreas which is involved in absorption and nutrient storage, enzyme synthesis, lipid and carbohydrate metabolism, detoxification and absorption processes (Ruppert et al., 2004; Wang et al., 2014). Altogether, these studies clearly indicate that mangrove crabs are affected by WW exposure and are most likely impacted by uncontrolled WW discharges that occur in most tropical countries. It emphasizes the need for a proper WW management based on results from both laboratory and field analyses.

Acknowledgements

The authors are thankful to the *Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte* (SIEAM) and especially Kissimati Abdallah for her help on the field. This study was partly funded through the Marie Curie Actions EU grant FP7-PEOPLE-2013-IEF (grant number 622087-“IAS-Life”) awarded to GRI and by the French National Agency for Water (ONEMA), which is now part of the French Agency for Biodiversity (AFB).

Bibliography

La bibliographie de cet article est intégrée à la fin du manuscrit

5.3 Conclusion et poursuite de l'étude *in situ*

Les principaux résultats de cette étude démontrent qu'il y a bien un effet *in situ* sur les populations de crabe, que ce soit en termes de densité de terrier qu'au niveau physiologique, validant les biomarqueurs utilisés en laboratoire (voir ci-dessous §5.4).

La densité de terrier diminue au niveau de la zone de rejet. Cette diminution peut être la cause d'une diminution de l'effectif de la population et/ou d'une diminution de l'activité bioturbatrice des individus de la population. S'il est bien connu qu'on peut relier la densité de terrier à la densité des crabes (Kent and McGuinness, 2006; Schlacher et al., 2016; Skov et al., 2002), ceci n'est pas pour autant le cas lors d'une exposition aux eaux usées. En effet, il a déjà été montré que des effluents domestiques pouvaient réduire l'activité bioturbatrice des crabes de mangrove (Bartolini et al., 2011). Il est donc possible qu'il y ait soit une diminution de la population soit une diminution de l'activité bioturbatrice. Cependant, une troisième hypothèse est également possible : un changement dans la communauté des espèces. En effet, certaines espèces comme *Parasesarma guttatum* ne creusent pas de terriers mais utilisent les crevasses et les anfractuosités entre les racines comme abri (Skov et al., 2002). Les mesures réalisées par Kissimati Abdallah entre 2012 et 2014 et publiées par Capdeville et al. (Figure 65) sur le faciès à *Cerriops tagal* ont en effet montré que *P. guttatum*, déjà majoritaire dans la parcelle témoin, l'est encore d'avantage dans la zone de rejet et qu'il y a une modification en termes de biodiversité dans la parcelle impactée (indice de Shannon). Ainsi, alors que dans la zone témoin les Sesarmidae sont déjà dominants en représentant 60 % de la communauté contre 40 % pour les Ocypodidae, ils constituent presque la majorité des espèces présentes dans les zones impactées (92 % contre 12 % pour les Ocypodidae). Mais même au sein des Sesarmidae, seule *P. guttatum* voit sa fréquence augmenter. Par exemple, *N. meinerti* disparaît de la zone au même titre que nombre d'Ocypodidae tel que *T. urvillei*.

Ils n'ont par contre pas observé de variations significatives en termes de densité de crabe ainsi qu'en termes de densité des terriers de crabe entre 2012 et 2014. Ces résultats sont étonnants mais plusieurs facteurs pourraient les expliquer. Si *P. guttatum* est opportuniste, il peut toutefois également creuser des terriers lorsqu'il n'y a pas d'autres abris disponibles (Skov et al., 2002), et ainsi pourrait entretenir des cavités délaissées.

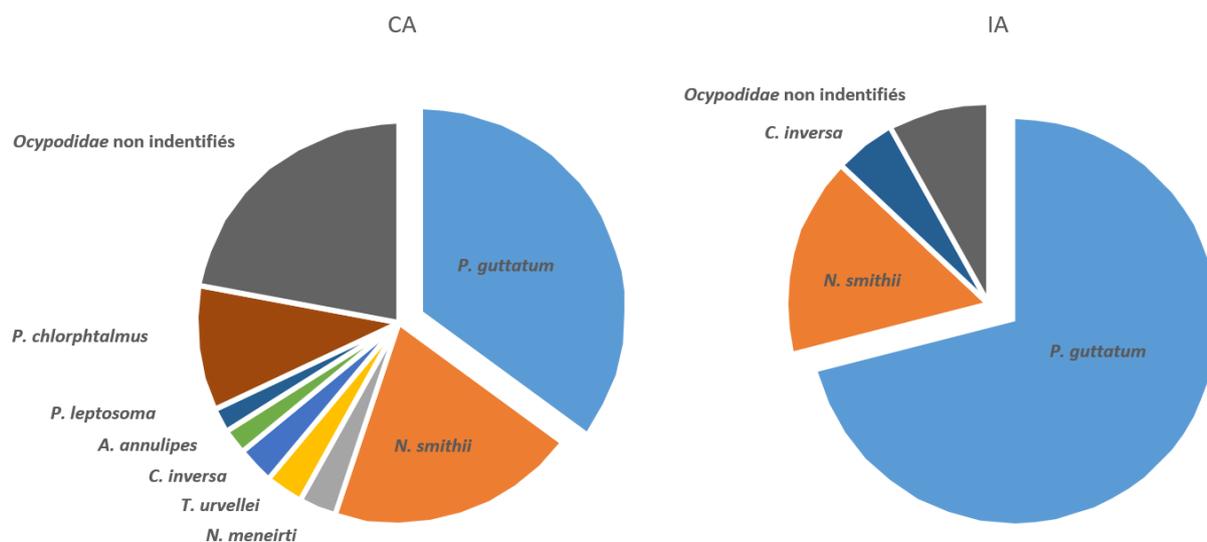


Figure 65 : Résultats sur les communautés de crabes obtenus par Capdeville et al. (2018) entre 2012 et 2014 dans la parcelle témoin (CA) et la parcelle impactée (IA). Les valeurs de densité de crabe ont été obtenues à partir de quadrats fixes positionnés mi buttes-mi drain.

De plus, le comptage des terriers dans cette étude s'est réalisé sur des quadrats disposés à moitié dans des zones d'écoulement des eaux usées et à moitié au niveau des monticules de sédiments. Il est donc possible que ces derniers soient moins impactés et que les crabes y trouvent refuge. Les terriers disposés sur ces monticules pourraient présenter un nombre d'ouverture supérieur à ceux classiquement disposés au niveau du sol et ainsi fausser la densité réelle des terriers ce qui pourrait faire baisser le nombre de terrier qui aurait dû être observé par ce changement de communauté. En effet, il a déjà été montré qu'il faut être particulièrement prudent lorsqu'on estime la densité de crabes à partir de la densité de terriers, notamment à cause de variations dans les caractéristiques de l'habitat (Schlacher et al., 2016).

Les enjeux de ce changement de communauté sur le fonctionnement de l'écosystème sont discutés au §4.5 dans le cadre des différences de sensibilité observées pour les trois espèces de crabe étudiées.

En décembre 2015, la zone de rejet a été modifiée (cf Figure 3) de sorte à pouvoir étudier la résilience du système. Ainsi, nous avons continué le comptage des terriers de crabe dans la zone tous les 6 mois afin de suivre leur évolution (Figure 66). Suite à des avaries du système de rejet au moment de la campagne de terrain ainsi qu'aux mouvements sociaux que Mayotte a connu à cette période, seuls les relevés en fin de saison humide ont pu être effectués.

En 2015, la salinité moyenne dans la zone témoin était de 1064 ± 79 mOsm·kg⁻¹ et la densité moyenne des terriers de 45 ± 10 contre 37 ± 23 dans la zone impactée. De plus, les variations de salinité sont corrélées à **62 %** avec la variation de la densité des terriers (R^2 ajusté : $F_{1,30}=51,6$, $p<0,001$). En mars 2016, l'interpolation de la salinité met bien en évidence le déplacement de la zone de rejet.

Par contre, les résultats concernant les terriers de crabe montre que leur densité diminue depuis 2015 ($\text{Chi}^2=82,6$, $\text{ddl}=2$, $p<0,001$). La densité des terriers est la plus faible au niveau de la zone qui est toujours impactée depuis 2008. De plus, la densité au niveau de l'ancienne zone impactée reste toujours faible. Cela est corroboré par la corrélation existant entre les variations de salinité et celles des terriers : elle n'est plus que **de 5,3 %** en 2016 (R^2 ajusté, $F_{1,30}=1,7$, $p=0,2$) et **14,0 %** en 2017 (R^2 ajusté : $F_{1,48}=7,8$, $p<0,01$). Ainsi, la totalité de la zone de résilience reste toujours impactée en mars 2017.

On notera cependant que la saison humide de 2017 fut particulière réduite, avec des précipitations beaucoup moins importantes qui obligèrent même les habitants du sud de l'île (Malamani compris) à se priver d'eau 2 jours sur 3 de mi-décembre 2016 à avril 2017. En plus des conséquences en termes de production d'eaux usées, cette relative absence de saison des pluies pourrait avoir eu des conséquences :

- sur le recrutement des crabes, qui bien que répartis sur l'année entière pour la plupart des espèces, connaît un pic en début de saison des pluies pour plusieurs espèces telles que *P. guttatum* (Flores et al., 2002), *N. meinerti* et également plusieurs Ocypodidae (Emmerson, 1994).
- sur la survie des juvéniles de crabes. Si des données sur la survie des larves (pélagiques) des crabes de mangrove existent, peu de données néanmoins, sont disponibles concernant les juvéniles. Cependant, il a déjà été démontré que le crabe tropical *Armases miersii* présente un moins bon taux de survie aux salinités extrêmes (Anger, 1996). Egalement, les taux de survie mesurés à différentes températures pour les juvéniles de *Charybis feriatus* sont toujours optimaux à 25 ppt (Baylon and Suzuki, 2007).

Ces stades de développement sont d'autant plus importantes que dans les drains du faciès à *Cerriops*, plus de 95 % des terriers ont un diamètre inférieur à 1 cm et concernent donc principalement les juvéniles.

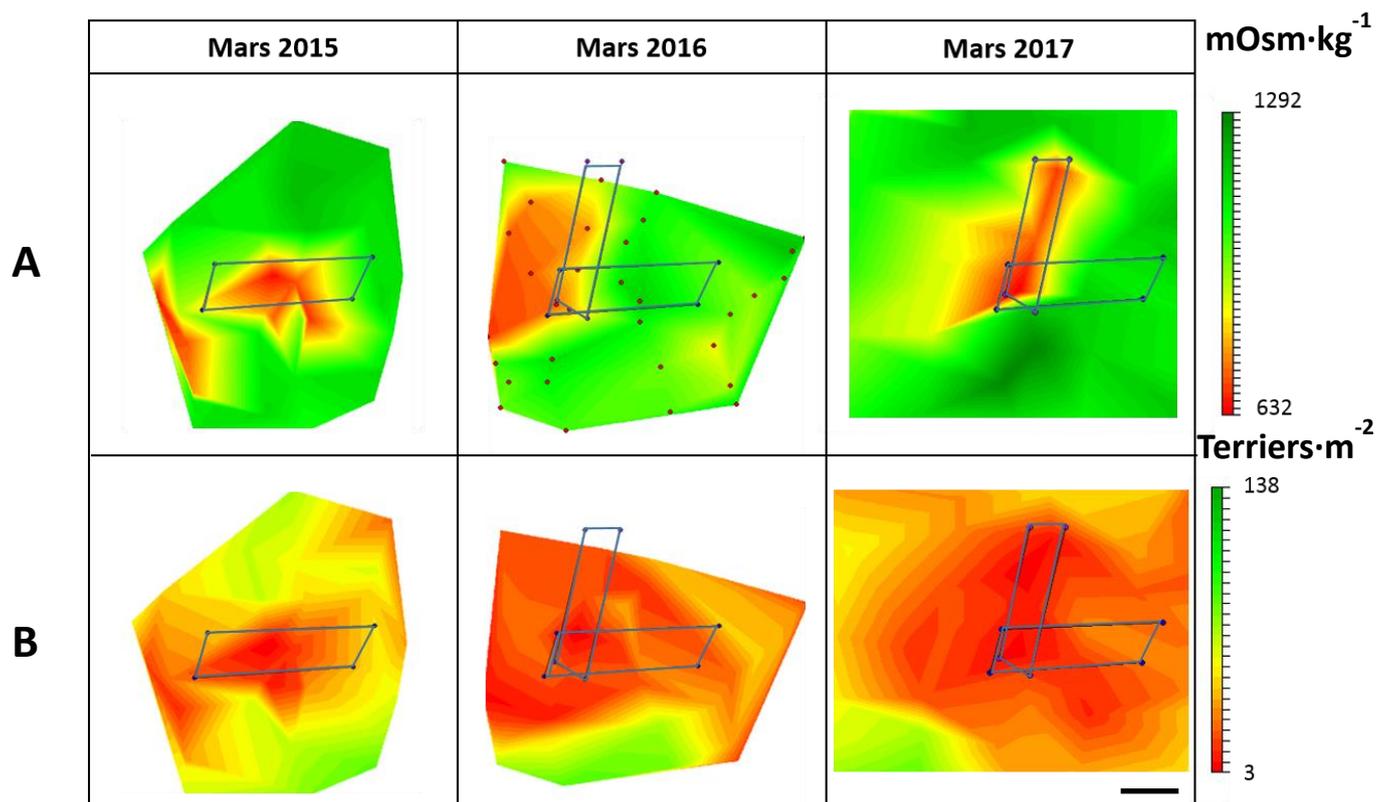


Figure 66 : Evolution de la salinité dans l'eau interstitielle (en $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$, A) et de la densité de terriers de crabe (B) depuis mars 2015. Les couleurs rouges représentent les valeurs basses et les vertes les valeurs élevées. Les points représentent un exemple des transects effectués qui ont servis à l'interpolation par triangulation. Barre d'échelle : 10m.

5.4 Du laboratoire aux conditions naturelles : perspectives et conclusion

Les expériences préliminaires menées en laboratoire, avec 24 à 72 h d'exposition aux eaux usées ont montré des taux de mortalité importants (>50 %). Les crabes ne semblent donc pas avoir la capacité de supporter de telles durées d'exposition. Toutefois, avec un protocole expérimental plus réaliste, les résultats sont également alarmants. Le plus spectaculaire est la consommation en oxygène qui engendre des coûts métaboliques excessifs. Cependant, les conclusions *in situ* sont plus mitigées, les crabes ayant, en effet, survécus sans problème à 3 semaines d'exposition chronique dans les conditions naturelles. Même *Tubuca urvillei*, espèce qui a totalement disparue de la zone impactée, a survécu 54 jours à l'encagement; l'exposition

prévue pour durer 3 semaines ayant été prolongée faute d'azote liquide disponible. Il faut noter que les résultats d'écotoxicité en laboratoire doivent être analysés avec précaution. Par exemple, Delignette-Muller et al. (2011) suggèrent de définir des intervalles de confiance aux NOEC (plus forte concentration sans effet observé) plutôt qu'une valeur seuil.

Les effets observés sur le terrain sont toutefois similaires à ceux observés en laboratoire, mais restent moins marqués. En effet, la fonction osmorégulatrice est impactée mais sans changement observable au niveau des activités de la pompe à sodium. Ces effets pourraient être liés à des modifications au niveau de l'épithélium des branchies postérieures, comme cela a été observé en laboratoire (voir §3.2).

De plus, les expériences en laboratoire se basent souvent sur des espèces modèles, qui ne sont pas forcément représentative des autres espèces potentiellement plus vulnérables. C'est pourquoi nous avons choisi ici 3 espèces différentes, avec, en plus, l'information déjà existante quant à la sensibilité des différentes espèces (observations effectuées par Kissimati Abdallah). Si le choix des crabes de mangrove revêt une importance particulière pour le fonctionnement de l'écosystème du fait de leur rôle ingénieur qui est primordial pour le processus de bioremédiation, il serait également important de regarder les effets des eaux usées à d'autres niveaux tropiques notamment vis-à-vis des mollusques et des poissons téléostéens (ex : périophtalmes) présents en mangrove (la communauté microbienne et les palétuviers ont déjà été étudiés au laboratoire Ecolab).

Néanmoins, les expériences en laboratoire ont l'avantage de cibler un effet toxique de manière indépendante par rapport à différents facteurs environnementaux (biotiques et abiotiques). Les analyses en conditions contrôlées en laboratoire présentent ainsi des avantages mais aussi des inconvénients car la simplification du protocole expérimental permettant ainsi l'étude ciblée d'un polluant ne permet pas une représentation écologique réaliste. A l'inverse, les études *in situ* sont moins reproductibles et spécifiques. La Figure 67 représente schématiquement ces contraintes et les différentes voies d'études possibles.

C'est toute l'importance de ce chapitre, car les tests écotoxicologiques en laboratoire ne peuvent pas prendre en compte tous les facteurs physiques et biotiques que les organismes rencontrent dans leur environnement naturel (Burton et al., 2005). De plus, l'exposition en continue d'organismes à un seul polluant et à une seule concentration ne représente pas la variabilité des expositions dans le milieu naturel ou les concentrations et la composition des eaux usées varient temporellement et spatialement. En effet, de nombreux facteurs environnementaux tels que la

température ou la salinité, peuvent influencer la toxicité d'un composé, qui peut également interagir en synergie avec d'autres polluants (Barbieri and Doi, 2011; Cedergreen, 2014; Cleuvers, 2003; Romano and Zeng, 2013).

Ainsi, la toxicité mesurée *in situ* peut se révéler plus importante due à des contaminants non identifiés ou qui agissent de manière synergique avec d'autres composés (Werner et al., 2010). L'étude *in situ* présente également des biais méthodologiques. Les organismes ne doivent pas être stressés par les conditions expérimentales, la composition du polluant doit être mieux définie pour identifier les effets toxiques et le site d'étude doit être comparable aux sites expérimentaux (Baird et al., 2007b).

Ces résultats peuvent dès lors être spécifiques au site étudié et doivent donc être répliqués, et analysés avec précaution. En effet, les études *in situ* doivent permettre de déterminer un cadre de protection (Baird et al., 2007a) mais dans un contexte précis correspondant au site d'étude (Wharfe et al., 2007).

Ainsi, les biomarqueurs sont des outils importants pour mesurer des effets sublétaux. *In situ*, ils reflètent l'exposition effective des individus à un panel de facteurs. Cependant, ils peuvent également être reliés à une catégorie de polluants. Par exemple, les métalloprotéines peuvent être étudiées dans le cadre de la présence de métaux lourds.

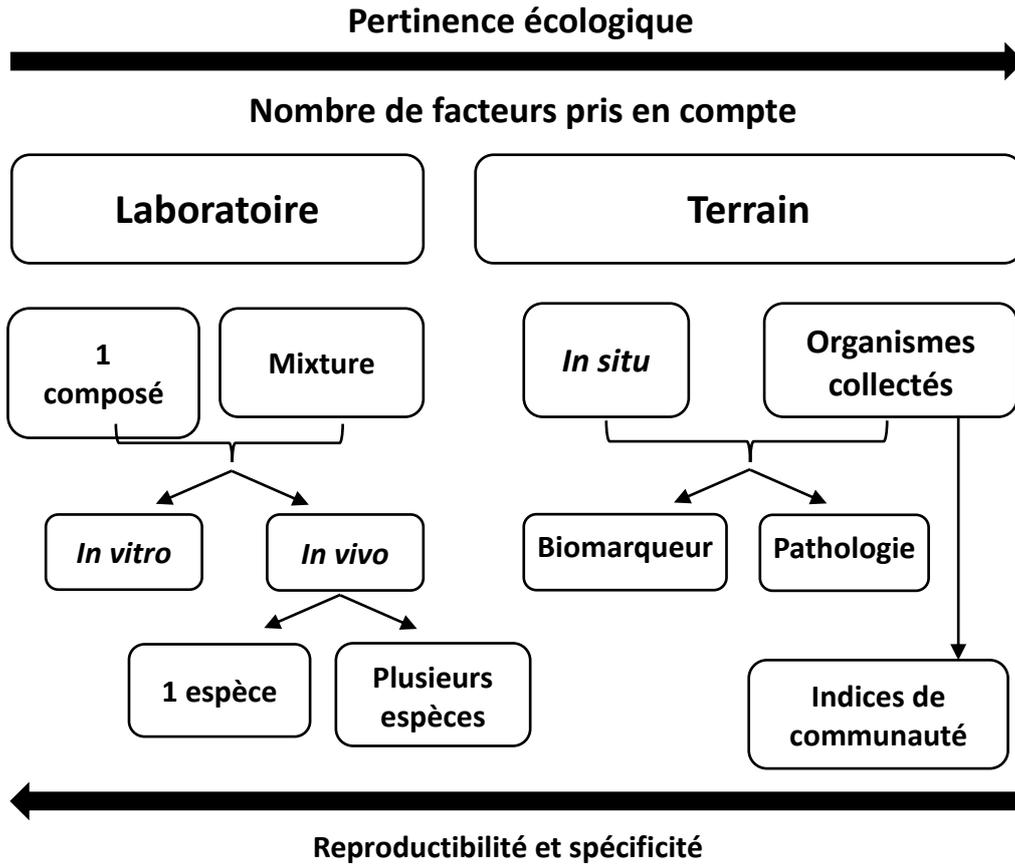


Figure 67 : Différentes approches d'études pour mesurer la toxicité de produits chimiques et leurs effets sur la vie aquatique. Si l'on augmente la pertinence de l'étude par rapport à la réalité environnementale, la standardisation et la spécificité de l'étude diminue inévitablement. Les biomarqueurs ont l'intérêt de pouvoir faire le pont en étant éventuellement spécifique à un polluant. Modifié d'après Connon et al. (2012).

Chapitre 6: Discussion générale et perspectives

6.1 Du biomarqueur à la population

Les résultats obtenus dans cette thèse montrent que l'osmorégulation, le stress oxydatif et la balance énergétique sont impactés par le rejet d'eaux usées chez les crabes de mangrove (Chapitre 4) y compris *in situ* lors de l'expérience dans la zone de rejet (Chapitre 5). Ces altérations sont espèces-spécifiques et les effets sur le biomarqueur de la balance énergétique sont particulièrement remarquables. En effet, deux espèces (*Neosarmatium meinerti*, Sesarmidae et *Tubuca urvillei*, Ocypodidae) qui sont impactées écologiquement avec une diminution d'effectif ou une disparition de la population de la zone, réagissent en augmentant fortement leur métabolisme alors que la seule espèce proliférant dans la zone (*Parasesarma guttatum*, Sesarmidae) (Capdeville et al., 2018), réagit à l'inverse en entrant en apnée (Chapitre 4).

Le stress peut augmenter la demande métabolique basale, principalement pour compenser les coûts liés à la régulation de mécanismes cellulaires de protections tels que la synthèse de métalloprotéines (pour les métaux), les défenses antioxydantes, la régulation ionique, etc. (McGeer et al., 2000; Sokolova and Lannig, 2008; Valavanidis et al., 2006). L'activité physiologique va donc augmenter en incluant de nombreuses réponses telles que le renouvellement cellulaire pour compenser l'apoptose, la réparation de l'ADN et des lipides, la synthèse et renouvellement de protéines, etc. soit autant de processus coûteux en ATP (Hochachka and Somero, 2002). Ainsi, des modèles tels que les « budgets énergétiques dynamiques » (Kooijman, 2010) prennent en compte ces coûts métaboliques (Jager et al., 2014) et ils ont été observés chez de nombreux organismes tels que *Daphnia magna* (Jager et al., 2010). Les résultats obtenus dans cette thèse vont dans ce sens : les eaux usées ont significativement impacté différents processus cellulaires coûteux en énergie : l'osmorégulation (qui peut représenter 5 à 30 % du métabolisme basal) (Sokolova et al., 2012) et la balance oxydative principalement. Ainsi, l'augmentation du métabolisme induit par les eaux usées peut diminuer la fitness des crabes en réduisant leur capacité métabolique aérobie (« aerobic scope ») (Guderley and Pörtner, 2010). La capacité métabolique aérobie représente la différence entre la consommation en oxygène au repos et la consommation maximale lors d'un effort, c'est-à-dire la capacité à augmenter le métabolisme aérobie pour subvenir aux besoins de fonctions telles que la croissance, la reproduction, etc. Celles-ci pourraient être maintenues, à condition que la consommation d'oxygène maximale soit également plus importante chez les crabes exposés

aux eaux usées. Bien que nous ne l'ayons pas vérifiée, cette hypothèse paraît peu probable étant donné l'intensité de la consommation d'oxygène observée en eaux usées et son maintien dans le temps. Cependant, les dommages histologiques observés au niveau des branchies (réduction de l'épaisseur de l'épithélium des branchies postérieures) pourraient entraîner un compromis physiologique (« trade-off ») permettant d'augmenter la capacité des branchies pour les échanges gazeux mais au détriment de l'osmorégulation (Sardella and Brauner, 2007). Cette augmentation de la surface d'échange induit également une augmentation de l'assimilation des polluants. La diminution de la fitness pourrait donc expliquer le déclin des populations de *N. meinerti* et *T. urvillei* observé dans la zone de rejet. Si la capacité métabolique aérobie est réduite, la fitness des individus en sera réduite car ils auront moins d'énergie à allouer à la croissance et à la reproduction.

Suite à un stress extrême nous avons observé un ralentissement voire une suppression de l'activité métabolique chez *P. guttatum*. Cela n'est pas le cas chez *N. meinerti* et *T. urvillei*. Cette suppression permettrait à *P. guttatum* de conserver des réserves énergétiques et de limiter les déchets issus du métabolisme en attendant que les conditions redeviennent favorables (Sokolova et al., 2012). Cette dépression métabolique prolongerait donc la survie, notamment via un métabolisme partiellement anaérobie pour compenser le manque d'énergie (Sokolova and Pörtner, 2001). Les ressources seraient alors principalement allouées aux mécanismes permettant de préserver les structures intracellulaires (Sokolova et al., 2012). Ainsi, cette réaction aux eaux usées de *Parasesarma guttatum* lui permet de limiter les dommages et de trouver un microhabitat non impacté au sein de la zone de rejet tel que les racines de palétuviers. Cet état n'étant pas viable à long terme, on peut émettre l'hypothèse que *P. guttatum* peut quitter les zones d'écoulement des eaux usées, celui-ci n'étant pas inféodé à un terrier contrairement aux crabes bioturbateurs tels que *N. meinerti* et *T. urvillei*. Toutefois, il faut noter que *P. guttatum* pourrait être soumis à des dommages importants lors de la réoxygénation (cf page 143).

La fitness des crabes peut également être affectée par une diminution des ressources allouées à la protection immune, les polluants étant un facteur important affectant l'immunocompétence chez les invertébrés (Ellis et al., 2011) et entraînant souvent sa réduction chez les crustacés (Le Moullac and Haffner, 2000). Les eaux usées peuvent également apporter d'éventuels agents pathogènes et les trois espèces étudiées montrent un dérèglement des dépenses énergétiques. En effet, dans un cas (*N. meinerti* et *T. urvillei*) on observe une dépense importante des réserves énergétiques (consommation énorme d'O₂) et dans l'autre (*P. guttatum*), une dépression

métabolique qui devrait entraîner une réduction de la production d'ATP et donc de ressources mobilisables.

6.2 Les eaux usées : une charge de micro-organismes pathogènes ?

Les eaux usées de Malamani sont chargées en bactéries (Herteman, 2010) et leur densité est également plus forte dans le biofilm de la zone de rejet (Bouchez et al., 2013). Elles pourraient être à l'origine de diverses infections. Car, en plus d'être pathogènes pour l'homme, de nombreuses bactéries, protozoaires et virus peuvent affecter les organismes marins dont les crustacés (Bateman and Stentiford, 2017; Choi et al., 2018; Oidtmann et al., 2017; Small and Pagenkopp, 2011; Stentiford et al., 2009). A titre d'exemple, la bactérie *Vibrio cholerae* a déjà été détectée sur les branchies (Babinchak et al., 1982) et dans l'hépatopancréas (Huq et al., 1986) de *Callinectes sapidus*. Les maladies induites peuvent donc être problématiques pour les communautés de crabe elles-mêmes mais aussi être une source de pathogènes pour l'homme via les espèces consommées. De nombreuses autres bactéries peuvent infecter les crustacés. Par exemple, la bactérie *Spiroplasma eriocheiris* peut infecter le crabe *Eriocheir sinensis* (Wang et al., 2011) ainsi que l'écrevisse *Procambarus clarkii* (Ding et al., 2014), causant la maladie dite des tremblements qui peut mener jusqu'à 90 % de mortalité (Wang et al., 2004).

L'augmentation de ces infections partout dans le monde est de plus en plus préoccupante, alors que les connaissances sont encore limitées (Bruto et al., 2018) et ne concernent presque exclusivement que les espèces d'intérêt commercial (Wang, 2011). C'est d'autant plus alarmant que les maladies infectieuses peuvent être à la source de nombreux déclin d'espèces marines, voire d'extinctions (Harvell et al., 2002). Ainsi, les vibrios tout comme d'autres bactéries pathogènes peuvent se retrouver dans l'environnement marin (Baquero et al., 2008; Caruso et al., 2016; Goh et al., 2017) notamment au niveau des eaux saumâtres (Maugeri et al., 2000), côtières (Hervio-Heath et al., 2002) et des mangroves (Lara et al., 2011). Les eaux usées domestiques sont ainsi une source d'agents pathogènes, y compris celles issues des petites stations rurales (Igbiosa et al., 2009).

Cet apport de bactéries et d'archées est indissociable des eaux usées dans les stations d'épurations du fait de leur importance dans les processus de traitement (Qin et al., 2018). En effet, elles sont impliquées dans le traitement primaire et secondaire. Cependant, de nombreuses solutions d'éradication à mettre en place avant le rejet dans le milieu naturel existent, telles que

l'irradiation par les UV (Drinan and Spellman, 2012), la chloration (Mitch and Sedlak, 2002), l'ozonation (Lüddeke et al., 2015) ou encore l'oxydation avancée (Rodriguez-Checa et al., 2015). Si ces procédés sont relativement coûteux, une alternative pour les pays en voie de développement à moindre coût existe, qui peut réduire drastiquement les niveaux de bactéries pathogènes et de virus : les bassins de stabilisation ensoleillés (Von Sperling, 2005). Dans ces bassins, les agents pathogènes seront éliminés par une action combinée de différents facteurs : un fort pH, une forte demande en oxygène, des radiations UV, de la prédation, du jeûne, etc. (Dias and Von Sperling, 2017). Ces procédés soulèvent cependant la question de l'impact à long terme de ces traitements sur la mutation des bactéries vers des formes plus résistantes (Dodd, 2012).

6.3 La disparition des Ocypodidae, une question d'éthologie?

La relation entre la disparition des crabes violonistes (Ocypodidae) au niveau de la zone de rejet des eaux usées et leur comportement a déjà été abordée au paragraphe 4.3.2. Il a été démontré que plusieurs espèces de cette famille ont la particularité de fermer leur terrier avant la marée haute pour se protéger pendant la période d'immersion (Crane, 1975; De la Iglesia et al., 1994). Or, lorsque les eaux usées sont déversées à marée basse, elles vont également inonder leurs terriers sans que ceux-ci aient eu l'occasion de le fermer. Les crabes auront alors le choix entre éviter ces eaux en restant à la surface des sédiments sur les nombreux monticules émergés, ou, rester au contact des eaux usées dans leur terrier, auquel ils sont d'ailleurs très fidèles (Cannicci et al., 1999). Cette question nécessiterait déjà une étude approfondie car les conséquences d'une émergence prolongée sur la physiologie de l'animal seraient complètement différentes de celles d'une exposition aux eaux usées. Dans tous les cas, le retour de la marée haute est supposé permettre un retour à la normale et « nettoyer » le terrier des eaux usées. La construction du bouchon pourrait donc aller à l'encontre de ce phénomène et conduirait à une persistance partielle des eaux usées dans le terrier. Bien que ce comportement de construction ait été observé chez énormément d'espèces de crabe violoniste (Christy, 1982; Litulo, 2004; Paoli et al., 2015; Shih et al., 2005; Warren and Underwood, 1986; Yamaguchi, 1998), seul son rôle lors de la reproduction a clairement été démontré (Christy and Salmon, 1984; Yamaguchi, 2001). Plusieurs auteurs ont montré que cette structure permet également de piéger une bulle d'air (De la Iglesia et al., 1994; Maitland, 1986; Teal, 1959) qui servirait alors de réservoir pour la respiration aérienne pendant l'immersion (Fusi et al., 2015). Une protection contre les

prédateurs est aussi évoquée (Warren, 1990). En prévision de la marée haute, les crabes vont donc se retrouver face à un dilemme : revenir dans les eaux usées du terrier et s'enfermer avec (en empêchant ainsi son lessivage efficace avec la montée des eaux, et sans la possibilité de garder une poche d'air si son terrier est complètement inondé par les eaux usées), ou séjourner hors du terrier lors du rejet et également pendant la période d'immersion par la marée haute mais sans accès à un réservoir d'air. De plus, la forte compétition et territorialité de ces espèces pourraient aggraver leur survie à l'extérieur de leur terrier, les combats entre mâles pouvant provoquer de graves blessures (cf §2.4.3). Dans les deux cas, les crabes violonistes font face à un stress particulier lié à ce comportement (et à sa respiration aérienne) particulier par rapport aux autres espèces de crabe de mangrove. Cela pourrait expliquer leur disparition quasi-totale observée dans la zone impactée (Capdeville et al., 2018).

6.4 Du crabe de mangrove à l'écosystème

Les modifications induites par les eaux usées sur les densités de terrier de crabe et sur les communautés de crabe peuvent avoir des conséquences sur la régénération des palétuviers, les processus biogéochimiques au niveau du sédiment et sur le mécanisme de bioremédiation lui-même.

En effet, certaines espèces de crabe de mangrove ont un rôle d'ingénieur de l'écosystème (cf §2.3) via leur consommation de propagules de palétuvier. Le changement de communauté et/ou de leur abondance pourrait donc modifier les processus de régénération de la flore (Dahdouh-Guebas et al., 1998; Lee, 1998; Van Nederveelde et al., 2015). Egalement, la diminution de la densité des terriers au niveau des drains entraîne une diminution de l'activité bioturbatrice, un des processus permettant de qualifier ces crabes d'espèces ingénieures de l'écosystème mangrove (cf §2.3). En effet, leur activité bioturbatrice modifie les cycles biogéochimiques tels que celui du carbone (Andreetta et al., 2014) ou du soufre (Ferreira et al., 2007; Holmer et al., 1994). Ces effets induits par la bioturbation se font via une modification de l'environnement (aération et circulation de l'eau dans le sédiment) ou indirectement via un contrôle sur les communautés de micro-organismes. Cette diminution d'activité devrait être confirmée par l'évaluation du volume des terriers restants. Cette expérience nécessiterait l'injection de résine dans les terriers : un processus destructeur, complexe et difficile à mettre en œuvre dans le faciès à *Cerriops* dans lequel la densité des racines est très importante (Herteman, 2010; Skov

et al., 2002). Cependant, cette hypothèse est corroborée par les résultats obtenus par Bartolini et al. (2011) dans une mangrove péri-urbaine où, malgré le fait que la biomasse augmente, l'activité bioturbatrice des crabes est réduite. La diminution de la densité de terriers pourrait être une conséquence du changement de communautés, le crabe *P. guttatum* devenant largement dominant, or, cette espèce ne creuse pas de terriers contrairement à celles qui disparaissent de la zone.

Finalement, la diminution des terriers pourrait avoir une conséquence directe sur l'efficacité du processus de bioremédiation. En effet, la charge de nutriments et de nombreux polluants va être absorbée, dégradée ou encore immobilisée par les palétuviers et la communauté microbienne. L'efficacité du traitement va donc dépendre de la disponibilité des eaux usées pour les producteurs primaires et bactéries, elle-même corrélée avec les surfaces des terriers et donc avec l'activité bioturbatrice des crabes. En plus, d'augmenter cette surface, l'abondance et le volume des terriers vont également permettre d'immobiliser les eaux usées durant la marée basse, ce qui limite le ruissellement et optimise la disponibilité des eaux pour les racines de palétuviers. Les terriers de crabe contiennent d'ailleurs une importante communauté microbienne au niveau de leurs parois qui serait stimulée par l'apport d'eaux usées (Kristensen, 2008). Ainsi, Penha-Lopes et al. (2010b) estiment que le CO₂ dégagé par la dégradation de la matière organique est 2 à 3 fois plus élevé dans un mésocosme de palétuviers soumis à des eaux usées avec des terriers d'Ocypodidae que sans. Ce facteur serait encore plus élevé en prenant en compte les terriers de Sesarmidae qui sont encore plus volumineux (Berti et al., 2008). De plus, sans les terriers, les eaux usées s'écouleront vers le front de mer en augmentant la surface impactée et finiront, dans le pire des scénarios, dans le lagon avec un traitement fortement réduit. En effet, la nature, la texture et la faible porosité du sédiment (constitué principalement par un dépôt argileux) font que l'eau circule principalement en surface et très peu de manière souterraine, la porosité du sol n'étant quasiment due qu'aux terriers de crabe (Herteman, 2010).

Outre les crabes, les autres compartiments de l'écosystème sont directement impactés par les eaux usées. Ainsi, et comme déjà présenté au paragraphe 1.2.2 à partir des études du laboratoire de recherche Ecolab (Bouchez et al., 2013; Capdeville et al., 2018; Herteman, 2010; Herteman et al., 2011), les palétuviers et les communautés microbiennes bénéficient de cet apport de nutriment. Pour la faune, de nombreuses espèces de poissons, et plus particulièrement leurs stades juvéniles, ainsi que des mollusques peuplent la zone et pourraient être impactés par le rejet des eaux usées. Le rôle de la mangrove pour ces organismes est important car elle joue un rôle de nurserie et de nourricerie pour de nombreuses espèces de poissons, qui coloniseront

ensuite les écosystèmes aquatiques adjacents (Beck et al., 2001; Laegdsgaard and Johnson, 2001; Nagelkerken et al., 2000; Pinto and PUNCHIHEWA, 1996; Robertson and Duke, 1987).

Les gastéropodes sont, avec les crabes, ceux qui dominent la macrofaune de la mangrove (Kathiresan and Bingham, 2001; Lee, 1998). Ils peuvent être prédateurs, herbivores, détritivores et sont d'importants consommateurs de la matière organique (Fratini et al., 2004; Slim et al., 1997). Dans certaines mangroves, ils peuvent même consommer davantage de feuilles que les crabes (Proffitt and Devlin, 2005), et ont également un rôle dans la régénération des palétuviers par leur prédation sur leurs propagules (Bosire et al., 2008; Dahdouh-Guebas et al., 1998). Contrairement aux crabes, ils se nourrissent également à marée haute, *Terebralia palustris* pouvant localiser les feuilles chimiquement dans l'eau (Fratini et al., 2001). Ils sont également des bioturbateurs qui vont avoir une influence sur le cycle des nutriments (Biles et al., 2002) et la stabilité du sédiment (Orvain et al., 2006, 2004). Ils vont réguler les biomasses du microphytobenthos et de la méiofaune (Carlén and Olafsson, 2002; Pape et al., 2008; Raw et al., 2017) et réduire la matière en suspension (Kamimura and Tsuchiya, 2004). Tout comme les crabes, les gastéropodes sont capables d'osmoréguler et de tolérer de larges gammes de salinités (Miranda et al., 2010; Weis, 2014). Les gastéropodes sont encore plus tolérant à l'anoxie que les crabes, notamment via la possibilité d'entrer en dépression métabolique pendant de longues périodes (Stickle et al., 1989).

Plusieurs études ont montré que les eaux usées ont un impact sur les gastropodes des mangroves. Yu et al. (1997) ont montré une diminution significative de leur biomasse et de leur diversité. Cependant ils interprètent ces changements comme une phase transitoire avant un retour à l'équilibre et considèrent qu'il n'y a pas d'impact sur la macrofaune. Mais Cannicci et al. (2009) ont montré que *Terebralia palustris*, gastéropode dominant des mangroves dans tout l'océan Indien, disparaît presque complètement dans deux mangroves péri-urbaines soumises à des rejets d'eaux usées au Kenya et au Mozambique. Ces résultats ont été confirmés en mésocosme par Penha-Lopes et al. (2010a) qui notèrent une diminution de la bioturbation, de la croissance et des taux de mortalités allant jusqu'à 30 % en 6 mois. Cependant, les mécanismes de cet impact restent inconnus et leur physiologie mériterait d'être explorée.

De nombreuses espèces de poissons sont également présentes dans la mangrove, soit de manière permanente pour certaines espèces à respiration bimodale telles que les périophtalmes, soit uniquement à marée haute pour de nombreuses espèces qui y trouvent refuge et/ou viennent s'y alimenter. S'ils sont en général considérés comme plus sensibles à la pollution (Vaal et al., 1997) et à l'anoxie que les invertébrés, ils sont toutefois plus mobiles. Les poissons à respiration

bimodale bénéficient également de la possibilité de respirer dans l'air, ce qui pourrait leur permettre d'éviter l'anoxie dans une eau eutrophiée. De nombreuses études ont montré l'impact d'eaux usées sur les poissons (Mcgovarin et al., 2018; Neri-Cruz et al., 2015; Sturve et al., 2008), mais nous n'avons identifié qu'une seule étude qui concerne l'environnement mangrove à ce sujet dans la recherche bibliographique effectuée. Le périophtalme *Periophthalmus waltoni* et le gobie *Boleophthalmus dussumieri*, deux espèces à respiration bimodale, font face aux rejets d'un effluent de ferme aquacole chargé en nutriments, qui conduirait à une augmentation de leur densité et de leur croissance (Kohan et al., 2018). D'avantage de données sont donc nécessaires pour comprendre l'impact possible des eaux usées domestiques sur cette communauté et il serait particulièrement intéressant de comparer les espèces entre elles en fonction de leur capacité à respirer de l'air.

Ainsi, il est indispensable de ne pas négliger les autres groupes faunistiques afin d'avoir une vision intégrative la plus exhaustive possible pour comprendre les effets du rejet des eaux usées domestiques sur le fonctionnement de l'ensemble de l'écosystème.

6.5 Conséquence à long terme et optimisation du processus

Le suivi de la densité de terrier de crabe depuis le changement de positionnement des parcelles (septembre 2015) a permis d'étudier la résilience de l'écosystème mangrove après un rejet d'eaux usées datant de plus de 7,5 ans. La résilience d'un écosystème représente sa capacité à revenir à son état antérieur à une perturbation (Folke et al., 2004; Holling, 1973). Cette capacité va dépendre de plusieurs caractéristiques de l'écosystème, telles que sa biodiversité (Isbell et al., 2015; Oliver et al., 2015). Pour un écosystème donné, elle va aussi dépendre de la durée, de la fréquence et de l'intensité de la perturbation. Les résultats obtenus ne permettent pas de quantifier cette résilience. Au contraire, l'impact du rejet sur les crabes tend à être de plus en plus important, aussi bien au niveau de la zone anciennement impactée et toujours impactée, qu'au niveau de la nouvelle zone impactée et de la zone de résilience

Il semblerait donc qu'après une année et demie les différentes espèces de crabe n'ont pas repeuplé la zone en considérant uniquement la densité de terriers situé dans les drains (Figure 66). Par contre, les derniers résultats menés sur l'ensemble « drains+buttes » de Capdeville (2018) indiquent que la densité des crabes a augmenté dans la zone de résilience (Figure 68B) et que la diversité est redevenue semblable à celle de la zone témoin (Figure 68C). Au contraire,

la densité et la diversité des crabes ont chuté dans la zone nouvellement impactée et dans celle qui a toujours été impactée depuis le début du projet.

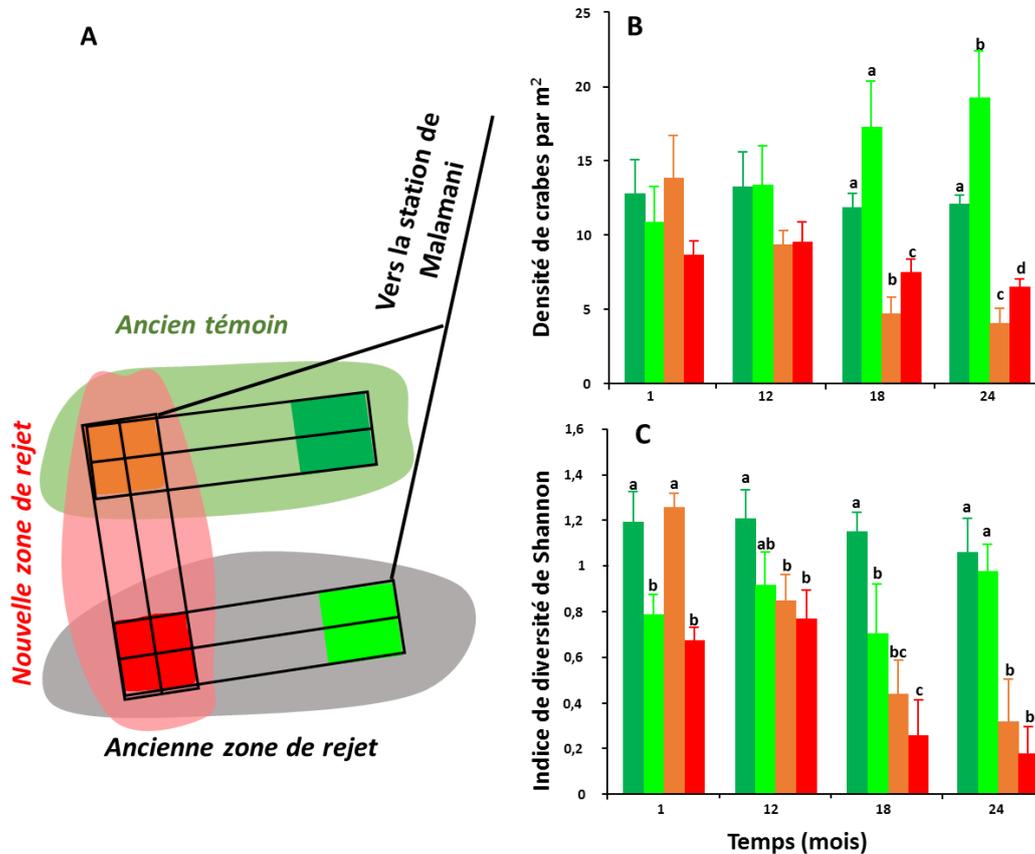


Figure 68 : Schéma rappelant le changement de la zone de rejet en septembre 2015 (A) et l'évolution pendant 24 mois après ce changement de la densité de crabes (A) et de l'indice de diversité de Shannon (B). Les couleurs correspondent aux zones de la figure A : zone jamais impactée (vert foncé), zone anciennement impactée (résilience, vert clair), zone impactée depuis 2008 (rouge), zone impactée depuis septembre 2015 (orange). Modifié d'après Capdeville (2018). Les lettres représentent des différences significatives entre zones par date ($p < 0,05$).

La densité et la diversité des crabes chutent significativement plus de 12 mois après le début de l'expérience sur la résilience dans la nouvelle zone impactée. Il semble donc que les crabes ne fuient pas activement la zone dès l'apparition des eaux usées mais pourraient disparaître progressivement selon deux hypothèses possibles : soit ils restent dans la zone jusqu'à une mort précoce, soit ils restent dans la zone jusqu'à atteindre un point de rupture. La survie n'étant plus possible ils se déplaceraient alors vers les zones adjacentes. La mortalité ou l'arrivée plus ou moins précoce au point de rupture seraient liées aux capacités d'acclimatation variables à l'échelle spécifique et individuelle des crabes, pouvant être d'ordre physiologique et/ou

comportementale. Encore une fois, seul *P. guttatum* est capable de s'acclimater dans la nouvelle zone de rejet, sa proportion dans l'assemblage des espèces de crabe dépassant les 90 %. L'omniprésence de cette espèce non bioturbatrice pose d'importantes interrogations quant au fonctionnement de l'écosystème et des services sous-jacents, notamment en ce qui concerne le maintien de la fonction « bioépuratrice » à long terme sans la présence des espèces bioturbatrices qui permettent l'infiltration des eaux usées dans le sédiment.

Au niveau de la zone de résilience, la densité et la diversité des crabe ont augmenté respectivement 18 et 24 mois après la fin des rejets (Capdeville, 2018). Les mesures de cette étude étant réalisées pour moitié sur les buttes et pour moitié au niveau des drains, il est possible que les crabes soient revenus dans la zone uniquement au niveau des buttes à l'exclusion des zones de drains où le rejet s'est infiltré pendant 8,5 années. De plus, la taille des terriers des zones d'écoulement des eaux entre les buttes est dans 95 % des cas inférieure à 1 cm, et cela représente donc principalement les terriers des juvéniles. La différence pourrait donc également venir d'une différence de sensibilité des différents stades de vie des crabes. En effet, les espèces peuvent avoir différentes sensibilités aux polluants au cours de leur vie (Buřič et al., 2013; Dissanayake et al., 2008; Ortiz-santaliestra et al., 2006). Des mesures plus précises différenciant buttes et drains permettraient de corroborer cette hypothèse, qui soulève une question intéressante concernant l'écotoxicologie des juvéniles de crabe de mangrove. Il convient dès lors de poursuivre les investigations, en comparant notamment la densité des terriers entre les buttes et les drains et en s'intéressant à la dynamique de la population, en étudiant, par exemple, ses classes de tailles.

Enfin, le processus pourrait également être optimisé en réduisant la nature toxique du rejet, ce qui sera discuté ci-dessous au paragraphe 6.6.3.

6.6 Des effets observés dans le faciès à *Cerriops* à plus grande échelle

6.6.1 Les différents faciès

Notre étude s'est focalisée sur le faciès à *Cerriops*, dont les premiers résultats (Herteman, 2010) ont montré que les communautés de crabes y seraient davantage impactées par rapport au faciès à *Rhizophora*. Cependant, les résultats obtenus dans cette étude ne peuvent pas être directement extrapolés à tous les autres faciès. En effet, Herteman (2010) suggérait déjà que la communauté

de crabes d'un faciès pouvait ne pas réagir de la même manière que celle d'un autre faciès, ce qui fut confirmé par Capdeville et al. (2018) qui observèrent une forte diminution de la densité de terriers dans le faciès à *Rhizophora* contrairement au faciès à *Ceriops*. Cependant peu d'études comparent l'effet du rejet d'eaux usées domestiques entre les différents faciès. Il est donc primordial de développer ce sujet d'étude car, comme décrit ci-dessous, de nombreux facteurs peuvent influencer les conséquences du rejet que ce soit au niveau des palétuviers ou au niveau des crabes de mangrove.

Premièrement, les assemblages d'espèces des communautés de ces deux faciès dans les zones non impactées ne sont pas identiques et pourraient réagir différemment au rejet. En effet, une espèce comme *P. guttatum* est davantage présente dans le faciès à *Rhizophora* (Dahdouh-Guebas et al., 2002; Gillikin and Schubart, 2004) et est moins sensible que les autres au rejet, probablement grâce à sa grande mobilité (cf §4.4). Le rejet aura donc d'autres conséquences dans le faciès à *Rhizophora*, en réduisant la présence d'espèces déjà plus rare telles que les Ocypodidae qui préfèrent un couvert végétal moins dense. D'autre part, les espèces de palétuviers peuvent réagir différemment au rejet d'eaux usées : *Rhizophora mucronata*, par exemple, montre une production de litière plutôt stable suite à un rejet, contrairement à *Ceriops tagal* (Herteman et al., 2011) et *Avicennia marina* (Nyomora and Njau, 2013) qui augmentent leur production de litière. Ces différences peuvent expliquer une altération des flux d'énergie (Kristensen et al., 2008) qui peuvent avoir des conséquences sur l'écosystème tout entier et particulièrement sur les communautés de crabe et de gastéropode qui se nourrissent de la litière tels que les Sesarmidae (Dahdouh-Guebas et al., 1997; Emmerson and McGwynne, 1992; Harada and Lee, 2016; Micheli, 1993; Slim et al., 1997).

Deuxièmement, des facteurs environnementaux pourraient expliquer ces différences de réaction des communautés. Par exemple, le type de faciès rencontré dépend de la salinité, de la topographie et de la nature du sédiment (nutriments, cohésion, granulométrie,...). Les eaux usées vont donc induire des variations de paramètres comme la salinité qui pourront être différents au sein de chaque faciès. Les différences de niveaux topographiques vont également influencer l'infiltration des eaux usées ainsi que leur vitesse d'écoulement (et donc leur éventuelle stagnation). La densité de buttes (plus importante dans le faciès à *Rhizophora*) pourrait aussi avoir une influence sur les surfaces potentiellement épargnées par les eaux usées pouvant servir de refuge aux crabes. Un autre paramètre important est l'influence de la marée (Figure 69) : dans le faciès à *Ceriops*, plus haut, l'immersion à marée haute sera moins fréquente et moins longue que dans le faciès à *Rhizophora*. La fréquence et l'intensité des phénomènes

de dessiccation seront aussi plus importantes dans le faciès à *Ceriops*. Dans le faciès à *Rhizophora*, qui est plus influencé par les cycles de marées, l'exposition aux eaux usées sera plus courte car elles sont plus fréquemment et plus rapidement lessivées par la marée.

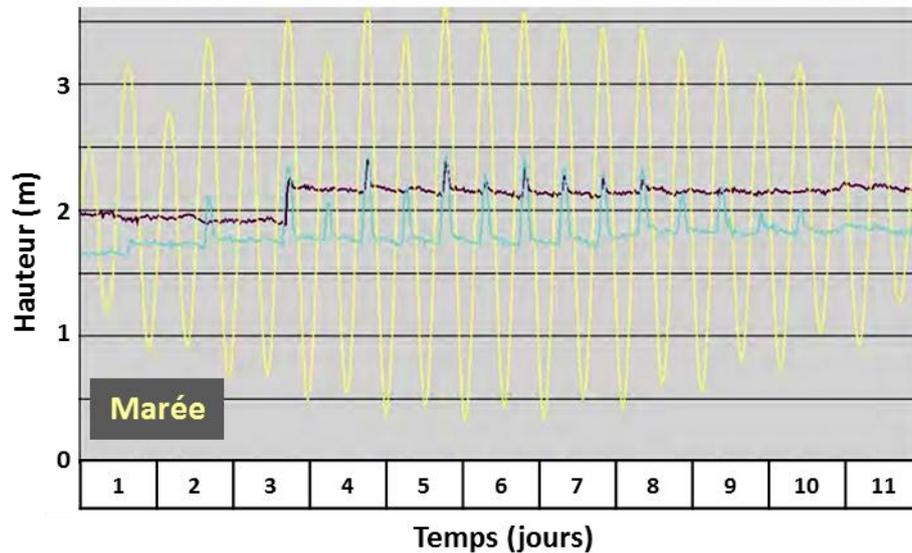


Figure 69 : Corrélation des variations du niveau de la nappe dans deux faciès différents (sans rejet) : *Ceriops* et *Rhizophora*. Les oscillations de la nappe sont corrélées aux oscillations de la marée, avec une influence proportionnelle au coefficient de marée. La nappe d'eau du faciès à *Rhizophora*, qui est plus bas, est soumise plus souvent et plus fortement à l'influence de la marée que le faciès à *Ceriops*. D'après Herteman (2010).

6.6.2 Autres mangroves

Les résultats obtenus doivent être analysés avec précaution car le faciès étudié n'est pas transposable partout. En effet, les impacts d'un rejet d'eaux usées domestiques vont dépendre de plusieurs facteurs. Ils dépendront premièrement, de la composition du rejet, qui dans un lieu donné variera temporellement et ne sera pas la même d'une station d'épuration à une autre, que ce soit à l'échelle de l'île de Mayotte ou mondiale. Ensuite, les impacts vont dépendre du volume déversé, de la surface de dispersion et de la durée du rejet. Enfin, ils vont dépendre de facteurs propres à chaque mangrove. Par exemple, Kathiresan et Bingham (2001) pointaient déjà le risque de généralisation des rejets dans les mangroves chinoises, en mentionnant les caractéristiques de la circulation de l'eau de chaque mangrove, qui vont influencer la dilution et le temps de résidence des polluants. Il paraît également évident que les caractéristiques de marnage de chaque site (et le niveau auquel les eaux usées sont déversées) ont également une

influence importante. Les flux et reflux des marées permettent de nettoyer la zone mais aussi d'améliorer la dégradation des nutriments en altérant des conditions anaérobie et aérobie, ce qui permet par exemple d'obtenir un meilleur couplage entre la dénitrification et la nitrification (Leung et al., 2016).

De plus, les mangroves de Mayotte sont dites « insulaires », elles subissent un fort stress hydrique par rapport aux mangroves continentales qui disposent d'un bassin versant beaucoup plus important, et donc d'un approvisionnement en eau douce plus conséquent (François Fromard, com. pers.). La forte plasticité des palétuviers leur permet néanmoins de s'adapter à ces conditions, notamment via la structure des racines et celle de la canopée (Reef and Lovelock, 2015). Hormis lors des épisodes de mousson, les eaux provenant du bassin versant ont généralement de faibles débits, mais leur rôle dans l'apport de nutriments, de matière organique et d'eau douce est indispensable pour les palétuviers (Herteman, 2010). Ainsi, la position en fond de baie de la mangrove de Malamani implique une faible pente qui engendre une nappe d'eau peu profonde (40 à 50 cm). Ces eaux de nappe influencent directement les palétuviers mais aussi les crabes car leur profondeur correspond à celle des terriers de crabe de la famille des Sesarmidae (Herteman, 2010). La hauteur de la nappe d'eau va donc être déterminante quant à l'infiltration des eaux usées dans le sédiment car elle va déterminer la profondeur et donc le volume de terriers de crabe, qui sera plus important pour les terriers plus profond. Le volume total formé par les terriers de crabe aura une influence sur l'efficacité du processus de bioépuration car il déterminera le volume d'eaux usées qui peut s'infiltrer dans le sédiment. Les communautés de crabes pourraient également réagir différemment en fonction de la profondeur de leur terrier, un terrier plus profond étant moins lessivé par la marée, il présentera un niveau de contamination plus important. En effet, la vitesse d'écoulement des eaux est inversement proportionnelle à la longueur du terrier (Ridd, 1996).

6.6.3 La nature du rejet

Un point important à prendre en compte avant l'utilisation de palétuviers pour le traitement des eaux usées est la nature et la quantité d'eaux usées à traiter. Ainsi, les différentes études qui se focalisent sur l'efficacité du traitement des eaux usées par la mangrove ou sur l'impact de ces eaux sur la macrofaune, ne sont pas directement comparables car les compositions de ces eaux usées sont systématiquement différentes. Une solution permettant de comparer des éventuelles études futures serait d'utiliser des eaux usées artificielles avec une composition fixe et bien déterminée. C'est une méthode ancienne et déjà utilisée par certains auteurs y compris dans le

cadre de rejets d'eaux usées dans la mangrove (Tam and Wong, 1996b; Wu et al., 2008b; Zhang et al., 2010). Cela permet d'étudier précisément l'impact d'un facteur tel que la salinité du rejet par exemple. Cependant, les études seraient alors bien moins pertinentes compte tenu de la complexité réelle des eaux usées déversées. L'intérêt de ce genre d'étude est également fortement limité car cela ne permet que d'obtenir des résultats pour une seule composition d'eaux usées. De plus, si la nature des eaux usées domestiques peut être estimée en fonction de sa source, elle n'en reste pas moins très variable au cours du temps d'une analyse à l'autre (Friedler et al., 2013) et il est dès lors important d'avoir un suivi régulier de leur composition et de l'impact de leur rejet.

Si la mangrove est un écosystème moins fragile que le lagon, et qu'il est préférable de rejeter les eaux usées au sein de la mangrove, il n'en reste pas moins que ces eaux devraient être davantage traitées avant rejet afin de réduire la charge polluante et ainsi réduire les impacts sur les crabes de mangrove. Ainsi, en plus d'un traitement primaire, il pourrait être ajouté un deuxième traitement en utilisant un filtre planté ou des biodisques. L'étude du ou des polluants majeurs affectant les crabes de mangrove, avec par exemple le protocole TIE (« toxicity identification evaluation ») (Adamsson et al., 1998; Werner et al., 2000) pourrait permettre de déterminer des seuils au niveau de la composition des effluents (par exemple la concentration en ammonium à ne pas dépasser lors du rejet d'eaux usées domestiques en mangrove). Ces seuils pourraient ainsi être plus restrictifs et adaptés à l'environnement mangrove que ceux prévus par la directive n°91/271/CEE du 21 Mai 1991 et l'arrêté du 22 juin 2007 (annexe I et II) complété par l'arrêté du 21 juillet 2015, qui fixent actuellement les prescriptions concernant les rejets d'eaux usées domestiques. Certains polluants tels que l'ammonium qui est connu pour être toxique pour les crustacés (Chen and Lin, 1991; Hazel et al., 1982; Ostrensky et al., 1992; Pinto et al., 2016; Rebelo et al., 2000, 1999, Romano and Zeng, 2013, 2010, 2007) pourraient être visés spécifiquement. Par exemple, les normes actuelles fixent un seuil maximal pour l'azote total sans tenir compte de ses différentes formes (nitrite, nitrate, etc.) dont les toxicités varient (Romano and Zeng, 2013).

6.7 De la branchie aux autres organes

6.7.1 La glande antennaire

Dans cette étude, nous avons étudié l'impact des eaux usées sur l'osmorégulation en nous focalisant surtout sur les branchies postérieures qui constituent le principal organe osmorégulateur chez les décapodes brachyours. Cependant, les glandes antennaires forment un organe pair qui a également un rôle important dans l'osmorégulation ainsi que dans l'excrétion de l'ammonium. Cet organe joue ainsi un rôle analogue au rein des vertébrés (Tsai and Lin, 2014). Ses fonctions varient cependant beaucoup selon les espèces. Par exemple, les glandes antennaires sont peu impliquées dans l'osmorégulation mais fortement dans l'excrétion de l'ammonium chez les décapodes marins alors qu'elles ont plus d'importance dans l'osmorégulation chez les crustacés terrestres (Freire et al., 2008; Holliday and Miller, 1984). En effet, les crabes terrestres sont limités dans l'absorption d'ions via les branchies du au stress hydrique induit par la vie aérienne comme chez *Ocypode quadrata* (De Vries et al., 1994) et doivent donc retenir au maximum les ions (Morris and Adamczewska, 1996; Pequeux, 1995). La glande antennaire permet de récupérer de nombreux ions en produisant une urine hypo-osmotique chez ces crabes. Les crustacés exposés en eau douce font face au même challenge osmotique et doivent également conserver au maximum leurs ions. La glande antennaire joue alors également ce rôle en produisant une urine hypo-osmotique comme cela a été observé chez l'écrevisse *Procambarus blandingi* (Peterson, 1974) ou le crabe de Dungeness (Wheatly, 1985). Chez d'autres espèces telles que *Gecarcoida natalis* (Morris and Ahern, 2003), l'urine produite au niveau de la glande antennaire est isosmotique et est ensuite redirigée dans la chambre branchiale pour que les branchies puissent réabsorber un maximum d'ions.

Elle est constituée de trois régions : le coelosomac, un canal excréteur subdivisé en labyrinthe et un conduit de sortie relié à une vessie urinaire. Le labyrinthe peut être plus ou moins complexe selon les espèces. Il contient des cellules échangeuses d'ions similaires du tubule proximal des reins de mammifères.

Les données concernant le lien entre la structure et la fonction des glandes antennaires sont toutefois rares chez les crustacés (Tsai and Lin, 2014). Si son importance dans ces procédés ne fait aucun doute, cet organe est peu étudié en écotoxicologie, à l'exception de quelques études sur des métaux lourds comme le cuivre (Sá et al., 2008), l'aluminium (Woodburn et al., 2011),

le mercure (Brown et al., 1988), le nickel (Blewett and Wood, 2015), etc. Ces travaux concernent surtout l'accumulation des métaux et peu leurs effets. L'étude de la glande antennaire pourrait donc fournir une nouvelle vision sur l'impact de polluants comme ceux présents dans les eaux usées sur l'osmorégulation des décapodes. Son étude via l'analyse de l'urine produite pourrait même présenter un certain atout du fait de son caractère non destructif et peu invasif (Galloway, 2006). Par exemple, l'urine peut être utilisée pour étudier l'impact de polluants comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques qui sont métabolisés par la glande antennaire (Koenig et al., 2008; Watson et al., 2004). Cette méthode a été par ailleurs validée chez le crabe *Ucides cordatus* dans une mangrove polluée par du pétrole (Nudi et al., 2010).

6.7.2 L'hépatopancréas

En termes d'étude de la balance énergétique, nous nous sommes concentrés sur la consommation en oxygène des animaux entiers, et sur l'étude des branchies antérieures qui sont spécialisées dans la respiration. L'étude de l'hépatopancréas pourrait être complémentaire à cette approche, cet organe étant impliqué aussi bien dans l'absorption (via l'excrétion d'enzymes digestives) que dans le stockage des nutriments. Ainsi, c'est à son niveau que les réserves énergétiques, stockées sous forme de lipides, sont allouées aux muscles, gonades et autres tissus (Hopkin and Nott, 1980; Huang et al., 2015; Jiang et al., 2009). Son rôle dans la digestion est d'autant plus important que suite au rejet d'eaux usées, les palétuviers et les microorganismes dont le crabe dépend pour son alimentation sont contaminés (Capdeville, 2018; Herteman, 2010). De plus, cet organe est également impliqué dans la défense immunitaire (Gross et al., 2001; Ruppert et al., 2004; Vogt et al., 1989) via la synthèse de molécules telles que des peptides antibactériens (Ried et al., 1996). Son fonctionnement énergétique et immunitaire pourrait donc être affecté par les eaux usées.

Dès lors, en marge des travaux principaux de cette thèse, une expérimentation a été entamée et l'hépatopancréas sera très certainement au centre des investigations futures. Comme cela a été supposé, les premiers résultats obtenus par Martínez-Alarcón montrent que les eaux usées réduisent l'activité de trois enzymes digestives (Figure 70) parmi les plus communes chez les décapodes (García-Carreño et al., 1994; Navarrete del Toro et al., 2011; Sainz et al., 2005; Tsai et al., 1991). L'expérience en cours sera donc poursuivie, avec notamment l'étude du stress oxydatif au niveau de cet organe et des expérimentations sur des crabes exposés *in situ*. En effet, l'hépatopancréas peut être soumis à un stress oxydatif important après un épisode

d'anoxie (qui peut être causé par les eaux usées) et lors de la réoxygénation (Parrilla-Taylor and Zenteno-Savín, 2011; Zenteno-Savín et al., 2006). On sait également que les épisodes d'anoxie peuvent modifier le métabolisme des réserves énergétiques de l'hépatopancréas, induisant un shift métabolique vers la néoglucogénèse (Brown-Peterson et al., 2008).

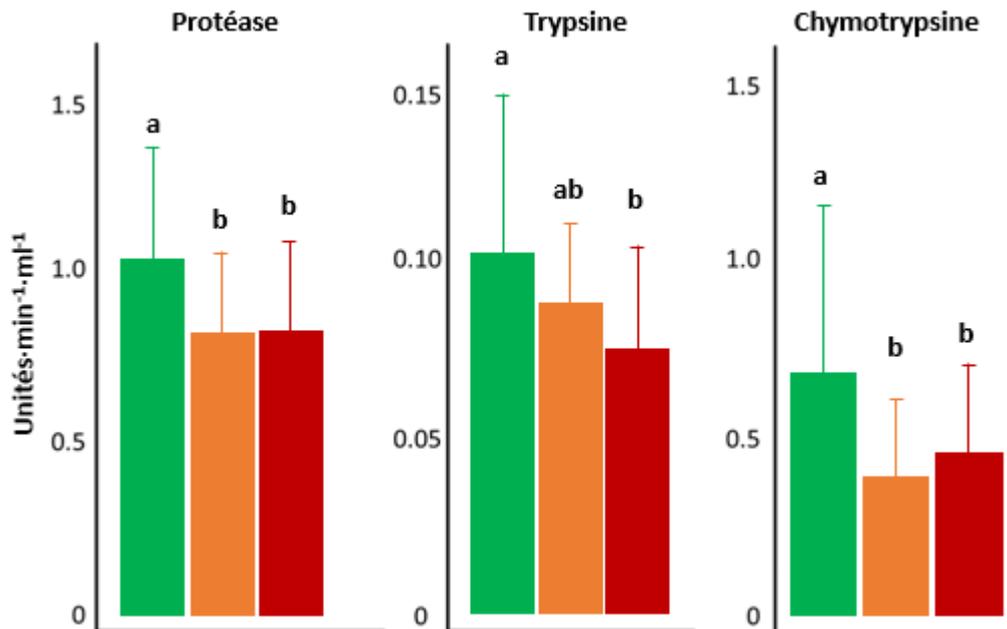


Figure 70 : Activité des trois enzymes digestives : protéase, trypsine et chymotrypsine chez des *Neosarmatium meinerti* mâles exposés à l'eau douce (contrôle, vert), à une eau enrichie en ammonium (orange), et aux eaux usées (rouge). Données obtenues par Diana Martínez-Alarcón (manuscrit en préparation).

6.7.3 Le poumon

Lors de l'immersion des terriers par les eaux usées, les crabes sont face à un dilemme : rester à l'abri mais dans les eaux usées ou éviter ces eaux mais en étant alors davantage exposé au milieu aérien (cf Figure 63 page 153). Si des expériences comportementales, qu'il convient de mener, révèlent une stratégie d'évitement des eaux usées, la capacité des espèces à se maintenir dans la zone pourrait alors être, au moins partiellement, liée à leur capacité à respirer dans l'air et/ou à la sensibilité des poumons aux eaux usées. En effet, chez crabes bimodaux, le poumon est situé dans la cavité branchiale et est donc potentiellement en contact avec les eaux usées et leur charge en polluants. Ces crabes font normalement circuler l'eau de l'arrière vers la partie antérieure du céphalothorax grâce au battement de leurs scaphognathites, mais peuvent inverser

ces battements pour faire entrer de l'air dans le poumon (Taylor and Butler, 1973; Wilkens and Young, 1992).

Puisque le poumon des crabes bimodaux est impliqué dans les échanges gazeux aussi bien d'O₂ que de CO₂ (Innes and Taylor, 1986; Morris, 2002; Morris and Greenaway, 1990), les pressions partielles d'O₂ et de CO₂ au niveau de l'hémolymphe située entre différents compartiments (entre le cœur et les poumons, avant et après les poumons, entre les poumons et les branchies) pourraient être mesurées en milieu aérien chez des animaux ayant subi une immersion dans l'eau douce ou dans les eaux usées. De plus, une étude focalisant sur l'anhydrase carbonique au niveau des branchies pourrait éventuellement révéler une modification de la régulation acido-basique. Ainsi, la meilleure capacité d'acclimatation de *P. guttatum* aux zones impactées par les eaux usées par rapport aux autres espèces qui disparaissent de ces zones pourrait aussi être étudiée en fonction des capacités de respiration aérienne et de contrôle de la balance acido-basique. D'après les recherches bibliographiques menées au cours de cette étude, il semble qu'aucune étude écotoxicologique n'ait été menée à ce jour sur les capacités de respiration aérienne des crabes de mangrove, ce qui pourrait ouvrir un nouveau champ de recherche.

6.8 De la physiologie à la conservation

L'écophysiologie permet de comprendre comment les organismes se sont adaptés à leur environnement et à ses fluctuations naturelles en développant des outils physiologiques variés. L'étude de ces outils permet également de caractériser la réponse des organismes face aux changements anthropiques, permettant de développer des stratégies de conservation adaptées aux différentes espèces (Wikelski and Cooke, 2006). Ainsi, la compréhension des mécanismes à l'origine du déclin d'une espèce permet de passer d'un processus d'observation de tendances à une compréhension mécaniste de la cause du déclin (Stevenson et al., 2005).

Ces outils sont divers et variés et ne se limitent pas à la physiologie seule, car les adaptations physiologiques sont associées étroitement avec le comportement (ex : la respiration aérienne de *T. urvillei* dans son terrier bouché à marée haute), les traits d'histoire de vie (et donc la plasticité phénotypique), la biologie moléculaire et évolutive qui sont le moteur et les outils de ces adaptations (Willmer et al., 2005). A l'heure actuelle, ce sont ainsi plus de 11 sous-disciplines qui contribuent à la science de la conservation : endocrinologie, écophysiologie, physiologie comparative, physiologie évolutive, immunologie et épidémiologie, physiologie génomique,

neurophysiologie, toxicologie, bioénergétique, physiologie cardiorespiratoire, physiologie reproductive, etc. (Madliger et al., 2018). L'utilisation de ces outils permet d'établir une politique de conservation efficace basée sur la collecte et l'interprétation de données physiologiques (Cooke et al., 2013).

Les techniques utilisées dans notre étude permettent d'établir l'état physiologique des individus de façon plus ou moins rapide et invasive. Nous avons utilisé certaines analyses rapides et non létales telles que la mesure de la pression osmotique et des espèces réactives de l'oxygène (ponction d'hémolymphe) ou la mesure des taux respiratoires par respirométrie (cette dernière nécessitant cependant de manipuler les animaux sur une plus longue durée). D'autres analyses impliquent l'euthanasie des individus pour l'étude du stress oxydant et des mécanismes osmorégulateurs. Ces dernières techniques sont néanmoins indispensables pour comprendre les mécanismes écophysologiques et écotoxicologiques engendrés par une exposition aux eaux usées mais ne sont pas applicables pour un suivi d'impact à long terme ou en routine. Dans ce cas les méthodes de respirométrie, de mesures de pression osmotique et de production d'espèces réactives de l'oxygène dans l'hémolymphe sont à privilégier.

La validation de biomarqueurs nécessite que ceux-ci montrent une relation prévisible avec la fitness des individus (Busch and Hayward, 2009; Madliger and Love, 2014) et tiennent compte les multiples facteurs qui peuvent influencer cette relation (Bonier et al., 2009). Ce type d'exercice nécessite donc de trouver un juste équilibre entre reproductibilité et réalité écologique (Figure 67, page 181). Notre approche qui est à mi-chemin entre laboratoire et exposition *in situ* a permis de démontrer l'effet des eaux usées sur l'osmorégulation et la balance oxydative, que ce soit en milieu contrôlé ou directement dans l'écosystème mangrove. L'étude de la balance énergétique des crabes exposés *in situ* permettrait de renforcer les résultats obtenus en laboratoire, afin de valider cette réaction dans les conditions réelles de rejet.

L'effet des eaux usées sur le métabolisme aérobie (consommation d'O₂ dans l'eau et l'air) des crabes de mangrove observé dans cette étude pourrait tendre à réduire la fitness de ces crabes où au minimum leur imposer des changements de phénologie et des trade-offs. En effet, en allouant des réserves énergétiques pour maintenir l'homéostasie interne (osmorégulation, balance oxydative, etc.), ces ressources ne pourront être allouées à la croissance et à la reproduction, qui sont des caractéristiques essentielles de la fitness (Sokolova et al., 2012; Stevenson, 2006). En plus d'affecter les dépenses métaboliques, les eaux usées affectent également directement la santé de l'individu (dommages au niveau de l'épithélium branchial, régulation ionique), induisant une diminution de la survie, du succès reproducteur et donc de la

fitness (Hansen and Johnson, 1999). Nos résultats concernent une zone expérimentale très limitée, mais peuvent permettre une interrogation quant à l'ensemble des rejets sauvages d'eaux usées non traitées qui ont lieu dans la plupart des pays émergents.

Comme déjà abordé ci-dessus (§6.6.3), les effets que nous avons observés pourraient servir à déterminer des valeurs seuils de polluants présents dans les eaux usées afin de protéger les différentes espèces de crabe de mangrove et ainsi œuvrer à leur conservation dans un contexte où les rejets ne peuvent que très rarement avoir lieu dans un autre milieu récepteur.

Chapitre 7: Synthèse et conclusion générale

Cette étude a permis de caractériser les effets d'un rejet d'eaux usées domestiques sur deux espèces de crabe de mangrove de la famille des Sesamidae (*Neosarmatium meinerti* et *Parasesarma guttatum*) et une espèce d'Ocypodidae (*Tubuca urvillei*) au niveau de leur capacité osmorégulatrice, de leur métabolisme énergétique et de leur balance oxydative. De plus, cette étude a été menée via deux approches : des tests en laboratoire en milieu contrôlé et des tests *in situ* en utilisant des crabes piégés dans des terriers artificiels. Les résultats obtenus sont comparés avec la réalité écologique observée dans la zone de rejet, d'abord via le suivi de la densité de terrier au niveau des zones d'écoulement des eaux usées, mais aussi au niveau de la communauté des espèces de crabe grâce aux observations de Kissimati Abdallah (SIEAM) et de l'équipe du laboratoire Ecolab.

La première étape a permis de caractériser les mécanismes osmorégulateurs de ces espèces et leurs adaptations à la vie bimodale, et notamment leur tolérance aux eaux usées (et par conséquent aussi aux chocs hypo-osmotiques puisque les eaux usées présentent une salinité proche de l'eau douce) alors que ces crabes habitent dans la zone intertidale dont la salinité varie selon l'espèce, de l'eau presque douce à l'eau hyper salée. Nous avons démontré que ces trois espèces sont de très bon hyper-hypo-osmorégulateurs, *N. meinerti* présentant la meilleure tolérance alors que *T. urvillei* et *P. guttatum* montrent des taux de mortalité de 50 et 25 % respectivement en eau douce après 72h mais tolèrent parfaitement l'eau saumâtre (>6 ppt). Ces différences peuvent s'expliquer par leurs différences d'habitat. *P. guttatum* et *T. urvillei* sont situés plus bas que *N. meinerti* qui est situé dans le haut de mangrove et est donc plus exposé à des variations de salinités extrêmes car la marée n'atteint la zone que lors des grands coefficients. Les sels peuvent donc soit s'y accumuler (via l'évaporation), soit être dilués (via les eaux de pluie et/ou de ruissellement) particulièrement pendant la saison des pluies.

Les trois espèces sont adaptées à la vie bimodale, avec une spécialisation des branchies postérieures dans l'osmorégulation et le développement de poumons pour la respiration aérienne. *T. urvillei* semble être le plus terrestrialisé, avec un épithélium branchial presque deux fois plus épais. De plus, cette espèce dépend fortement de l'air pour sa respiration, piégeant même une bulle d'air dans son terrier à marée haute pour respirer. Ce comportement a pu être observé en laboratoire, et l'état des individus s'est fortement dégradé lorsqu'ils ont été maintenus en circuit fermé sans accès à l'air (léthargie, obs. pers.). Ces trois espèces sont donc adaptées pour faire face aux chocs hypo-osmotiques, *T. urvillei* étant l'espèce la plus sensible qui montre une diminution drastique de sa pression osmotique à des salinités inférieure à 4 ppt (120 mOsm·kg⁻¹). De telles salinités sont observées dans les terriers de crabe pendant et après

les rejets, particulièrement pendant la saison humide mais sur des périodes restreintes du fait de leur salinisation par les eaux interstitielles, de ruissèlement et du retour de la marée. Cette sensibilité est partagée avec les autres espèces de crabe violoniste telles que *Paraleptuca chlorophthalmus*, *Austruca annulipes* et *Gelasimus vocans* qui présentent également des taux de mortalité importants dans des eaux de salinité inférieure à 3 ppt (Khanyile, 2012).

Seule l'espèce déjà dominante dans le faciès à *Cerriops*, *P. guttatum* semble tirer profit du rejet d'eaux usées domestiques, sa dominance n'en étant que renforcée alors que les autres espèces telles que *N. meinerti* et *T. urvillei* disparaissent ou quittent la zone impactée. Parmi les résultats obtenus, *P. guttatum* réagit totalement différemment des deux autres du point de vue de son métabolisme lorsqu'il est exposé aux eaux usées. En effet, lorsque *N. meinerti* et *T. urvillei* sont transférés de l'eau de mer vers les eaux usées, ils augmentent de 300 à 400 % leur consommation en oxygène, tandis que *P. guttatum* diminue la sienne jusqu'à rentrer en apnée après 2h et pourrait donc être en dépression métabolique. De plus, lorsqu'ils sont sortis des eaux usées après 2h d'immersion, les deux premières espèces continuent de consommer davantage d'O₂ dans l'air, contrairement à *P. guttatum* dont le taux métabolique ne varie pas lorsqu'il sort des eaux usées, de l'eau de mer ou de l'eau douce. Ce comportement pourrait le rendre plus apte que les autres espèces à éviter l'effet des eaux usées lorsqu'il y est immergé, et à s'abriter entre sur monticules de sédiments les racines de palétuviers qui sont épargnés par le rejet.

Lors d'une exposition de 5h, les trois espèces montrent les mêmes symptômes: altération de la balance oxydative et ionique des branchies, et ce de manière espèce-spécifique et sexe spécifique (Figure 71). De plus, les branchies postérieures qui sont davantage impliquées dans l'osmorégulation (avec des demandes énergétiques plus fortes, avec plus de mitochondries et potentiellement une plus forte production d'EROs) sont plus impactées que les branchies antérieures, que ce soit au niveau du renforcement des défenses oxydatives ou au niveau de l'épithélium qui est réduit. Ces modifications à l'échelle cellulaire impliquent d'autres mécanismes qui pourront être étudiés pour mieux caractériser les modifications physiologiques induites par les eaux usées (Figure 72).

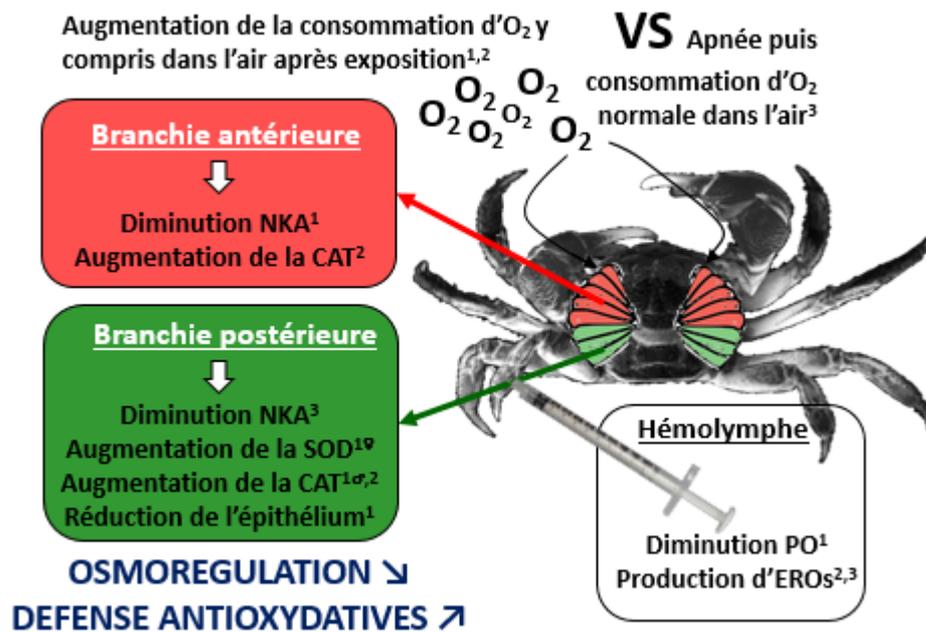


Figure 71 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les biomarqueurs chez *N. meinerti* (1), *T. urvillei* (2) et *P. guttatum* (3). Seule la consommation d'O₂ montre une réponse différente aux eaux usées entre les 3 espèces étudiées.

Ces effets à l'échelle cellulaire vont avoir des répercussions à l'échelle de l'organisme, diminuant *in fine* sa fitness, réduisant non seulement sa survie mais également son succès reproducteur qui peuvent ainsi expliquer la régression observée dans la zone de rejet, et particulièrement au niveau des zones de ruissellements des eaux usées. De plus, l'éthologie de *P. guttatum* peut expliquer sa plus grande tolérance aux eaux usées même s'il est impacté de manière similaire (NKA, EROs dans l'hémolymphe) que les deux autres espèces lorsqu'il est placé en eaux usées pendant 5h. En effet, cette espèce ne creuse pas son propre terrier contrairement aux deux autres, qui sont des espèces bioturbatrices fidèle à leur terrier. *P. guttatum* est donc mieux adapté pour éviter les zones d'infiltrations des eaux usées, en trouvant refuge dans des zones épargnées telles que les anfractuosités de racines au niveau des monticules de sédiment, zone qu'il utilise déjà naturellement pour s'abriter. A l'inverse, *N. meinerti* et *T. urvillei* voient leur unique refuge inondé d'eaux usées et devront faire face à un compromis entre émergence forcée et immersion dans les eaux usées. Encore une fois, *T. urvillei* devrait être plus sensible pour deux raisons. La première est qu'il dépend fortement de l'air pour sa respiration, y compris pendant les périodes de marée haute avant lesquelles il piège une bulle d'air dans son terrier en le fermant avant l'arrivée de l'eau. Il est dès lors possible qu'il n'ait pas la possibilité de pratiquer cette stratégie de vie lorsque son terrier a été inondé par les eaux usées. Ensuite, si cette espèce est bien adaptée à l'émergence et devrait pouvoir éviter les

eaux usées en sortant de son terrier, les individus mâles sont fortement territoriaux. Ils pourraient dès lors être confrontés à davantage de situations de duels qui peuvent mener à une issue fatale. L'étude du comportement des crabes lorsque leurs terriers sont immergés par les eaux usées permettrait donc de mieux caractériser ces phénomènes.

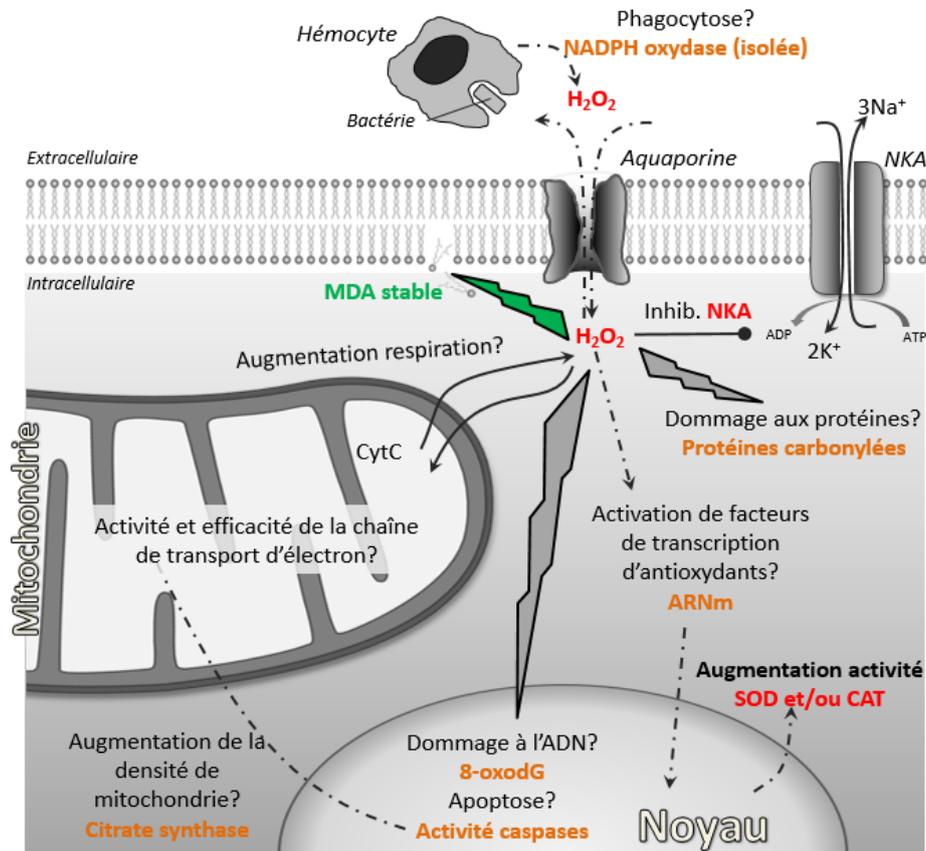


Figure 72 : Schéma des modifications physiologiques observées (en vert et rouge ce qui n'a pas et ce qui a été altéré, respectivement) à l'échelle cellulaire des branchies dues aux rejets d'eaux usées domestiques et les autres processus cellulaires directement liés qui pourraient également être modifiés. Des biomarqueurs de ces processus sont proposés en orange. ARN messager (ARNm), 8-oxo-2'-désoxyguanosine¹⁴ (8-oxodG), Cytochrome C (CytC), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), malondialdéhyde (MDA).

De plus, si les effets observés *in situ* sont moins visibles que ceux observés en laboratoire, l'osmorégulation et les défenses oxydatives sont bel et bien impactés par le rejet d'eaux usées domestiques chez les crabes enfermés dans des terriers artificiels pendant 3 semaines. Les biomarqueurs étudiés en laboratoire ont donc été validés *in situ*, dans des conditions pertinentes

¹⁴ Résulte de l'oxydation de la désoxyguanosine, élément permettant la formation des nucléotides qui sont eux-mêmes les éléments constitutifs des acides nucléiques (ADN et ARN).

d'un point de vue écologique. Il conviendrait également de les valider pendant la saison humide, au cours de laquelle les effluents sont moins toxiques car dilués via l'infiltration des eaux de pluie dans le réseau d'assainissement, mais pendant laquelle les chocs hypo-osmotiques peuvent être plus marqués. Ce phénomène pourrait causer un stress important pour les crabes violonistes très sensibles à ce type de choc. La différence de sensibilité, qu'elle soit physiologique et/ou comportementale, entre *P. guttatum* et les autres espèces pourra mener à une modification importante du fonctionnement de l'écosystème du fait que cette première espèce n'est pas bioturbatrice. Sans ces terriers, les eaux usées s'infiltreront moins bien dans le sédiment et la zone d'écoulement s'étendrait, augmentant la surface impactée par le rejet. Il convient dès lors d'assurer un suivi de la densité de terriers dans ces zones.

Il conviendrait également d'étudier l'impact des eaux usées sur d'autres stades de vie de ces espèces, et particulièrement les stades post-larvaires pendant lesquels a lieu le recrutement des crabes, et au cours desquels ils n'ont généralement pas acquis la capacité osmorégulatrice des adultes. Ces stades sont particulièrement importants dans les zones de ruissellement qui comportent 95 % de terriers inférieurs à 1 cm de diamètre qui correspondent donc à de jeunes recrues ou à des juvéniles.

Finalement il serait intéressant d'améliorer le traitement primaire par une deuxième étape telle qu'un filtre planté. Ceci permettrait de limiter l'impact sur les communautés de crabes tout en limitant toujours l'impact sur le lagon, la mangrove jouant encore une fois son rôle de filtre naturel.

Chapitre 8: Bibliographie

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205, 1831–1841.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.04.007>
- Abele, D., Philipp, E., Gonzalez, P.M., Puntarulo, S., 2007. Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Front. Biosci.* 12, 933–946. <https://doi.org/10.2741/2115>
- Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T., 2012a. Introduction to oxidative stress in aquatic ecosystems, in: Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. (Eds.), *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 1–6.
- Abele, D., Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., 2012b. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/9781444345988>
- Adamsson, M., Dave, G., Forsberg, L., Guterstam, B., 1998. Toxicity identification evaluation of ammonia, nitrite and heavy metals at the Stensund Wastewater Aquaculture plant, Sweden. *Water Sci. Technol.* 38, 151–157.
[https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00459-4](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00459-4)
- Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Akima, H., 1978. A Method of Bivariate Interpolation and Smooth Surface Fitting for Irregularly Distributed Data Points. *ACM Trans. Math. Softw.* 4, 148–159.
<https://doi.org/10.1145/355780.355786>
- Allen, B.J., Levinton, J.S., 2014. Sexual selection and the physiological consequences of habitat choice by a fiddler crab. *Oecologia* 176, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3002-y>
- Alongi, D.M., 2014. Carbon Cycling and Storage in Mangrove Forests. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 6, 195–219. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135020>
- Alongi, D.M., 2009. *The Energenics of Mangrove Forests*, Springer.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Alongi, D.M., 2008. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76, 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.024>
- Alongi, D.M., 1994. Zonation and seasonality of benthic primary production and community respiration in tropical mangrove forests. *Oecologia* 98, 320–327.
<https://doi.org/10.1007/BF00324220>
- Alongi, D.M., Pfitzner, J., Trott, L.A., Tirendi, F., Dixon, P., Klumpp, D.W., 2005. Rapid sediment accumulation and microbial mineralization in forests of the mangrove *Kandelia candel* in the Jiulongjiang Estuary, China. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 63, 605–618.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2005.01.004>
- Amaral, V., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009a. RNA/DNA ratio of crabs as an indicator of mangrove habitat quality. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 19, S56–S62.
<https://doi.org/10.1002/aqc>
- Amaral, V., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009b. Effects of vegetation and sewage load on mangrove crab condition using experimental mesocosms. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.07.007>
- Analuddin, K., Sharma, S., Jamili, X., Septiana, A., Sahidin, I., Rianse, U., Nadaoka, K., 2017. Heavy metal bioaccumulation in mangrove ecosystem at the coral triangle ecoregion, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Mar. Pollut. Bull.* 0–1.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.065>
- Andretta, A., Fusi, M., Cameldi, I., Cimò, F., Carnicelli, S., Cannicci, S., 2014. Mangrove carbon sink. Do burrowing crabs contribute to sediment carbon storage? Evidence from a Kenyan mangrove system. *J. Sea Res.* 85, 524–533.
<https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.08.010>
- Anger, K., 2001. The biology of decapod crustacean larvae, in: Vonk, R. (Ed.), *Crustacean Issues*. Tokyo, pp. 1–420. [https://doi.org/10.1651/0278-0372\(2005\)025](https://doi.org/10.1651/0278-0372(2005)025)
- Anger, K., 1996. Salinity tolerance of the larvae and first juveniles of a semiterrestrial grapsid crab, *Armases miersii* (Rathbun). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 202, 205–223.
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(96\)00022-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(96)00022-6)
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism,

- and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Babinchak, J.A., Goldmintz, D., Richards, G.P., 1982. A comparative study of autochthonous bacterial flora on the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*, and its environment. *Fish. Bull.* 80, 884–890.
- Baird, D.J., Brown, À.S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira, M., Schulz, À.À.R., Scott, G.I., 2007a. In Situ – Based Effects Measures : Determining the Ecological Relevance of Measured Responses. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 259–267.
- Baird, D.J., Burton, À.G.A., Culp, J.M., Maltby, L., 2007b. Summary and Recommendations from a SETAC Pellston Workshop on In Situ Measures of Ecological Effects. *Integr. Environ. Assess. Manag.* — 3, 275–278.
- Bamber, S.D., Depledge, M.H., 1997. Responses of shore crabs to physiological challenges following exposure to selected environmental contaminants. *Aquat. Toxicol.* 40, 79–92. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00040-4)
- Baquero, F., Martínez, J.L., Cantón, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Barbier, E.B., 2016. The protective service of mangrove ecosystems: A review of valuation methods. *Mar. Pollut. Bull.* 109, 676–681. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.033>
- Barbier, E.B., 2015. The protective service of mangrove ecosystems: A review of valuation methods. *Marine Pollution Bulletin special issue: “Turning the tide on mangrove loss.”* *Mar. Pollut. Bull.* 109, 676–681. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.033>
- Barbieri, E., 2010. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture* 306, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.009>
- Barbieri, E., Doi, S.A., 2011. The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the Pink Shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 44, 251–263. <https://doi.org/10.1080/10236244.2011.617606>
- Barbieri, E., Paes, E.T., 2011. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to

- evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. *Chemosphere* 84, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.092>
- Barja, G., 2007. Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies. *Rejuvenation Res.* 10, 215–224. <https://doi.org/10.1089/rej.2006.0516>
- Barra, J.A., Pequeux, A., Humbert, W., 1983. A Morphological-Study on Gills of a Crab Acclimated To Fresh-Water. *Tissue Cell* 15, 583–596. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(83\)90009-5](https://doi.org/10.1016/0040-8166(83)90009-5)
- Bartolini, F., Cimò, F., Fusi, M., Dahdouh-Guebas, F., Lopes, G.P., Cannicci, S., 2011. The effect of sewage discharge on the ecosystem engineering activities of two East African fiddler crab species: Consequences for mangrove ecosystem functioning. *Mar. Environ. Res.* 71, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.10.002>
- Bartolini, F., Penha-Lopes, G., Limbu, S., Paula, J., Cannicci, S., 2009. Behavioural responses of the mangrove fiddler crabs (*Uca annulipes* and *U. inversa*) to urban sewage loadings : Results of a mesocosm approach. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1860–1867. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.07.019>
- Bateman, K.S., Stentiford, G.D., 2017. A taxonomic review of viruses infecting crustaceans with an emphasis on wild hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 147, 86–110. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.010>
- Baylon, J., Suzuki, H., 2007. Effects of changes in salinity and temperature on survival and development of larvae and juveniles of the crucifix crab *Charybdis feriatus* (Crustacea:Decapoda:Portunidae). *Aquaculture* 269, 390–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.024>
- Beaulieu, M., Costantini, D., 2014. Biomarkers of oxidative status: Missing tools in conservation physiology. *Conserv. Physiol.* 2, 1–16. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou014>
- Beaulieu, M., Thierry, A.M., González-Acunã, D., Polito, M.J., 2013. Integrating oxidative ecology into conservation physiology. *Conserv. Physiol.* 1, 1–6. <https://doi.org/10.1093/conphys/cot004>
- Beck, M.W., Heck, K.L., Able, K.W., Childers, D.L., Eggleston, D.B., Gillanders, B.M.,

- Halpern, B., Hays, C.G., Hoshino, K., Minello, T.J., Orth, R.J., Sheridan, P.F., Weinstein, M.P., 2001. The Identification, Conservation, and Management of Estuarine and Marine Nurseries for Fish and Invertebrates. *Bioscience* 51, 633.
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0633:TICAMO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0633:TICAMO]2.0.CO;2)
- Beckman, J., Koppenol, W., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271, C1424–C1437.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.277>
- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Bell, G.W., Eggleston, D.B., 2005. Species-specific avoidance responses by blue crabs and fish to chronic and episodic hypoxia. *Mar. Biol.* 146, 761–770.
<https://doi.org/10.1007/s00227-004-1483-7>
- Berry, A.J., 1963. Faunal zonation in mangrove swamps. *Bull. Natl. museum State Singapore* 32, 90–98.
- Berti, R., Cannicci, S., Fabbroni, S., Innocenti, G., 2008. Notes on the structure and the use of *Neosarmatium meinerti* and *Cardisoma carnifex* burrows in a kenyan mangrove swamp (decapoda brachyura). *Ethol. Ecol. Evol.* 20, 101–113.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2008.9522531>
- Biles, C.L., Paterson, D.M., Ford, R.B., Solan, M., Raffaelli, D.G., 2002. Bioturbation, ecosystem functioning and community structure. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 6, 999–1005.
<https://doi.org/10.5194/hess-6-999-2002>
- Biliński, T., Krawiec, Z., Liczmański, A., Litwińska, J., 1985. Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction in vivo? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 533–539.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90449-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)90449-8)
- Birch, G., Nath, B., Chaudhuri, P., 2015. Effectiveness of remediation of metal-contaminated mangrove sediments (Sydney estuary, Australia). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 6185–6197. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3830-7>
- Blewett, T.A., Wood, C.M., 2015. Low salinity enhances NI-mediated oxidative stress and sub-lethal toxicity to the green shore crab (*Carcinus maenas*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*

122, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.019>

- Bonier, F., Martin, P.R., Moore, I.T., Wingfield, J.C., 2009. Do baseline glucocorticoids predict fitness? *Trends Ecol. Evol.* 24, 634–642.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.04.013>
- Boonsong, K., Piyatiratitivorakul, S., Patanaponpaiboon, P., 2003. Potential use of mangrove plantation as constructed wetland for municipal wastewater treatment, in: *Water Science and Technology*. pp. 257–266.
- Boshe, J.I., 1982. Predation of fiddler crabs *Uca stenodactyla* (Ocypodidae) by the common shore birds in Pangani Beach, Tanzania. *Afr. J. Ecol.* 20, 237–240.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.1982.tb00299.x>
- Bosire, J.O., Dahdouh-Guebas, F., Kairo, J.G., Cannicci, S., Koedam, N., 2004. Spatial variations in macrobenthic fauna recolonisation in a tropical mangrove bay. *Biodivers. Conserv.* 13, 1059–1074. <https://doi.org/10.1023/B:BIOC.0000018149.88212.2d>
- Bosire, J.O., Dahdouh-Guebas, F., Walton, M., Crona, B.I., Lewis, R.R., Field, C., Kairo, J.G., Koedam, N., 2008. Functionality of restored mangroves: A review. *Aquat. Bot.* 89, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.03.010>
- Bouchard, J.-M., 2009. Crabes de Mangrove. Etude systématique réalisée sur le site de Malamani (Mayotte). Résultats préliminaires de la mission d’inventaire des Crustacés Décapodes de Mayotte. Rapport K UW/DAF réalisé dans le cadre du projet "Mangrove et bioremédiation. Un proje.
- Bouchard, J.-M., Poupin, J., Cleva, R., Dumas, J., Dinhut, V., 2013. Land, mangrove and freshwater decapod crustaceans of Mayotte region (Crustacea Decapoda). *Atoll Res. Bull.* 592, 1–69.
- Bouchez, A., Pascault, N., Chardon, C., Bouvy, M., Cecchi, P., Lambs, L., Herteman, M., Fromard, F., Got, P., Leboulanger, C., 2013. Mangrove microbial diversity and the impact of trophic contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 66, 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.015>
- Bouillon, S., Koedam, N., Raman, A. V., Dehairs, F., 2002. Primary producers sustaining macro-invertebrate communities in intertidal mangrove forests. *Oecologia* 130, 441–448.
<https://doi.org/10.1007/s004420100814>

- Bouillon, S., Moens, T., Overmeer, I., Koedam, N., Dehairs, F., 2004. Resource utilization patterns of epifauna from mangrove forests with contrasting inputs of local versus imported organic matter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 278, 77–88.
<https://doi.org/10.3354/meps278077>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., 2013. Glutathione Peroxidases. *Biochim. bBophysica Acta* 1830, 3289–3303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Brodie, R.J., Behum, M.E., Monroe, E., Glenn, N., Staton, J.L., 2005. Recruitment to adult habitats following marine planktonic development in the fiddler crabs, *Uca pugilator*, *U. pugnax*, and *U. minax*. *Mar. Biol.* 147, 105–111. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1557-1>
- Brown-Peterson, A.N.J., Manning, C.S., Patel, V., Denslow, N.D., Brouwer, M., Brown-peterson, N.J., Manning, C.S., Patel, V., Denslow, N.D., Brouwer, M., 2008. Effects of Cyclic Hypoxia on Gene Expression and Reproduction in a Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio* 214, 6–16.
- Brown, J.H., Buchanan, J.S., Whitley, J.E., 1988. Uptake and Excretion of Inorganic Mercury in the Lobster *Homarus Gammarus* (L.) White 1847: Long-Term Effects of Exposure to Low-Levels of the Metal. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 15, 125–141.
- Bruto, M., Labreuche, Y., James, A., Piel, D., 2018. Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations. *ISME J.*
<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0245-3>
- Bui, T.H.H., Lee, S.Y., 2014. Does “you are what you eat” apply to mangrove grapsid crabs? *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089074>
- Burggren, W.W., McMahon, B.R., Costerton, J.W., 1974. Branchial water- and blood-flow patterns and the structure of the gill of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Can. J. Zool.* 52, 1511–1518.
- Buřič, M., Kouba, A., Máchová, J., Mahovská, I., Kozák, P., 2013. Toxicity of the organophosphate pesticide diazinon to crayfish of differing age. *Int. J. Environ. Sci.*

Technol. 10, 607–610. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0185-4>

- Burnett, L.E., Holman, J.D., Jorgensen, D.D., Ikerd, J.L., Burnett, K.G., 2006. Immune defense reduces respiratory fitness in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab. *Biol. Bull.* 211, 50–57. <https://doi.org/10.2307/4134577>
- Burton, G.A., Greenberg, M.S., Rowland, C.D., Irvine, C.A., Lavoie, D.R., Brooker, J.A., Moore, L., Raymer, D.F.N., McWilliam, R.A., 2005. In situ exposures using caged organisms: A multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environ. Pollut.* 134, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.008>
- Busch, D.S., Hayward, L.S., 2009. Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biol. Conserv.* 142, 2844–2853. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.08.013>
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79–110. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000455>
- Camilleri, J., 1989. Leaf choice by crustaceans in a mangrove forest in Queensland. *Mar. Biol.* 102, 453–459. <https://doi.org/10.1007/BF00438346>
- Candas, D., Li, J.J., 2014. MnSOD in Oxidative Stress Response-Potential Regulation *via* Mitochondrial Protein Influx. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1599–1617. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5305>
- Cannicci, S., Bartolini, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., Litulo, C., Macia, A., Mrabu, E.J., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009. Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.021>
- Cannicci, S., Burrows, D., Fratini, S., Smith III, T.J., Offenberg, J., Dahdouh-guebas, F., 2008. Faunal impact on vegetation structure and ecosystem function in mangrove forests: A review. *Aquat. Bot.* 89, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.01.009>
- Cannicci, S., Fratini, S., Vannini, M., 1999. Short-range homing in fiddler crabs (Ocypodidae, genus *Uca*): A homing mechanism not based on local visual landmarks. *Ethology* 105, 867–880. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.1999.00453.x>
- Cannicci, S., Fusi, M., Cimó, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., 2018. Interference

- competition as a key determinant for spatial distribution of mangrove crabs. *BMC Ecol.* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12898-018-0164-1>
- Cannicci, S., Ritossa, S., Ruwa, R.K., Vannini, M., 1996a. Tree fidelity and hole fidelity in the tree crab *Sesarma leptosoma* (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 196, 299–311. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00136-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00136-0)
- Cannicci, S., Ruwa, R.K., Ritossa, S., Vannini, M., 1996b. Branch-fidelity in the tree crab *Sesarma leptosoma* (Decapoda, Grapsidae). *J. Zool.* 238, 795–801.
- Capdeville, C., 2018. Évaluation des capacités de résistance et de résilience de l'écosystème mangrove en réponse à des apports d' eaux usées domestiques prétraitées. Université de Toulouse.
- Capdeville, C., Abdallah, K., Buffan-Dubau, E., Lin, C., Azemar, F., Lambs, L., Fromard, F., Rols, J.-L., Leflaive, J., 2018. Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. *Mar. Pollut. Bull.* 129, 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.035>
- Capparelli, M. V., Abessa, D.M., McNamara, J.C., 2016. Effects of metal contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 185–186, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.004>
- Carlén, A., Olafsson, E., 2002. The effect of the gastropod *Terebralia palustris* on infaunal communities in a mangrove forest in East Africa. *Wetl. Ecol. Manag.* 10, 303–311.
- Caruso, G., La Ferla, R., Azzaro, M., Zoppini, A., Marino, G., Petochi, T., Corinaldesi, C., Leonardi, M., Zaccone, R., Fonda, S., Caroppo, C., Monticelli, L., Azzaro, F., Decembrini, F., Maimone, G., Cavallo, R., Stabili, L., Todorova, N., Karamfilov, V., Rastelli, E., Cappello, S., Acquaviva, M.I., Narracci, M., De Angelis, R., Del Negro, P., Latini, M., Danovaro, R., 2016. Microbial assemblages for environmental quality assessment: Knowledge, gaps and usefulness in the European marine strategy framework directive. *Crit. Rev. Microbiol.* 42. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1087380>
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>

- Cerezo Valverde, J., Aguado-Giménez, F., Dolores Hernández, M., García García, B., 2012. Oxygen Consumption Response to Gradual Hypoxia in Spider Crab, *Maja brachydactyla*: Critical and Lethal Oxygen Saturations and Recovery Ability. J. World Aquac. Soc. 43, 433–441. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00564.x>
- Chabanet, P., 2002. Coral reef fish communities of Mayotte (western Indian Ocean) two years after the impact of the 1998 bleaching event. Mar. Freshw. Res. 53, 107–113.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Towle, D., 2009. Osmotic and Ionic Regulation in Aquatic Arthropods, in: Evans, D.H. (Ed.), Osmotic and Ionic Regulation Cells and Animals. Taylor and Francis, London, pp. 165–230.
- Charmantier, G., Haond, C., Lignot, J., Charmantier-Daures, M., 2001. Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: a review in homarid lobsters. J. Exp. Biol. 204, 967–77.
- Charmantier, G., Thuet, P., Charmantier-Daures, M., 1984. La régulation osmotique et ionique chez le Homard européen *Homarus gammarus* (L.) (Crustacea, Decapoda). J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 76, 191–199.
- Chen, J.-C., Lin, C.-Y., 1991. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp. 100, 477–482. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90026-P](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90026-P)
- Chen, J.C., Lai, S.H., 1992. Oxygen consumption and ammonia nitrogen excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia. Comp. Biochem. Physiol. c Comp. Pharmacol. Toxicol. 102, 129–133.
- Chen, J.C., Lin, C.Y., 1992a. Effect of ammonia on growth of *Penaeus penicillatus* juveniles. Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp. 101, 443–447. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90067-H](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90067-H)
- Chen, J.C., Lin, C.Y., 1992b. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity levels. Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp. 102, 287–291. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90054-B](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90054-B)
- Chittó, A.L.F., Schein, V., Etges, R., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2009. Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. Invertebr. Biol. 128, 261–268.

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2009.00173.x>

- Chmura, G.L., Anisfeld, S.C., Cahoon, D.R., Lynch, J.C., 2003. Global carbon sequestration in tidal, saline wetland soils. *Global Biogeochem. Cycles* 17.
<https://doi.org/10.1029/2002GB001917>
- Choi, H.J., Kwon, H.C., Jung, H.J., Kang, Y.J., 2018. Survey of viral and bacterial pathogens in ornamental aquatic crustaceans imported into South Korea. *Aquaculture* 495, 668–674. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.012>
- Christy, J.H., 1982. Burrow structure and use in the sand fiddler crab, *Uca pugilator* (Bosc). *Anim. Behav.* 30, 687–694.
- Christy, J.H., Salmon, M., 1984. Ecology and Evolution of Mating Systems of Fiddler Crabs (Genus *Uca*). *Biol. Rev.* 59, 483–509. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1984.tb00412.x>
- Cieluch, U., Charmantier, G., Grousset, E., Charmantier-Daures, M., Anger, K., 2005. Osmoregulation, immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase, and ultrastructure of branchial epithelia in the developing brown shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiol. Biochem. Zool.* 78, 1017–1025. <https://doi.org/10.1086/432856>
- Clanton, T.L., 2007. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 102, 2379–2388. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01298.2006>
- Clarke, P.J., Kerrigan, R.A., 2002. The effects of seed predators on the recruitment of mangroves. *J. Ecol.* 90, 728–736. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2002.00705.x>
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- Coelho de Faria, S., Augusto, A.S., McNamara, J.C., 2011. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: A phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 181, 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0522-6>
- Compere, P., Wanson, S., Pequeux, A., Gilles, R., Goffinet, G., 1989. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. *Tissue Cell* 21, 299–318. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(89\)90073-6](https://doi.org/10.1016/0040-8166(89)90073-6)

- Connon, R.E., Geist, J., Werner, I., 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors (Switzerland)* 12, 12741–12771. <https://doi.org/10.3390/s120912741>
- Cooke, S.J., Sack, L., Franklin, C.E., Farrell, A.P., Beardall, J., Wikelski, M., Chown, S.L., 2013. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conserv. Physiol.* 1, 1–23. <https://doi.org/10.1093/conphys/cot001>
- Copeland, D.E., Fitzjarrell, A.T., 1968. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* rathbun) with notes on modified mitochondria. *Zeitschrift für Zellforsch.* 92, 1–22. <https://doi.org/10.1007/BF00339398>
- Correia, A.D., Costa, M.H., Luis, O.J., Livingstone, D.R., 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 289, 83–101. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00040-6)
- Costantini, D., 2008. Oxidative stress in ecology and evolution: Lessons from avian studies. *Ecol. Lett.* 11, 1238–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01246.x>
- Crane, J., 1975. Fiddler crabs of the world, Ocypodidae: Genus *Uca*. Princeton University Press. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(78\)90130-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(78)90130-6)
- Cundell, A.M., Brown, M.S., Stanford, R., Mitchell, R., 1979. Microbial degradation of *Rhizophora mangle* leaves immersed in the sea. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 9, 281–286. [https://doi.org/10.1016/0302-3524\(79\)90041-0](https://doi.org/10.1016/0302-3524(79)90041-0)
- Dahdouh-Guebas, F., Giuggioli, M., Oluoch, A., Vannini, M., Cannicci, S., 1999. Feeding habits of non-Ocypidid crabs from two mangrove forests in Kenya. *Bull. Mar. Sci.* 64, 291–297.
- Dahdouh-Guebas, F., Hettiarachchi, S., Lo Seen, D., Batelaan, O., Sooriyarachchi, S., Jayatissa, L.P., Koedam, N., 2005a. Transitions in ancient inland freshwater resource management in Sri Lanka affect biota and human populations in and around coastal lagoons. *Curr. Biol.* 15, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.053>
- Dahdouh-Guebas, F., Jayatissa, L.P., Di Nitto, D., Bosire, J.O., Lo Seen, D., Koedam, N., 2005b. Erratum: How effective were mangroves as a defence against the recent tsunami? (*Current Biology* (2005) 15 (R443-R447)). *Curr. Biol.* 15, 1337–1338.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.025>

- Dahdouh-Guebas, F., Verneirt, M., Cannicci, S., Kairo, J.G., Tack, J.F., Koedam, N., 2002. An exploratory study on grapsid crab zonation in Kenyan mangroves. *Wetl. Ecol. Manag.* 10, 179–187. <https://doi.org/10.1023/A:1020133110407>
- Dahdouh-Guebas, F., Verneirt, M., Tack, J.F., Koedam, N., 1997. Food preferences of *Neosarmatium meinerti* de Man (Decapoda: Sesarminae) and its possible effect on the regeneration of mangroves. *Hydrobiologia* 347, 83–89. <https://doi.org/10.1023/a:1003015201186>
- Dahdouh-Guebas, F., Verneirt, M., Tack, J.F., Van Speybroeck, D., Koedam, N., 1998. Propagule predators in Kenyan mangroves and their possible effect on regeneration. *Mar. Freshw. Res.* 49, 345–350. <https://doi.org/doi:10.1071/MF97108>
- Danielsen, F., Sørensen, M.K., Olwig, M.F., Selvam, V., Parish, F., Burgess, N.D., Hiraishi, T., Karunakaran, V.M., Rasmussen, M.S., Hansen, L.B., Quarto, A., Suryadiputra, N., 2005. The Asian tsunami: a protective role for coastal vegetation. *Science* 310, 643. <https://doi.org/10.1126/science.1118387>
- Das, T., Stickle, W.B., 1994. Detection and avoidance of hypoxic water by juvenile *Callinectes sapidus* and *C. similis*. *Mar. Biol.* 120, 593–600. <https://doi.org/10.1007/BF00350080>
- Davie, P.J.F., 2003. A new species of *Perisesarma* (Crustacea: Brachyura: Sesarminidae) from the bay of bengel. *Raffles Bull. Zool.* 51, 387–391.
- Davies, K.J., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895–9901.
- Dawson, T.L., Gores, G.J., Nieminen, a L., Herman, B., Lemasters, J.J., 1993. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 264, C961-7.
- De la Iglesia, H.O., Rodríguez, E.M., Dezi, R.E., 1994. Burrow plugging in the crab *Uca uruguayensis* and its synchronization with photoperiod and tides. *Physiol. Behav.* 55, 913–919. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90079-5)
- de Vienne, D.M., 2016. Lifemap: Exploring the Entire Tree of Life. *PLoS Biol.* 14, e2001624. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001624>

- De Vries, M.C., Wolcott, D. I., Holliday, C.W., 1994. High ammonia and low pH in the urine of the ghost crab, *Ocypode quadrata*. Biol. Bull. 186, 342–348.
<https://doi.org/10.2307/1542280>
- Dean, R.T., Giese, S., Davies, M.J., 1993. Reactive oxygen species and their accumulation on radical-damaged proteins. Trends Biochem. Sci. 18, 437–441.
- Delignette-Muller, M.L., Forfait, C., Billoir, E., Charles, S., 2011. A new perspective on the Dunnett procedure: Filling the gap between NOEC/LOEC and ECx concepts. Environ. Toxicol. Chem. 30, 2888–2891. <https://doi.org/10.1002/etc.686>
- Depledge, M.H., 1984. Disruption of circulatory and respiratory activity in shore crabs (*Carcinus maenas* (L.)) exposed to heavy metal pollution. Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp. 78, 445–459. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(84\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(84)90113-0)
- Dias, D.F.C., Von Sperling, M., 2017. Solar radiation (PAR, UV-A, UV-B) penetration in a shallow maturation pond operating in a tropical climate. Water Sci. Technol. 76, 182–191. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.203>
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. Science (80-.). 321, 926–929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 1995. Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. Oceanogr. Mar. Biol. - an Annu. Rev. 33, 245–303.
- Ding, Z., Tang, J., Xue, H., Li, J., Ren, Q., Gu, W., Meng, Q., Wang, W., 2014. Quantitative detection and proliferation dynamics of a novel *Spiroplasma eriocheiris* pathogen in the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*. J. Invertebr. Pathol. 115, 51–54.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.012>
- Dissanayake, A., Galloway, T.S., Jones, M.B., 2008. Physiological responses of juvenile and adult shore crabs *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) to pyrene exposure. Mar. Environ. Res. 66, 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.07.006>
- Dittmar, T., Hertkorn, N., Kattner, G., Lara, R.J., 2006. Mangroves, a major source of dissolved organic carbon to the oceans. Global Biogeochem. Cycles 20, 1–7.
<https://doi.org/10.1029/2005GB002570>
- Dodd, M.C., 2012. Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation

- of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *J. Environ. Monit.* 14, 1754–1771. <https://doi.org/10.1039/c2em00006g>
- Donato, D.C., Kauffman, J.B., Murdiyarso, D., Kurnianto, S., Stidham, M., Kanninen, M., 2011. Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. *Nat. Geosci.* 4, 293–297. <https://doi.org/10.1038/ngeo1123>
- Drinan, J.E., Spellman, F., 2012. *Water and Wastewater Treatment: a Guide for the Nonengineering Professional*. CRC Press.
- Duarte, T.L., Lunec, J., 2005. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic. Res.* 39, 671–686. <https://doi.org/10.1080/10715760500104025>
- Duke, N.C., Meynecke, J.-O., Dittmann, S., Ellison, A.M., Anger, K., Berger, U., Cannicci, S., Diele, K., Ewel, K.C., Field, C.D., Koedam, N., Lee, S.Y., Marchand, C., Nordhaus, I., Dahdouh-Guebas, F., 2007. A World Without Mangroves? *Science* (80-.). 317, 41–42. <https://doi.org/10.1126/science.317.5834.41b>
- Dutra, F.M., Forneck, S.C., Brazão, C.C., Freire, C.A., Ballester, E.L.C., 2016. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Aquaculture* 453, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.038>
- Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K., Widdicombe, S., 2011. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1209–1222. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.017>
- Ellison, J.C., 2015. Vulnerability assessment of mangroves to climate change and sea-level rise impacts. *Wetl. Ecol. Manag.* 23, 115–137. <https://doi.org/10.1007/s11273-014-9397-8>
- Emmerson, W.D., 2001. Aspects of the population dynamics of *Neosarmatium meinerti* at Mgazana, a warm temperate mangrove swamp in the East Cape, South Africa, investigated using an indirect method. *Hydrobiologia* 449, 221–229.
- Emmerson, W.D., 1994. Seasonal Breeding Cycles and Sex Ratios of Eight Species of Crabs from Mgazana, a Mangrove Estuary in Transkei, Southern Africa. *J. Crustac. Biol.* 14,

568. <https://doi.org/10.2307/1549002>

- Emmerson, W.D., McGwynne, L.E., 1992. Feeding and assimilation of mangrove leaves by the crab *Sesarma meinerti* de Man in relation to leaf-litter production in Mgazana, a warm-temperate southern African mangrove swamp. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 157, 41–53. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90073-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90073-J)
- Espinosa, F., Rivera-Ingraham, G.A., 2016. Subcellular evidences of redox imbalance in well-established populations of an endangered limpet. Reasons for alarm? *Mar. Pollut. Bull.* 109, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.019>
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research.* <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
- Fanjul-Moles, M.L., Gonsebatt, M.E., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Systems In Crustacean Life Cycles, in: Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. (Eds.), *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems.* Abele, Doris, Oxford, pp. 208–223.
- Farrelly, C., Greenaway, P., 1987. The morphology and vasculature of the lungs and gills of the soldier crab, *Mictyris longicarpus*. *J. Morphol.* 193, 285–304. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051930307>
- Farrelly, C.A., Greenaway, P., 2005. The morphology and vasculature of the respiratory organs of terrestrial hermit crabs (*Coenobita* and *Birgus*): Gills, branchiostegal lungs and abdominal lungs. *Arthropod Struct. Dev.* 34, 63–87. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.11.002>
- Farrelly, C.A., Greenaway, P., 1994. Gas exchange through the lungs and gills in air-breathing crabs. *J. Exp. Biol.* 187, 113–130.
- Farrelly, C.A., Greenaway, P., 1993. Land crabs with smooth lungs: Grapsidae, Gecarcinidae, and Sundathelphusidae ultrastructure and vasculature. *J. Morphol.* 215, 245–260. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052150306>
- Farrelly, C.A., Greenaway, P., 1992a. The morphology and vasculature of the lungs and gills of the soldier crab, *Mictyris longicarpus*. *J. Morphol.* 3.
- Farrelly, C.A., Greenaway, P., 1992b. Morphology and ultrastructure of the gills of terrestrial crabs (Crustacea, Gecarcinidae and Grapsidae): adaptations for air-breathing.

Zoomorphology 112, 39–49.

- Farzana, S., Chen, J., Pan, Y., Wong, Y. shan, Tam, N.F.Y., 2016. Antioxidative response of *Kandelia obovata*, a true mangrove species, to polybrominated diphenyl ethers (BDE-99 and BDE-209) during germination and early growth. *Mar. Pollut. Bull.*
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.041>
- Felder, D.L., 1978. Osmotic and Ionic Regulation in Several Western Atlantic Callianassidae (Crustacea , Decapoda, Thalassinidea). *Biol. Bull.* 154, 409–429.
- Ferreira, T.O., Otero, X.L., Vidal-Torrado, P., Macías, F., 2007. Effects of bioturbation by root and crab activity on iron and sulfur biogeochemistry in mangrove substrate. *Geoderma* 142, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.07.010>
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Fisher, J.M., 1972. Fine-structural observations on the gill filaments of the freshwater crayfish. *Tissue and Cell* 4, 287–299.
- Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., Fenwick, J.C., 1983. Ca²⁺-dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes-I. Identification of Ca²⁺-activated ATPase activities with non-specific phosphatase activities. *Comp. Biochem. Physiol. B* 76, 745–754. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90388-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90388-7)
- Flores, A.A.V., Paula, J., Dray, T., 2003. First zoeal stages of grapsoid crabs (Crustacea: Brachyura) from the East African coast. *Zool. J. Linn. Soc.* 137, 355–383.
<https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00054.x>
- Flores, A.A. V, Saraiva, J., Paula, J., 2002. Sexual maturity, reproductive cycles, and juvenile recruitment of *Perisesarma guttatum* (Brachyura, Sesarmidae) at Ponta Rasa mangrove swamp, Inhaca island, Mozambique. *J. Crustac. Biol.* 22, 143–156.
[https://doi.org/10.1651/0278-0372\(2002\)022\[0143:SMRCAJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1651/0278-0372(2002)022[0143:SMRCAJ]2.0.CO;2)
- Florkin, M., 1960. Blood chemistry, in: Waterman, T.H. (Ed.), *The Physiology of Crustacea*. Academic Press, New York, pp. 367–393.
- Folke, C., Carpenter, S., Walker, B., Scheffer, M., Elmqvist, T., Gunderson, L., Holling, C.S., 2004. Regime Shifts, Resilience, and Biodiversity in Ecosystem Management. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 557–581.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105711>

- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–280. <https://doi.org/10.1897/05-257R.1>
- Forgue, J., Massabuau, J.C., Truchot, J.P., 1992. When are resting water-breathers lacking oxygen arterial oxygen? Portal pressure at the anaerobic threshold in crab. *Respir. Physiol.* 88, 247–256.
- Fratini, S., Cannicci, S., Vannini, M., 2001. Feeding clusters and olfaction in the mangrove snail *Terebralia palustris* (Linnaeus) (Potamididae: Gastropoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 261, 173–183. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00273-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00273-8)
- Fratini, S., Cannicci, S., Vannini, M., 2000. Competition and interaction between *Neosarmatium smithi* (Crustacea: Grapsidae) and *Terebralia palustris* (Mollusca: Gastropoda) in a Kenyan mangrove. *Mar. Biol.* 137, 309–316. <https://doi.org/10.1007/s002270000344>
- Fratini, S., Vannini, M., Cannicci, S., Schubart, C.D., 2005. Tree-climbing mangrove crabs: A case of convergent evolution. *Evol. Ecol. Res.* 7, 219–233.
- Fratini, S., Vigiani, V., Vannini, M., Cannicci, S., 2004. *Terebralia palustris* (Gastropoda; Potamididae) in a Kenyan mangal: Size structure, distribution and impact on the consumption of leaf litter. *Mar. Biol.* 144, 1173–1182. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1282-6>
- Freire, C.A., Onken, H., Mcnamara, J.C., 2008. A structure – function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs ☆ 151, 272–304. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.008>
- Freire, C.A., Togni, V.G., Hermes-Lima, M., 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 160, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.024>
- Freitas, R., Almeida, A., Calisto, V., Velez, C., Moreira, A., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Wrona, F.J., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., 2016. The impacts of pharmaceutical drugs under ocean acidification: New data on single and combined long-term effects of carbamazepine on *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ.* 541, 977–985.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.138>

- Friedler, E., Butler, D., Alfiya, Y., 2013. Wastewater composition, in: Larsen, T.A., Udert, K.M., Lienert, J. (Eds.), *Source Separation and Decentralization for Wastewater Management*. IWA Publishing, London, pp. 241–258.
- Frusher, S.D., Giddins, R.L., Smith III, T.J., 1994. Distribution and abundance of grapsid crabs (Grapsidae) in a mangrove estuary: Effects of sediment characteristics, salinity tolerances, and osmoregulatory ability. *Estuaries* 17, 647–654.
<https://doi.org/10.1007/BF02804642>
- Fucci, L., Oliver, C.N., Coon, M.J., Stadtman, E.R., 1983. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 1521–1525.
<https://doi.org/10.1073/pnas.80.6.1521>
- Furriel, R.P.M., Firmino, K.C.S., Masui, D.C., Faleiros, R.O., Torres, A.H., Mcnamara, J.C., 2010. Structural and biochemical correlates of Na⁺,K⁺-ATPase driven ion uptake across the posterior gill epithelium of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 313 A, 508–523.
<https://doi.org/10.1002/jez.622>
- Fusi, M., Beone, G.M., Suci, N.A., Sacchi, A., Trevisan, M., Capri, E., Daffonchio, D., Din, N., Dahdouh-Guebas, F., Cannicci, S., 2016a. Ecological status and sources of anthropogenic contaminants in mangroves of the Wouri River Estuary (Cameroon). *Mar. Pollut. Bull.* 109, 723–733. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.104>
- Fusi, M., Cannicci, S., Daffonchio, D., Mostert, B., Pörtner, H.-O., Giomi, F., 2016b. The trade-off between heat tolerance and metabolic cost drives the bimodal life strategy at the air-water interface. *Sci. Rep.* 6, 19158. <https://doi.org/10.1038/srep19158>
- Fusi, M., Giomi, F., Babbini, S., Daffonchio, D., Mcquaid, C.D., Porri, F., Cannicci, S., 2015. Thermal specialization across large geographical scales predicts the resilience of mangrove crab populations to global warming. *Oikos* 124, 784–795.
<https://doi.org/10.1111/oik.01757>
- Gagné, F., Blaise, C., André, C., 2006. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.004>

- Galloway, T.S., 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.013>
- García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, M.P., Haard, N.F., 1994. Enzymes with Peptidase and Proteinase Activity from the Digestive Systems of a Freshwater and a Marine Decapod. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1456–1461. <https://doi.org/10.1021/jf00043a013>
- Garçon, D.P., Masui, D.C., Mantelatto, F.L.M., McNamara, J.C., Furriel, R.P.M., Leone, F.A., 2007. K^+ and NH_4^+ modulate gill (Na^+ , K^+)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: Fine tuning of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 147, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.020>
- Geihs, M.A., Maciel, F.E., Vargas, M.A., Cruz, B.P., Nery, L.E.M., 2013. Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 445, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.03.019>
- Giddins, R.L., Lucas, J.S., Neilson, M.J., Richards, G.N., 1986. Feeding ecology of the mangrove crab *Neosarmatium smithi* (Crustacea: Decapoda: Sesamidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33, 147–155.
- Gilles, R., Delpire, E., 1997. Variations in salinity, osmolarity, and water availability: vertebrates and invertebrates, in: Dantzler, W.H. (Ed.), *Handbook of Comparative Physiology*. Oxford University Press, New York, pp. 1523–1586.
- Gilles, R., Péqueux, A., 1985. Ion transport in Crustacean Gills: Physiological and Ultrastructural Approaches, in: Gilles, R., Gilles-Baillien, M. (Eds.), *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation*. Proceedings in Life Sciences. Springer, pp. 136–159. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-70613-4_13
- Gillikin, D.P., De Wachter, B., Tack, J.F., 2004. Physiological responses of two ecologically important Kenyan mangrove crabs exposed to altered salinity regimes. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 301, 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.09.024>
- Gillikin, D.P., Schubart, C.D., 2004. Ecology and systematics of mangrove crabs of the genus *Perisesarma* (Crustacea: Brachyura: Sesamidae) from East Africa. *Zool. J. Linn. Soc.* 141, 435–445. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2004.00125.x>
- Gilman, E.L., Ellison, J., Duke, N.C., Field, C., 2008. Threats to mangroves from climate

- change and adaptation options: A review. *Aquat. Bot.* 89, 237–250.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.009>
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., Duke, N., 2011. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20, 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x>
- Giuliani, M.E., Regoli, F., 2014. Identification of the Nrf2-Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: Role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 150, 117–123.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.003>
- Goh, S.G., Bayen, S., Burger, D., Kelly, B.C., Han, P., Babovic, V., Gin, K.Y.H., 2017. Occurrence and distribution of bacteria indicators, chemical tracers and pathogenic vibrios in Singapore coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 114, 627–634.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.036>
- González-Ortegón, E., Pascual, E., Drake, P., 2013. Respiratory responses to salinity, temperature and hypoxia of six caridean shrimps from different aquatic habitats. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 445, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.006>
- Gorman, D., Turra, A., 2016. The role of mangrove revegetation as a means of restoring macrofaunal communities along degraded coasts. *Sci. Total Environ.* 566–567, 223–229.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.089>
- Gorokhova, E., Löf, M., Reutgard, M., Lindström, M., Sundelin, B., 2013. Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquat. Toxicol.* 127, 46–53.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.022>
- Gourbesville, P., Thomassin, B.A., 2000. Coastal environment assessment procedure for sustainable wastewater management in tropical islands: The Mayotte example. *Ocean Coast. Manag.* 43, 997–1014. [https://doi.org/10.1016/S0964-5691\(00\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0964-5691(00)00072-7)
- Greenaway, P., 1984. The relative importance of the gills and lungs in the gas exchange of amphibious crabs of the genus *Holthuisana*. *Aust. J. Zool.* 32, 1–6.
<https://doi.org/10.1071/ZO9840001>

- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 565–577. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00018-0](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00018-0)
- Guderley, H., Pörtner, H.O., 2010. Metabolic power budgeting and adaptive strategies in zoology: examples from scallops and fish. *Can. J. Zool.* 88, 753–763. <https://doi.org/10.1139/Z10-039>
- Guppy, M., Withers, P., 1999. Metabolic depression in animals: Physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Rev.* 74, 1–40. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00180.x>
- Gutiérrez, J.L., Jones, C.G., Groffman, P.M., Findlay, S.E.G., Iribarne, O.O., Ribeiro, P.D., Bruschetti, C.M., 2006. The contribution of crab burrow excavation to carbon availability in surficial salt-marsh sediments. *Ecosystems* 9, 647–658. <https://doi.org/10.1007/s10021-006-0135-9>
- Hand, S.C., Hardewig, I., 1996. Downregulation of Cellular Metabolism During Environmental Stress: Mechanisms and Implications. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 539–563. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.002543>
- Hansen, L.J., Johnson, M.L., 1999. Conservation and toxicology: Integrating the disciplines. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2121–2122. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.98323.x>
- Harada, Y., Lee, S.Y., 2016. Foraging behavior of the mangrove sesarmid crab *Neosarmatium trispinosum* enhances food intake and nutrient retention in a low-quality food environment. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 174, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.03.017>
- Hartnoll, R.G., 1975. The Grapsidae and Ocypodidae (Decapoda: Brachyura) of Tanzania. *J. Zool.* 177, 305–328. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1975.tb02235.x>
- Hartnoll, R.G., Cannicci, S., Emmerson, W.D., Fratini, S., Macia, A., Mgaya, Y., Porri, F., Ruwa, R.K., Shunula, J.P., Skov, M.W., Vannini, M., 2002. Geographic trends in mangrove crab abundance in East Africa. *Wetl. Ecol. Manag.* 10, 203–213. <https://doi.org/10.1023/A:1020123713133>

- Hartnoll, R.G., Weber, N., Régnier-Mckellar, C., Weber, S.B., 2014. Return to the land; The stages of terrestrial recruitment in land crabs. *Crustaceana* 87, 531–539.
<https://doi.org/10.1163/15685403-00003294>
- Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* (80-.). 296, 2158–2162. <https://doi.org/10.1126/science.1063699>
- Hazel, R.H., Burkhead, C.E., Huggins, D.G., 1982. Development of water quality criteria for ammonia and total residual chlorine for the protection of aquatic life in two Johnson County, Kansas streams, in: Pearson, J.G., Foster, R.B., Bishop, W.E. (Eds.), *Proceedings 5th Annual Symposium Aquatic Toxicology*. Philadelphia, pp. 381–388.
- Helmuth, B., Broitman, B.R., Blanchette, C.A., Gilman, S.E., Halpin, P., Harley, C.D.G., O'Donnell, M.J., Hofmann, G.E., Menge, B., Strickland, D., 2006. Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal zone: Implications for climate change. *Ecol. Monogr.* 76, 461–479. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(2006\)076\[0461:Mpotsi\]2.0.Co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(2006)076[0461:Mpotsi]2.0.Co;2)
- Henry, R.P., Lucu, Č., Onken, H., Weihrauch, D., 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front. Physiol.* 3, 1–33.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>
- Hermes-Lima, M., Moreira, D.C., Rivera-Ingraham, G.A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T.C., Campos, É.G., 2015. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 1122–1143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>
- Herreid, C.F., 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 67, 311–320.
- Herteman, M., 2010. Evaluation des capacités bioremédiatrices d'une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. Université Paul Sabatier - Toulouse III.
- Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L., 2011. Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol. Eng.* 37, 1283–1291.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>

- Hervio-Heath, D., Colwell, R.R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M., Pommepuy, M., 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1123–1135. <https://doi.org/doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01663.x>
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.C., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihira, M.S., 1992. Histologic biomarkers, in: Hugget, R.J., Kimerle, richard, A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. CRC Press, pp. 155–2010.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1002/047167558X.ch14>
- Hofmann, G.E., Somero, G.N., 1996. Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*: Evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination. *Mar. Biol.* 126, 65–75.
<https://doi.org/10.1007/bf00571378>
- Hogarth, P.J., 2012. *The biology of mangrove and seagrass*. Oxford Univ. Press.
<https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Holliday, C.W., Miller, D.S., 1984. Cellular mechanisms of organic anion transport in crustacean renal tissue. *Am. Zool.* 24, 275–284.
- Holling, C.S., 1973. Resilience and Stability of Ecological Systems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*
<https://doi.org/10.1146/annurev.es.04.110173.000245>
- Holmblad, T., Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111–123.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00446-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00446-3)
- Holmer, M., Kristensen, E., Banta, G., Hansen, K., Jensen, M.H., Bussawarit, N., 1994. Biogeochemical cycling of sulfur and iron in sediments of a south-east Asian mangrove, Phuket Island, Thailand. *Biogeochemistry* 26, 145–161.
<https://doi.org/10.1007/BF00002904>
- Hootsmans, M.J.M., Vermaat, J.E., Beijer, J.A.J., 1993. Periphyton density and shading in relation to tidal depth and fiddler crab activity in intertidal seagrass beds of the Banc

- d'Arguin (Mauritania). *Hydrobiologia* 258, 73–80. <https://doi.org/10.1007/BF00006187>
- Hopkin, S.P., Nott, J.A., 1980. Studies on the Digestive Cycle of the Shore Crab *Carcinus Maenas* With Special Reference To the B Cells in the hepatopancreas. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 60, 891–907.
- Huang, S., Wang, J., Yue, W., Chen, J., Gaughan, S., Lu, W., Lu, G., Wang, C., 2015. Transcriptomic variation of hepatopancreas reveals the energy metabolism and biological processes associated with molting in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Sci. Rep.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep14015>
- Hugget, R.J., Kimerle, richard, A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L., 1992. Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. CRC Press.
- Huq, A., Huq, S.A., Grimes, D.J., O'Brien, M., Chu, K.H., Capuzzo, J.M., Colwell, R.R., 1986. Colonization of the gut of the blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 586–588.
- Hyatt, G.W., Salmon, M., 1978. Combat in the Fiddler Crabs *Uca pugilator* and *U. pugnax*: A Quantitative Analysis Author. *Bahaviour* 65, 182–211.
- Igbinosa, E.O., Obi, L.C., Okoh, A.I., 2009. Occurrence of potentially pathogenic vibrios in final effluents of a wastewater treatment facility in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. *Res. Microbiol.* 160, 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.08.007>
- Innes, A.J., Taylor, E.W., 1986. The evolution of air-breathing in crustaceans: A functional analysis of branchial, cutaneous and pulmonary gas exchange. *Comp. Biochem. Physiol.* -- Part A *Physiol.* 85, 621–637. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90271-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90271-9)
- INSEE, 2017. Recensement de la population à Mayotte: 256500 habitants à Mayotte en 2017.
- Intanai, I., Taylor, E.W., Whiteley, N.M., 2009. Effects of salinity on rates of protein synthesis and oxygen uptake in the post-larvae and juveniles of the tropical prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 152, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.006>
- Isbell, F., Craven, D., Connolly, J., Loreau, M., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Bezemer, T.M., Bonin, C., Bruelheide, H., De Luca, E., Ebeling, A., Griffin, J.N., Guo, Q., Hautier, Y., Hector, A., Jentsch, A., Kreyling, J., Lanta, V., Manning, P., Meyer, S.T.,

- Mori, A.S., Naeem, S., Niklaus, P.A., Polley, H.W., Reich, P.B., Roscher, C., Seabloom, E.W., Smith, M.D., Thakur, M.P., Tilman, D., Tracy, B.F., Van Der Putten, W.H., Van Ruijven, J., Weigelt, A., Weisser, W.W., Wilsey, B., Eisenhauer, N., 2015. Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes. *Nature* 526, 574–577. <https://doi.org/10.1038/nature15374>
- Islam, M.S., Shokita, S., Naruse, T., 2002. Effects of salinity on the larval development of the semiterrestrial sesarimid mangrove crab *Neosarmatium indicum* (A. Milne Edwards) under laboratory conditions. *Crustac. Res.* 31, 1–8.
- Jager, T., Barsi, A., Hamda, N.T., Martin, B.T., Zimmer, E.I., Ducrot, V., 2014. Dynamic energy budgets in population ecotoxicology: Applications and outlook. *Ecol. Modell.* 280, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.06.024>
- Jager, T., Vandenbrouck, T., Baas, J., De Coen, W.M., Kooijman, S.A.L.M., 2010. A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicology* 19, 351–361. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0417-z>
- Jasinska, E.J., Goss, G.G., Gillis, P.L., Kraak, G.J. Van Der, Matsumoto, J., Souza, A.A. De, Giacomini, M., Moon, T.W., Massarsky, A., Gagné, F., Servos, M.R., Wilson, J., Sultana, T., Metcalfe, C.D., 2015. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Sci. Total Environ.* 530–531, 140–153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.080>
- Jeanson, M., Anthony, E.J., Dolique, F., Cremades, C., 2014. Mangrove evolution in Mayotte island, Indian Ocean: A 60-year synopsis based on aerial photographs. *Wetlands* 34, 459–468. <https://doi.org/10.1007/s13157-014-0512-7>
- Jiang, H., Yin, Y., Zhang, X., Hu, S., Wang, Q., 2009. Chasing relationships between nutrition and reproduction: A comparative transcriptome analysis of hepatopancreas and testis from *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics* 4, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2009.05.001>
- Jitthaisong, O., Dhanmanonda, P., Chunkao, K., Teejuntuk, S., 2012. Water quality from Mangrove forest: The King's royally initiated Laem Phak Bia Environmental Research and Development Project: Phetchaburi Province, Thailand. *Mod. Appl. Sci.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.5539/mas.v6n8p1>
- Joakim Larsson, D.G., Kinnberg, K., Sturve, J., Stephensen, E., Skön, M., Förlin, L., 2002.

- Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 13–20. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2139>
- Johnson, T.M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A., Finkel, T., 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11848–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11848>
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1997. Positive and Negative Effects of Organisms as Physical Ecosystem Engineers. *Ecology* 78, 1946–1957. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1997\)078\[1946:PANEOO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[1946:PANEOO]2.0.CO;2)
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Jury, S.H., Kinnison, M.T., Huntting Howell, W., Watson, W.H., 1994. The behavior of lobsters in response to reduced salinity. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 180, 23–37. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)90076-0)
- Kamimura, S., Tsuchiya, M., 2004. The effect of feeding behavior of the gastropods *Batillaria zonalis* and *Cerithideopsis cingulata* on their ambient environment. *Mar. Biol.* 144, 705–712. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1238-x>
- Kathiresan, K., Bingham, B.L., 2001. Biology of mangroves and mangroves ecosystems, *Advances in Marine Biology*.
- Kelly, M.W., Sanford, E., Grosberg, R.K., 2012. Limited potential for adaptation to climate change in a broadly distributed marine crustacean. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 349–356. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0542>
- Kent, C.P.S., McGuinness, K.A., 2006. A comparison of methods for estimating relative abundance of grapsid crabs. *Wetl. Ecol. Manag.* 14, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11273-004-5075-6>
- Khanyile, S.N., 2012. Salinity tolerance and osmoregulation in several subtropical decapods. University of Zuzuland.
- King, E.N., 1965. The oxygen consumption of intact crabs and excised gills as a function of decreased salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* 15, 93–102.

- Kinne, O., 1966. Physiological aspects of animal life in estuaries with special reference to salinity. *Neth. J. Sea Res.* 222–244.
- Kiszka, J.J., Ersts, P., Ridoux, V., 2007. Cetacean diversity around the Mozambique Channel island of Mayotte (Comoros archipelago). *J. Cetacean Res.* ... 9, 105–109.
- Kneib, R.T., Lee, S.Y., Kneib, J.P., 1999. Adult-juvenile interactions in the crabs *Sesarma* (*Perisesarma*) *bidens* and *S.* (*Holometopus*) *dehaani* (Decapoda:Grapsidae) from intertidal mangrove habitats in Hong Kong. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 234, 255–273.
[https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00149-X)
- Knopf, G.N., 1966. Observations on behavioral ecology of the fiddler crab, *Uca pugilator* (Bosc). *Crustaceana* 11, 302–306.
- Koch, V., Wolff, M., Diele, K., 2005. Comparative population dynamics of four fiddler crabs (Ocypodidae, genus *Uca*) from a North Brazilian mangrove ecosystem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 291, 177–188. <https://doi.org/10.3354/meps291177>
- Kodama, K., Horiguchi, T., 2011. Effects of hypoxia on benthic organisms in Tokyo Bay, Japan: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 215–220.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.022>
- Koenig, S., Savage, C., Kim, J.P., 2008. Non-destructive assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure by fluorimetric analysis of crab urine. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 2003–2008. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.08.010>
- Kohan, A., Badbardast, Z., Kohan, A., 2018. Effects of shrimp effluents on mudskippers (Gobiidae: Oxudercinae) in the northern Persian Gulf. *Mar. Environ. Res.* 136, 174–178.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.02.014>
- Kooijman, S. a. L.M., 2010. Dynamic Energy Budget theory for metabolic organisation : Summary of concepts of the third edition, Water. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0167>
- Krieger, J., Braun, P., Rivera, N.T., Schubart, C.D., Müller, C.H.G., Harzsch, S., 2015. Comparative analyses of olfactory systems in terrestrial crabs (Brachyura): evidence for aerial olfaction? *PeerJ* 3, e1433. <https://doi.org/10.7717/peerj.1433>
- Kristensen, E., 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J. Sea Res.* 59, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.004>

- Kristensen, E., Alongi, D.M., 2006. Control by fiddler crabs (*Uca vocans*) and plant roots (*Avicennia marina*) on carbon, iron, and sulfur biogeochemistry in mangrove sediment. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1557–1571. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.4.1557>
- Kristensen, E., Bouillon, S., Dittmar, T., Marchand, C., 2008. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. *Aquat. Bot.* 89, 201–219. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.005>
- Kristensen, E., Holmer, M., Banta, G., Jensen, M., Hansen, K., 1995. Carbon, nitrogen and sulfur cycling in sediments of the Ao Nam Bor mangrove forest, Phuket, Thailand: A review. *Phuket Mar Biol Cent Res Bull* 60, 37–64.
- Kristensen, E., Kostka, J.E., 2013. Macrofaunal Burrows and Irrigation in Marine Sediment: Microbiological and Biogeochemical Interactions, in: *Interactions Between Macro- and Microorganisms in Marine Sediments*. American Geophysical Union, pp. 125–157. <https://doi.org/10.1029/CE060p0125>
- Kristensen, E., Penha-Lopes, G., Delefosse, M., Valdemarsen, T., Quintana, C.O., Banta, G.T., 2012. What is bioturbation? the need for a precise definition for fauna in aquatic sciences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446, 285–302. <https://doi.org/10.3354/meps09506>
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 711, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016>
- Kurella, E., Kukley, M., Tyulina, O., Dobrota, D., Matejovicova, M., Mezesova, V., Boldyrev, A., 1997. Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 834, 661–665. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb52344.x>
- Kurochkin, I.O., Ivanina, A. V., Eilers, S., Downs, C.A., May, L.A., Sokolova, I.M., 2009. Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and reoxygenation in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1262–R1272. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00324.2009>
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* 8, 2715–2724. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.020>

- Laegdsgaard, P., Johnson, C., 2001. Why do juvenile fish utilise mangrove habitats. *J. Exp. Biol. Ecol.* 257, 229–253.
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Haussinger, D., 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78, 247–306. <https://doi.org/0031-9333/98>
- Lara, R.J., Neogi, S.B., Islam, M.S., Mahmud, Z.H., Islam, S., Paul, D., Demoz, B.B., Yamasaki, S., Nair, G.B., Kattner, G., 2011. *Vibrio cholerae* in waters of the Sunderban mangrove: Relationship with biogeochemical parameters and chitin in seston size fractions. *Wetl. Ecol. Manag.* 19, 109–119. <https://doi.org/10.1007/s11273-010-9204-0>
- Le Moullac, G., Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00422-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00422-1)
- Lee, S.Y., 2008. Mangrove macrobenthos: Assemblages, services, and linkages. *J. Sea Res.* 59, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.002>
- Lee, S.Y., 1998. Ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: a review. *Mar. Freshw. Res.* 49, 335–343. <https://doi.org/10.1071/MF99078>
- Lee, S.Y., 1997. Potential trophic importance of the faecal material of the mangrove sesarmine crab *Sesarma masse*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 159, 275–284. <https://doi.org/10.3354/meps159275>
- Lee, S.Y., Primavera, J.H., Dahdouh-Guebas, F., Mckee, K., Bosire, J.O., Cannicci, S., Diele, K., Fromard, F., Koedam, N., Marchand, C., Mendelssohn, I., Mukherjee, N., Record, S., 2014. Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: A reassessment. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23, 726–743. <https://doi.org/10.1111/geb.12155>
- Legeay, A., Massabuau, J.C., 2000. Effect of salinity on hypoxia tolerance of resting green crabs, *Carcinus maenas*, after feeding. *Mar. Biol.* 136, 387–396. <https://doi.org/10.1007/s002270050698>
- Leone, F.A., Lucena, M.N., Garçon, D.P., Pinto, M.R., Mcnamara, J.C., 2017. Gill Ion Transport ATPases and Ammonia Excretion in Aquatic Crustaceans, in: Weihrauch, D., Donnell, M.O. (Eds.), *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates*. Springer, pp. 61–107. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39617-0>
- Lesirma, S., 2016. Environment Impact Assessments in developing economies. *Int. J.*

Environ. Sci. 1, 41–53.

- Lesser, M.P., 2006. OXIDATIVE STRESS IN MARINE ENVIRONMENTS: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253–278.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Letourneur, Y., 1996. Réponses des peuplements et populations de poissons aux réserves marines: Le cas de l'île de Mayotte, Océan Indien occidental. *Ecoscience* 3, 442–450.
<https://doi.org/10.1080/11956860.1996.11682362>
- Leung, J.Y.S., Cai, Q., Tam, N.F.Y., 2016. Comparing subsurface flow constructed wetlands with mangrove plants and freshwater wetland plants for removing nutrients and toxic pollutants. *Ecol. Eng.* 95, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.016>
- Lewis, J.M., Costa, I., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Gamperl, A.K., Driedzic, W.R., 2007. Responses to hypoxia and recovery: repayment of oxygen debt is not associated with compensatory protein synthesis in the Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. *J. Exp. Biol.* 210, 1935–1943. <https://doi.org/10.1242/jeb.005371>
- Li, C., Gao, F., Jin, W.H., Chen, Z.S., 2011. Saline municipal wastewater treatment by constructed mangrove wetland, in: 2011 International Conference on Electronics, Communications and Control, ICECC 2011 - Proceedings. pp. 2825–2828.
<https://doi.org/10.1109/ICECC.2011.6067977>
- Li, Y., Li, Q., Zhou, K., Sun, X.L., Zhao, L.R., Zhang, Y. Bin, 2016a. Occurrence and distribution of the environmental pollutant antibiotics in Gaoqiao mangrove area, China. *Chemosphere* 147, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.107>
- Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., Diao, X., 2016b. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere* 144, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.051>
- Lignot, J.-H., Charmantier, G., 2015. Osmoregulation and excretion, in: Chang, E.S., Thiel, M. (Eds.), *The Natural History of the Crustacea. Vol 4: Physiology*. Oxford University Press, New York, pp. 249–283.
- Lignot, J.-H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans.

- Aquaculture 191, 209–245. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00429-4)
- Lin, H.C., Tsai, J.R., 2012. A shift to an ion regulatory role by gills of a semi-terrestrial crab, *Ocypode stimpsoni*. *Zool. Stud.* 51, 606–618.
- Lindquist, E.S., Carroll, C.R., 2004. Differential seed and seedling predation by crabs: Impacts on tropical coastal forest composition. *Oecologia* 141, 661–671. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1673-5>
- Ling, X.P., Zhang, Y.H., Lu, Y.H., Huang, H.Q., 2011. Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water. *Environ. Technol.* 32, 1463–1470. <https://doi.org/10.1080/09593330.2010.539272>
- Linton, S., Greenaway, P., 1997. Urate deposits in the gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis* are synthesised de novo from excess dietary nitrogen. *J. Exp. Biol.* 200, 2347–54.
- Linton, S.M., Wright, J.C., Howe, C.G., 2017. Nitrogenous Waste Metabolism Within Terrestrial Crustacea, with Special Reference to Purine Deposits and Their Metabolism, in: Weihrauch, D., O'Donnell, M. (Eds.), *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates*. Springer, pp. 25–59. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39617-0>
- Litulo, C., 2005. Population structure and reproductive biology of the fiddler crab *Uca urvillei* (Brachyura: Ocypodidae) in Maputo Bay (South Mozambique). *J. Nat. Hist.* 39, 2307–2318. <https://doi.org/10.1080/00222930502005688>
- Litulo, C., 2004. Reproductive Aspects of a Tropical Population of the Fiddler Crab *Uca annulipes* (H. Milne Edwards, 1837) (Brachyura: Ocypodidae) at Costa Do Sol Mangrove, Maputo Bay, southern Mozambique. *West. Indian Ocean J. Mar. Sci.* 3, 87–91. <https://doi.org/DOI:10.1023/B:HYDR.0000038864.38435.6a>
- Liu, X., Liu, Y., Xu, J.R., Ren, K.J., Meng, X.Z., 2016. Tracking aquaculture-derived fluoroquinolones in a mangrove wetland, South China. *Environ. Pollut.* 219, 916–923. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.011>
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia Martinez, P., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 112, 265–276.
- Lovelock, C.E., Feller, I.C., Reef, R., Ruess, R.W., 2014. Variable effects of nutrient enrichment on soil respiration in mangrove forests. *Plant Soil* 379, 135–148.

<https://doi.org/10.1007/s11104-014-2036-6>

- Lovett, D.L., Colella, T., Cannon, A.C., Lee, D.H., Evangelisto, A., Muller, E.M., Towle, D.W., 2006a. Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.* 210, 132–139.
- Lovett, D.L., Verzi, M.P., Burgents, J.E., Tanner, C.A., Glomski, K., Lee, J.J., Towle, D.W., 2006b. Expression Profiles of Na⁺, K⁺-ATPase during Acute and Chronic Hypo-osmotic Stress in the Blue Crab *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.* 211, 58–65.
- Lucu, Č., Towle, D.W., 2003. Na⁺+K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 135, 195–214. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00064-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00064-3)
- Lüddecke, F., Heß, S., Gallert, C., Winter, J., Güde, H., Löffler, H., 2015. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Res.* 69, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.018>
- Luquet, C.M., Pellerano, G., De Carlo, J., 1995. Gill Morphology and Terrestrial Adaptation in the Estuarine Crab *Uca uruguayensis Nobili*, 1901 (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana*. <https://doi.org/10.1163/156854095X02087>
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Luvizotto-Santos, R., Lee, J.T., Branco, Z.P., Bianchini, A., Nery, L.E.M., 2003. Lipids as Energy Source during Salinity Acclimation in the Euryhaline Crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 295, 200–205. <https://doi.org/10.1002/jez.a.10219>
- MacDonnell, C.P., Zhang, L., Griffiths, L., Mitsch, W.J., 2017. Nutrient concentrations in tidal creeks as indicators of the water quality role of mangrove wetlands in Southwest Florida. *Ecol. Indic.* 80, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.05.043>
- Macnae, W., Lalk, M., 1962. The Ecology of the Mangrove Swamps at Inhaca Island, Moçambique. *J. Ecol.* 50, 19–34.
- Madliger, C.L., Love, O.P., 2014. The need for a predictive, context-dependent approach to the application of stress hormones in conservation. *Conserv. Biol.* 28, 283–287.

<https://doi.org/10.1111/cobi.12185>

- Madliger, C.L., Love, O.P., Hultine, K.R., Cooke, S.J., 2018. The conservation physiology toolbox: status and opportunities. *Conserv. Physiol.* 6, coy029.
<https://doi.org/10.1093/conphys/coy029>
- Maina, J.N., 1998. Bimodal Breathing: Compromise Respiration, in: *The Gas Exchangers: Structure, Function, and Evolution of the Respiratory Processes*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 217–262. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58843-3_5
- Maina, J.N., 1990. The morphology of the gills of the freshwater African crab *Potamon niloticus* (Crustacea: Brachyura: Potamonidae): a scanning and transmission electron microscope study. *J. Zool.* 221, 499–515.
- Maina, J.N., West, J.B., 2005. Thin and Strong! The Bioengineering Dilemma in the Structural and Functional Design of the Blood-Gas Barrier. *Physiol. Rev.* 85, 811–844.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2004>
- Maitland, D.P., 1986. Crabs that breathe air with their legs - *Scopimera* and *Dotilla*. *Nature* 319, 493–495. <https://doi.org/10.1038/319493a0>
- Mantel, L.H., Farmer, L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation, in: Mantel, L.H. (Ed.), *Internal Anatomy and Physiological Regulation*. Academic Press, New York, pp. 53–161.
- Martin, M., Fehsenfeld, S., Sourial, M.M., Weihrauch, D., 2011. Effects of high environmental ammonia on branchial ammonia excretion rates and tissue Rh-protein mRNA expression levels in seawater acclimated Dungeness crab *Metacarcinus magister*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 160, 267–277.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.012>
- Martins, T.L., Chittó, A.L.F., Rossetti, C.L., Brondani, C.K., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2011. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 158, 400–405.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.023>
- Massabuau, J.-C., Eclancher, B., Dejours, P., 1980. Ventilatory reflex response to hyperoxia in the crayfish, *Astacus pallipes*. *J. Comp. Physiol. ? B* 140, 193–198.

<https://doi.org/10.1007/BF00690403>

- Matillano, B.J., Legera, A.M., Bautista, C.G., 2018. Field observations of the behavior of mangrove climbing sesarmid crabs in Anibong Bay, Tacloban City, Philippines. *J. Anim. Behav. Biometeorol.* 6, 9–13.
- Maugeri, T.L., Caccamo, D., Gugliandolo, C., 2000. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *J. Appl. Microbiol.* 89, 261–266.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01096.x>
- Mazda, Y., Magi, M., Kogo, M., Nguyen Hong, P., 1997. Mangroves as a coastal protection from waves in the Tong King Delta, Vietnam. *Mangroves Salt Marshes* 1, 127–135.
<https://doi.org/10.1023/A>
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- McGaw, I.J., Reiber, C.L., 1998. Circulatory modification in the blue crab *Callinectes sapidus*, during exposure and acclimation to low salinity. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 121, 67–76. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10103-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10103-4)
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood., C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50, 231–243.
[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00105-8)
- McGovarin, S., Sultana, T., Metcalfe, C., 2018. Biological Responses in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) Caged Downstream from Municipal Wastewater Treatment Plants in the Credit River , ON , Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 100, 106–111.
<https://doi.org/10.1007/s00128-017-2242-z>
- McLaughlin, P.A., 1983. Internal Anatomy. *Intern. Anat. Physiol. Regul.* 1–52.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-106405-1.50012-6>
- Mercky Yann, 2015. Impact des rejets d 'eaux usées sur une communauté de crabe de mangrove à Mayotte. université de Corse.
- Meziane, T., Sanabe, M.C., Tsuchiya, M., 2002. Role of fiddler crabs of a subtropical intertidal flat on the fate of sedimentary fatty acids. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 270, 191–201. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00019-9)

- Micheli, F., 1993. Feeding ecology of mangrove crabs in North Eastern Australia: mangrove litter consumption by *Sesarma messa* and *Sesarma smithii*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 171, 165–186. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(93\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90002-6)
- Micheli, F., Gherardi, F., Vannini, M., 1991. Feeding and burrowing ecology of two East African mangrove crabs. *Mar. Biol.* 111, 247–254. <https://doi.org/10.1007/BF01319706>
- Miller, E.W., Dickinson, B.C., Chang, C.J., 2010. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15681–15686. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005776107>
- Miranda, N.A.F., Perissinotto, R., Appleton, C.C., 2010. Salinity and temperature tolerance of the invasive freshwater gastropod *Tarebia granifera*. *S. Afr. J. Sci.* 106, 1–7. <https://doi.org/10.4102/sajs.v106i3/4.156>
- Mitch, W.A., Sedlak, D.L., 2002. Factors controlling nitrosamine formation during wastewater chlorination. *Water Sci. Technol. Water Supply* 2, 191–198.
- Molnar, N., Welsh, D.T., Marchand, C., Deborde, J., Meziane, T., 2013. Impacts of shrimp farm effluent on water quality, benthic metabolism and N-dynamics in a mangrove forest (New Caledonia). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 117, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.07.012>
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R., 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* 12, 75–92. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L. a., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., Soares Chaves, I., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 221–234. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.012>
- Moreira, D.C., Oliveira, M.F., Liz-Guimarães, L., Diniz-Rojas, N., Campos, É.G., Hermes-Lima, M., 2017. Current trends and research challenges regarding “preparation for oxidative stress.” *Front. Physiol.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00702>
- Moreira, D.C., Venancio, L.P.R., Sabino, M.A.C.T., Hermes-Lima, M., 2016. How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom? *Comp. Biochem.*

- Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol. 200, 64–78.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.023>
- Morgan, S.G., 1992. Predation by planktonic and benthic invertebrates on larvae of estuarine crabs. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 163, 91–110. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90149-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90149-5)
- Morris, S., 2002. The ecophysiology of air-breathing in crabs with special reference to *Gecarcoidea natalis*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 131, 559–570.
[https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00011-8)
- Morris, S., 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 204, 979–989.
- Morris, S., Adamczewska, A.M., 1996. Respiratory, acid-base and ion status during voluntary immersion of the air-breathing crab *Cardisoma carnifex* assessed in situ. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 206, 149–164. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02658-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02658-5)
- Morris, S., Ahern, M.D., 2003. Regulation of urine reprocessing in the maintenance of sodium and water balance in the terrestrial Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* investigated under field conditions. *J. Exp. Biol.* 206, 2869–2881.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00499>
- Morris, S., Greenaway, P., 1990. Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab, *Birgus latro* L. - V. The activity of carbonic anhydrase in gills and lungs. *J. Comp. Physiol. B* 160, 217–221. <https://doi.org/10.1007/BF00300957>
- Mouton, E.C., Felder, D.L., 1996. Burrow distributions and population estimates for the fiddler crabs *Uca spinicarpa* and *Uca longisignalis* in a Gulf of Mexico salt marsh. *Estuaries* 19, 51–61. <https://doi.org/10.1007/BF02690100>
- Munguia, P., Backwell, P.R.Y., Darnell, M.Z., 2017. Thermal constraints on microhabitat selection and mating opportunities. *Anim. Behav.* 123, 259–265.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.11.004>
- Nagelkerken, I., Blaber, S.J.M., Bouillon, S., Green, P., Haywood, M., Kirton, L.G., Meynecke, J.O., Pawlik, J., Penrose, H.M., Sasekumar, A., Somerfield, P.J., 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquat. Bot.* 89, 155–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.007>

- Nagelkerken, I., Van Der Velde, G., Gorissen, M.W., Meijer, G.J., Van't Hof, T., Den Hartog, C., 2000. Importance of mangroves, seagrass beds and the shallow coral reef as a nursery for important coral reef fishes, using a visual census technique. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51, 31–44. <https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0617>
- Navarrete del Toro, M. de los A., García-Carreño, F.L., Córdova-Murueta, J.H., 2011. Comparison of digestive proteinases in three penaeids. *Aquaculture* 317, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.035>
- Neri-Cruz, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., del Socorro Romero-Figueroa, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Jiménez-Vargas, J.M., SanJuan-Reyes, N., 2015. Oxidative stress in *Cyprinus carpio* induced by hospital wastewater in Mexico. *Ecotoxicology* 24, 181–193. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1371-y>
- Neufeld, G.J., Holliday, C.W., Pritchard, J.B., 1980. Salinity adaptation of gill Na, K-ATPase in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 211, 215–224. <https://doi.org/10.1002/jez.1402110210>
- Neves, C.A., Santos, E.A., Bainy, A.C.D., 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Dis. Aquat. Organ.* 39, 155–158. <https://doi.org/10.3354/dao039155>
- Nguyen, K.L., Nguyen, H.A., Richter, O., Pham, M.T., Nguyen, V.P., 2017. Ecophysiological responses of young mangrove species *Rhizophora apiculata* (Blume) to different chromium contaminated environments. *Sci. Total Environ.* 574, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.063>
- Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., Kamiya, Y., 1982. Regeneration of Vitamin E From A-Chromanoxyl Radical By Glutathione and Vitamin C. *Chem. Lett.* 11, 789–792. <https://doi.org/10.1246/cl.1982.789>
- Nobbs, M., Blamires, S.J., 2017. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Fiddler crab spatial distributions are influenced by physiological stressors independent of sympatric interactions. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 491, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.03.007>
- Nobbs, M., Blamires, S.J., 2016. Making up for lost time: Biophysical constraints on the temporal abundance of two fiddler crabs in wet-dry tropical mangroves. *Austral Ecol.* 41,

- 791–796. <https://doi.org/10.1111/aec.12365>
- Nobbs, M., Blamires, S.J., 2015. Spatiotemporal distribution and abundance of mangrove ecosystem engineers: burrowing crabs around canopy gaps. *Ecosphere* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1890/ES14-00498.1>
- Nordhaus, I., Diele, K., Wolff, M., 2009. Activity patterns, feeding and burrowing behaviour of the crab *Ucides cordatus* (Ucididae) in a high intertidal mangrove forest in North Brazil. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 374, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.04.002>
- Nudi, A.H., Wagener, A. de L.R., Francioni, E., Sette, C.B., Sartori, A. V., Scofield, A. de L., 2010. Biomarkers of PAHs exposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study. *Environ. Res.* 110, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.10.014>
- Nyomora, A.M.S., Njau, K.N., 2013. Growth response of selected mangrove species to domestic sewage and abiotic stress. *West. Indian Ocean J. Mar. Sci.* 11, 167–177.
- O'Connor, N.J., 1993. Settlement and recruitment of the fiddler crabs *Uca pugnax* and *U. pugilator* in a North Carolina, USA, salt marsh. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 93, 227–234. <https://doi.org/10.3354/meps093227>
- O'Connor, N.J., 1991. Flexibility in timing of the metamorphic molt by fiddler crab megalopae *Uca pugilator*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 68, 243–247. <https://doi.org/10.3354/meps068243>
- O'mahoney, P.M., Full, R.J., 1984. Respiration of crabs in air and water. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 79, 275–282. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(84\)90429-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90429-8)
- Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447–463. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)
- Oidtmann, B., Dixon, P., Way, K., Joiner, C., Bayley, A.E., 2017. Risk of waterborne virus spread - review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Rev. Aquac.* 641–669. <https://doi.org/10.1111/raq.12192>
- Olafsson, E., Buchmayer, S., Skov, M.W., 2002. The East African decapod crab *Neosarmatium meinerti* (de Man) sweeps mangrove floors clean of leaf litter. *Ambio* 31,

569–573.

- Oliveira, U.O. De, Araujo, A., Bello-Klein, A., Silva, R.S.M., Kucharski, L.C., 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 140, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.026>
- Oliveira, G.T., da Silva, R.S.M., 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 127, 375–381. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00274-1](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00274-1)
- Oliveira, M.F., Geihs, M.A., França, T.F.A., Moreira, D.C., Hermes-Lima, M., 2018. Is “Preparation for Oxidative Stress” a Case of Physiological Conditioning Hormesis? *Front. Physiol.* 9, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00945>
- Oliver, T.H., Isaac, N.J.B., August, T.A., Woodcock, B.A., Roy, D.B., Bullock, J.M., 2015. Declining resilience of ecosystem functions under biodiversity loss. *Nat. Commun.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms10122>
- Onken, H., McNamara, J.C., 2002. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J. Exp. Biol.* 205, 167–175.
- Ordiano, A., Alvarez, F., Alcaraz, G., 2005. Osmoregulation and oxygen consumption of the hololimnetic prawn, *Macrobrachium tuxtlaense* at varying salinities (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 78, 1013–1022. <https://doi.org/10.1163/156854005775197316>
- Oropesa, A.L., Novais, S.C., Lemos, M.F.L., Espejo, A., Gravato, C., Beltrán, F., 2016. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to effluents spiked with emerging contaminants under ozonation and advanced oxidation processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7881-9>
- Ortiz-santaliestra, M.E., Marco, A., Fernández, M.J., Lizana, M., 2006. Influence of Developmental Stage on Sensitivity To Ammonium Nitrate of Aquatic Stages of Amphibians. *Environ. Toxicol.* 25, 105–111.
- Orvain, F., Sauriau, P.G., Bacher, C., Prineau, M., 2006. The influence of sediment

- cohesiveness on bioturbation effects due to *Hydrobia ulvae* on the initial erosion of intertidal sediments: A study combining flume and model approaches. *J. Sea Res.* 55, 54–73. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2005.10.002>
- Orvain, F., Sauriau, P.G., Sygut, A., Joassard, L., Le Hir, P., 2004. Interacting effects of *Hydrobia ulvae* bioturbation and microphytobenthos on the erodibility of mudflat sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 278, 205–223. <https://doi.org/10.3354/meps278205>
- Ostadal, P., Elmoselhi, A.B., Zdobnicka, I., Lukas, A., Elimban, V., Dhalla, N.S., 2004. Role of Oxidative Stress in Ischemia–Reperfusion-Induced Changes in Na⁺,K⁺-ATPase Isoform Expression in Rat Heart. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 914–923. <https://doi.org/10.1089/ars.2004.6.914>
- Ostrensky, A., Marchiori, M.A., Poersch, L.H., 1992. Aquatic toxicity of ammonia in the metamorphosis of postlarvae *Penaeus paulensis* Perez-Farfante. *An Acad Bras Cienc* 64, 383–389.
- Ouyang, X., Guo, F., 2018. Optimal selection of mangrove paradigms for municipal wastewater treatment : an intuitionistic fuzzy analytical hierarchical processes. *Chemosphere* 197, 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.102>
- Ouyang, X., Guo, F., 2016. Paradigms of mangroves in treatment of anthropogenic wastewater pollution. *Sci. Total Environ.* 544, 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.013>
- Paine, R.T., 1969. A Note on Trophic Complexity and Community Stability. *Am. Nat.* <https://doi.org/10.1086/282586>
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2012. Effects of salinity on O₂ consumption, ROS generation and oxidative stress status of gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 155, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.08.009>
- Paoli, F., Wirkner, C.S., Cannicci, S., 2015. The branchiostegal lung of *Uca vocans* (Decapoda: Ocypodidae): Unreported complexity revealed by corrosion casting and MicroCT techniques. *Arthropod Struct. Dev.* 44, 622–629. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2015.09.006>
- Papadopoulos, I., Wooldridge, T.H., Newman, B.K., 2002. Larval life history strategies of

- sub-tropical southern African estuarine brachyuran crabs and implications for tidal inlet management. *Wetl. Ecol. Manag.* 10, 249–256.
<https://doi.org/10.1023/A:1020183931789>
- Pape, E., Muthumbi, A., Kamanu, C.P., Vanreusel, A., 2008. Size-dependent distribution and feeding habits of *Terebralia palustris* in mangrove habitats of Gazi Bay, Kenya. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76, 797–808. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.007>
- Parrilla-Taylor, D.P., Zenteno-Savín, T., 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture* 318, 379–383.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.015>
- Pastorok, R., Bilyard, G., 1985. Effects of sewage pollution on coral-reef communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 21, 175–189. <https://doi.org/10.3354/meps021175>
- Peer, N., Miranda, N.A., Perissinotto, R., 2015. A review of fiddler crabs (genus *Uca* Leach, 1814) in South Africa. *African Zool.* 50, 187–204.
<https://doi.org/10.1080/15627020.2015.1055700>
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Kristensen, E., Paula, J.J., 2009a. Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1694–1703. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.015>
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Mgaya, Y., Kristensen, E., Paula, J., 2010a. Ecosystem engineering potential of the gastropod *Terebralia palustris* (Linnaeus, 1767) in mangrove wastewater wetlands - A controlled mesocosm experiment. *Environ. Pollut.* 158, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.009>
- Penha-Lopes, G., Flindt, M.R., Ommen, B., Kristensen, E., Garret, P., Paula, J., 2012. Organic carbon dynamics in a constructed mangrove wastewater wetland populated with benthic fauna: A modelling approach. *Ecol. Modell.* 232, 97–108.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.02.005>
- Penha-Lopes, G., Kristensen, E., Flindt, M., Mangion, P., Bouillon, S., Paula, J., 2010b. The role of biogenic structures on the biogeochemical functioning of mangrove constructed wetlands sediments - A mesocosm approach. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 560–572.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.11.008>

- Penha-Lopes, G., Torres, P., Cannicci, S., Narciso, L., Paula, J., 2011. Monitoring anthropogenic sewage pollution on mangrove creeks in southern Mozambique: A test of *Palaemon concinnus* Dana, 1852 (Palaemonidae) as a biological indicator. *Environ. Pollut.* 159, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.029>
- Penha-Lopes, G., Torres, P., Narciso, L., Cannicci, S., Paula, J., 2009b. Comparison of fecundity, embryo loss and fatty acid composition of mangrove crab species in sewage contaminated and pristine mangrove habitats in Mozambique. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 381, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.08.009>
- Pequeux, 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 15, 1–60. <https://doi.org/10.1163/193724095X00578>
- Péqueux, A., Gilles, R., 1978. Osmoregulation of the Euryhaline Chinese Crab *Eriocheir Sinensis*. Ionic Transports Across Isolated Perfused Gills As Related To the Salinity of the Environment, in: *Physiology and Behaviour of Marine Organisms*. Pergamon, pp. 105–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-021548-8.50019-X>
- Péqueux, A., Gilles, R., Marshall, W.S., 1988. NaCl transport in gills and related structures, in: Greger, R. (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Springer, Berlin, pp. 2–63. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-73285-0_1
- Pereira, P., de Pablo, H., Dulce Subida, M., Vale, C., Pacheco, M., 2009. Biochemical responses of the shore crab (*Carcinus maenas*) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (Óbidos lagoon, Portugal). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1471–1480. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.12.012>
- Pereyra Lago, R., 1989. The larval development of the red mangrove crab *Sesarma meinerti* de Man (Brachyura : Grapsidae) reared in the laboratory. *South African J. Zool.* 24, 199–211.
- Pérez, A.F., Malanga, G., Puntarulo, S., 2011. Reproductive Conditions Associated To Changes in the Lipid-Soluble Antioxidant Capacity and the Damage To Lipids in the Sea Urchins *Loxechinus Albus* (Echinodermata: Echinoidea). *Rev. Mar. Cost.* 3, 183–194.
- Peterson, D.R. and R.F.L., 1974. Ultrastructure of the Crayfish Kidney. *J. Morphol.* 142(3):241.
- Pi, N., Wu, Y., Zhu, H.W., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2017. The uptake of mixed PAHs and

- PBDEs in wastewater by mangrove plants under different tidal flushing regimes. *Environ. Pollut.* 231, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.085>
- Piiper, J., 1982. Respiratory gas exchange at lungs, gills and tissues: mechanisms and adjustments. *J. Exp. Biol.* 100, 5–22.
- Pinder, A., Smits, A., 1993. The burrow microhabitat of the land crab *Cardisoma guanhumi*: Respiratory/ionic conditions and physiological responses of crabs to hypercapnia. *Physiol. Zool.* 66, 216–236.
- Pinto, L., Punchihewa, N.N., 1996. Utilisation of mangroves and seagrasses by fishes in the Negombo Estuary, Sri Lanka. *Mar. Biol.* 126, 333–345. <https://doi.org/10.1007/BF00347457>
- Pinto, M.R., Lucena, M.N., Faleiros, R.O., Almeida, E.A., McNamara, J.C., Leone, F.A., 2016. Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquat. Toxicol.* 170, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.021>
- Pischedda, L., Poggiale, J.C., Cuny, P., Gilbert, F., 2008. Imaging oxygen distribution in marine sediments. The importance of bioturbation and sediment heterogeneity. *Acta Biotheor.* 56, 123–135. <https://doi.org/10.1007/s10441-008-9033-1>
- Polidoro, B.A., Carpenter, K.E., Collins, L., Duke, N.C., Ellison, A.M., Joanna, C., Farnsworth, E.J., Fernando, E.S., Kathiresan, K., Koedam, N.E., Livingstone, S.R., Miyagi, T., Moore, G.E., Nam, V.N., Ong, J.E., Ellison, J.C., Farnsworth, E.J., Fernando, E.S., Kathiresan, K., Koedam, N.E., Livingstone, S.R., Miyagi, T., Moore, G.E., Nam, V.N., Ong, J.E., Primavera, J.H., Salmo, S.G., Sanciangco, J.C., Sukardjo, S., Wang, Y., Yong, J.W.H., 2010. The loss of species: Mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010095>
- Pörtner, H.-O., 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881–893. <https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Pörtner, H.O., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 132, 739–761.

[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4)

- Proffitt, C.E., Devlin, D.J., 2005. Grazing by the intertidal gastropod *Melampus coffeus* greatly increases mangrove leaf litter degradation rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 296, 209–218. <https://doi.org/10.3354/meps296209>
- Pryor, W.A., 1989. On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free radic* 7, 177–178. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90010-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90010-5)
- PUMPSEA, 2008. Final activity report: Peri-urban mangrove forests as filters and potential phytoremediators of domestic sewage in East Africa. Project no. INCO-CT2004-510863.
- Pusineri, C., Quillard, M., 2008. Bycatch of Protected Megafauna in the Artisanal Coastal Fishery of Mayotte Island, Mozambique Channel. *West. Indian Ocean J. Mar. Sci.* 7, 137–150. <https://doi.org/10.4314/wiojms.v7i2.48277>
- Qin, H., Ji, B., Zhang, S., Kong, Z., 2018. Study on the bacterial and archaeal community structure and diversity of activated sludge from three wastewater treatment plants. *Mar. Pollut. Bull.* 135, 801–807. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.010>
- Queiroga, H., Blanton, J., 2005. Interactions between behaviour and physical forcing in the control of horizontal transport of decapod crustacean larvae, *Advances in Marine Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(04\)47002-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(04)47002-3)
- Radhika, M., Abdul Nazar, A.K., Munuswamy, N., Nellaiappan, K., 1998. Sex-linked differences in phenol oxidase in the fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* Baird and their possible role (Crustacea: Anostraca). *Hydrobiologia* 377, 161–164. <https://doi.org/10.1023/A:1003244318887>
- Ragionieri, L., Cannicci, S., Schubart, C.D., Fratini, S., 2010. Gene flow and demographic history of the mangrove crab *Neosarmatium meinerti*: A case study from the western Indian Ocean. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 86, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.11.002>
- Ragionieri, L., Fratini, S., Schubart, C.D., 2012. Revision of the *Neosarmatium meinerti* species complex (Decapoda: Brachyura: Sesarmidae), with descriptions of three pseudocryptic Indo–West Pacific species. *Raffles Bull. Zool.* 60, 71–87.
- Ragionieri, L., Fratini, S., Vannini, M., Schubart, C.D., 2009. Phylogenetic and morphometric differentiation reveal geographic radiation and pseudo-cryptic speciation in a mangrove

- crab from the Indo-West Pacific. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 825–834.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.008>
- Ramakritinan, C.M., Kumaraguru, A.K., Balasubramanian, M.P., 2005. Impact of distillery effluent on carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology* 14, 693–707. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0019-3>
- Rameshthangam, P., Ramasamy, P., 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 254, 32–39.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.011>
- Ramnanan, C.J., Storey, K.B., 2006. Suppression of Na⁺/K⁺-ATPase activity during estivation in the land snail *Otala lactea*. *J. Exp. Biol.* 209, 677–688.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02052>
- Raw, J.L., Perissinotto, R., Miranda, N.A.F., Peer, N., 2017. Feeding dynamics of *Terebralia palustris* (Gastropoda: Potamididae) from a subtropical mangrove ecosystem. *Molluscan Res.* 0, 1–10. <https://doi.org/10.1080/13235818.2017.1323370>
- Rebelo, M.F., Rodriguez, E.M., Santos, E.A., Ansaldo, M., 2000. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 125, 157–164. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00093-6)
- Rebelo, M.F., Santos, E.A., Monserrat, J.M., 1999. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda) Dana, 1851: Accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 122, 429–435.
[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00026-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00026-4)
- Reef, R., Feller, I.C., Lovelock, C.E., 2010. Nutrition of mangroves. *Tree Physiol.* 30, 1148–1160. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq048>
- Reef, R., Lovelock, C.E., 2015. Regulation of water balance in Mangroves. *Ann. Bot.* 115, 385–395. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu174>
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106–117.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>
- Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M., Winston, G.W., 2002. Seasonal variations of

- susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Sci. Total Environ.* 289, 205–211.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01047-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01047-6)
- Ren, Q., Pan, L., Zhao, Q., Si, L., 2015. Ammonia and urea excretion in the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 187, 48–54.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.04.013>
- Richter, O., Nguyen, H.A., Nguyen, K.L., Nguyen, V.P., Biester, H., Schmidt, P., 2016. Phytoremediation by mangrove trees: Experimental studies and model development. *Chem. Eng. J.* 294, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.017>
- Ridd, P. V., 1996. Flow through animal burrows in mangrove creeks. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 43, 617–625. <https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0091>
- Ried, C., Wahl, C., Wellenhofer, G., Schneider-mergener, J., Chem, J.B., Ried, C., Wahl, C., Miethke, T., Landgraf, C., Schneider-mergener, J., Hoess, A., 1996. Protein Chemistry and Structure : High Affinity Endotoxin-binding and Neutralizing Peptides Based on the Crystal Structure of Recombinant *Limulus* Anti-lipopolysaccharide Factor H. *J. Biol. Chem.* 271, 28120–28127. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28120>
- Riedel, B., Pados, T., Pretterebner, K., Schiemer, L., Steckbauer, A., Haselmair, A., Zuschin, M., Stachowitsch, M., 2014. Effect of hypoxia and anoxia on invertebrate behaviour: Ecological perspectives from species to community level. *Biogeosciences* 11, 1491–1518. <https://doi.org/10.5194/bg-11-1491-2014>
- Rivera-Ingraham, G.A., Barri, K., Boe I, M., Farcy, E., Charles, A.-L., Geny, B., Lignot, J.-H., 2016a. Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: is oxidative adaptation determined by gill function? *J. Exp. Biol.* 219, 80–89. <https://doi.org/10.1242/jeb.128595>
- Rivera-Ingraham, G.A., Lignot, J.-H., 2017. Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: raising the questions for future research. *J. Exp. Biol.* 220, 1749–1760. <https://doi.org/10.1242/jeb.135624>
- Rivera-Ingraham, G.A., Nommick, A., Blondeau-Bidet, E., Ladurner, P., Lignot, J.-H., 2016b. Salinity stress from the perspective of the energy-redox axis: lessons from a marine intertidal flatworm. *Redox Biol.* 10, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.012>

- Roberts, S.M., Kehrer, J.P., Klotz, L.O., 2015. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice, *Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19096-9>
- Robertson, A.I., 1986. Leaf-burying crabs: Their influence on energy flow and export from mixed mangrove forests (*Rhizophora* spp.) in northeastern Australia. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 102, 237–248. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90179-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90179-6)
- Robertson, A.I., Daniel, P.A., 1989. The influence of crabs on litter processing in high intertidal mangrove forests in tropical Australia. *Oecologia* 78, 191–198. <https://doi.org/10.1007/BF00377155>
- Robertson, A.I., Duke, N.C., 1987. Mangroves as nursery sites: comparisons of the abundance and species composition of fish and crustaceans in mangroves and other nearshore habitats in tropical Australia. *Mar. Biol.* 205, 193–205.
- Rodrigues, E.T., Pardal, M.Â., 2014. The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environ. Int.* 70, 158–182. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.018>
- Rodriguez-Ariza, A., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J.R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Barcena, J.A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci. Total Environ.* 134, 109–116. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80009-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80009-9)
- Rodriguez-Checa, J., Ormad, M.P., Mosteo, R., Sarasa, J., Ovelleiro, J.L., 2015. Conventional and Advanced Oxidation Processes Used in Disinfection of Treated Urban Wastewater. *Water Environ. Res.* 87, 281–288. <https://doi.org/10.2175/106143014X13987223590362>
- Rodriguez, E.M., Monserrat, J.M., 1991. Acute and chronic effects of parathion and 2,4 D on the oxygen consumption of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Acta Physiol Pharmacol. Ther. Latinoam* 41, 201–210.
- Rohn, T.T., Hinds, T.R., Vincenti, F.F., 1996. Inhibition of Ca²⁺-Pump ATPase and the Na⁺/K⁺-Pump ATPase by Iron-Generated Free Radicals. *Biochem. Pharmacol.* 51, 471–476.
- Rohn, T.T., Hinds, T.R., Vincenzi, F.F., 1993. Ion transport ATPases as targets for free radical damage. *Biochem. Pharmacol.* 46, 525–534. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90530-A](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90530-A)

- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic Effects of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Decapod Crustaceans: A Review on Factors Influencing their Toxicity, Physiological Consequences, and Coping Mechanisms. *Rev. Fish. Sci.* 21, 1–21.
<https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- Romano, N., Zeng, C., 2010. Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 151, 222–228.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.011>
- Romano, N., Zeng, C., 2007. Acute toxicity of ammonia and its effects on the haemolymph osmolality, ammonia-N, pH and ionic composition of early juvenile mud crabs, *Scylla serrata* (Forsk.) *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 278–285.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.04.018>
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le Priol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sanchez, A., Van Wormhoudt, A., 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: Effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 259, 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00222-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00222-2)
- Rosenberg, M.S., 2014. Contextual cross-referencing of species names for fiddler crabs (genus *Uca*): An experiment in cyber-taxonomy. *PLoS One* 9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101704>
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D., 2004. Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach. *Syst. Biol.* 53, 662–664.
<https://doi.org/10.1080/10635150490472977>
- Ruwa, R.K., 1990. The effects of habitat complexities created by mangroves on macrofaunal composition in brackishwater intertidal zones at the Kenyan coast. *Discov. Innov.* 2, 49–55.
- Sá, M.G., Valenti, W.C., Zanotto, F.P., 2008. Dietary copper absorption and excretion in three semi-terrestrial grapsoid crabs with different levels of terrestrial adaptation. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 148, 112–116.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.002>
- Sagasti, A., Schaffner, L.C., Duffy, J.E., 2001. Effects of periodic hypoxia on mortality, feeding and predation in an estuarine epifaunal community. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 258,

257–283. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00220-9)

- Sainz, J.C., García-Carreño, F.L., Córdova-Murueta, J.H., Cruz-Hernández, P., 2005. Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 326, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.05.021>
- Salgado-Kent, C., McGuinness, K., 2010. Spatial and temporal variation in relative numbers of grapsid crabs (Decapoda: Grapsidae) in northern Australian mangrove forests. *The Beagle* 26, 79–87.
- Salin, K., Auer, S.K., Rudolf, A.M., Anderson, G.J., Cairns, A.G., Mullen, W., Hartley, R.C., Selman, C., Metcalfe, N.B., Gj, A., Ag, C., Mullen, W., Rc, H., 2015. Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species *in vivo*. *Biol. Lett.* 11: 201505. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0538>
- Santos, A.E., Baldisseroto, B., Bianchini, A., Colares, E.P., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C., 1987. Respiratory Mechanisms and Metabolic Adaptations of an Intertidal Crab, *Chasmagnathus granulata* (DANA, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 88A, 21–25.
- Sardella, B.A., Brauner, C.J., 2007. The Osmo-respiratory Compromise in Fish: The Effects of Physiological State and the Environment, in: Fernandes, M.N., Rantin, F.T., Glass, M.L., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Respiration and Environment*. pp. 147–165.
- Sasekumar, A., 1974. Distribution of Macrofauna on a Malayan Mangrove Shore. *J. Anim. Ecol.* 43, 51–69.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schauen, M., Blandschun, R., Wenk, J., 1997. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.* 378, 1247–1257.
- Schein, V., Fernandes Chittó, A.L., Etges, R., Kucharski, L.C., Van Wormhoudt, A., Da Silva, R.S.M., 2005. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: Seasonal differences. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 316, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.11.005>
- Schein, V., Waché, Y., Etges, R., Kucharski, L.C., Van Wormhoudt, A., Da Silva, R.S.M., 2004. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene

- expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. *FEBS Lett.* 561, 202–206.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00162-0)
- Schlacher, T.A., Lucrezi, S., Peterson, C.H., Connolly, R.M., Olds, A.D., Althaus, F., Hyndes, G.A., Maslo, B., Gilby, B.L., Leon, J.X., Weston, M.A., Lastra, M., Williams, A., Schoeman, D.S., 2016. Estimating animal populations and body sizes from burrows: Marine ecologists have their heads buried in the sand. *J. Sea Res.* 112, 55–64.
<https://doi.org/10.1016/j.seares.2016.04.001>
- Schoffeniels, E., Gilles, R., 1970. Osmoregulation in aquatic Arthropods, in: Florkin, M., Scheer, B.T. (Eds.), *Chemical Zoology, Vol. V. Arthropoda, Part A.* Academic Press, New York and London, pp. 255–286.
- Schram, F.R., Castro, P., 2015. Introduction to Brachyura, in: *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9, Part C.* Interactive Factory, Boston, USA, pp. 3–9. https://doi.org/https://doi.org/10.1163/9789004190832_003
- Schreck, R., Baeuerle, P.A., 1991. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol.* 1, 39–42. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(91\)90072-H](https://doi.org/10.1016/0962-8924(91)90072-H)
- Schubart, C.D., Cannicci, S., Vannini, M., Fratini, S., 2006. Molecular phylogeny of grapsoid crabs (Decapoda, Brachyura) and allies based on two mitochondrial genes and a proposal for refraining from current superfamily classification. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 44, 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2006.00354.x>
- Schubart, C.D., Cuesta, J.A., Diesel, R., Felder, D.L., 2000. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of nonmarine lineages within the American Grapsoid crabs (Crustacea: Brachyura). *Mol. Phylogenet. Evol.* 15, 179–190.
<https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0754>
- Schubart, C.D., Diesel, R., 1998. Osmoregulatory capacities and penetration into terrestrial habitats: A comparative study of Jamaican crabs of the genus *Armases* Abele, 1992 (Brachyura: Grapsidae: Sesarminae). *Bull. Mar. Sci.* 62, 743–752.
- Seibel, B.A., Drazen, J.C., 2007. The rate of metabolism in marine animals: Environmental constraints, ecological demands and energetic opportunities. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 2061–2078. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2101>
- Shahdadi, A., Schubart, C.D., 2018. Taxonomic review of *Perisesarma* (Decapoda:

- Brachyura: Sesarmidae) and closely related genera based on morphology and molecular phylogenetics: New classification, two new genera and the questionable phylogenetic value of the epibranchial tooth. *Zool. J. Linn. Soc.* 182, 517–548.
<https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlx032>
- Sheaves, M., Molony, B., 2000. Short-circuit in the mangrove food chain. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 199, 97–109. <https://doi.org/10.3354/meps199097>
- Shih, H. Te, Mok, H.K., Chang, H.W., 2005. Chimney building by male *Uca formosensis* Rathbun, 1921 (Crustacea: Decapoda: Ocypodidae) after pairing: A new hypothesis for chimney function. *Zool. Stud.* 44, 242–251.
- Shih, H. Te, Ng, P.K.L., Davie, P.J.F., Schubart, C.D., Türkay, M., Naderloo, R., Jones, D., 2016. Systematics of the family Ocypodidae Rafinesque, 1815 (Crustacea: Brachyura), Based on phylogenetic relationships, With a reorganization of subfamily rankings and a review of the taxonomic status of *Uca* Leach, 1814, *Sensu lato* and its subgenera. *Raffles Bull. Zool.* 64, 139–175.
- Siebers, D., Leweck, K., Markus, H., Winkler, A., 1982. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Mar. Biol.* 69, 37–43.
<https://doi.org/10.1007/BF00396958>
- Sies, H., 1985. *Oxidative stress*. Academic Press, London.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-02957-2>
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415–418. <https://doi.org/10.1023/A:1009616228304>
- Skov, M.W., Hartnoll, R.G., 2002. Paradoxical selective feeding on a low-nutrient diet: Why do mangrove crabs eat leaves? *Oecologia* 131, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0847-7>
- Skov, M.W., Hartnoll, R.G., 2001. Comparative suitability of binocular observation, burrow counting and excavation for the quantification of the mangrove fiddler crab *Uca annulipes* (H. Milne Edwards). *Hydrobiologia* 449, 201–212.
<https://doi.org/10.1023/A:1017598616178>
- Skov, M.W., Hartnoll, R.G., Ruwa, R.K., Shunula, J.P., Vannini, M., Cannicci, S., 2005. Marching to a different drummer: Crabs synchronize reproduction to a 14-month lunar-

- tidal cycle. *Ecology* 86, 1164–1171. <https://doi.org/10.1890/04-0917>
- Skov, M.W., Vannini, M., Shunula, J.P., Hartnoll, R.G., Cannicci, S., 2002. Quantifying the density of mangrove crabs: Ocypodidae and Grapsidae. *Mar. Biol.* 141, 725–732. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0867-9>
- Slim, F.J., Hemminga, M.A., Ochieng, C., Jannink, N.T., Cocheret De La Morinière, E., Van Der Velde, G., 1997. Leaf litter removal by the snail *Terebralia palustris* (Linnaeus) and sesarmid crabs in an East African mangrove forest (Gazi Bay, Kenya). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 215, 35–48. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00029-4)
- Small, H.J., Pagenkopp, K.M., 2011. Reservoirs and alternate hosts for pathogens of commercially important crustaceans: A review. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.016>
- Smith III, T.J., 1987. Effects of seed predators and light level on the distribution of *Avicennia Marina* (Forsk.) Vierh. in tropical, tidal forests. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 25, 43–51.
- Smith III, T.J., Boto, K.G., Frusher, S.D., Giddins, R.L., 1991. Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest productivity. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 33, 419–432. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(91\)90081-L](https://doi.org/10.1016/0272-7714(91)90081-L)
- Sneddon, L.U., Taylor, A.C., Huntingford, F.A., 1999. Metabolic consequences of agonistic behaviour: Crab fights in declining oxygen tensions. *Anim. Behav.* 57, 353–363. <https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0982>
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: Implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181–201. <https://doi.org/10.3354/cr00764>
- Sokolova, I.M., Pörtner, H.O., 2001. Physiological adaptations to high intertidal life involve improved water conservation abilities and metabolic rate depression in *littorina saxatilis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 224, 171–186. <https://doi.org/10.3354/meps224171>

- Sousa, W.P., Dangremond, E.M., 2011. Trophic Interactions in Coastal and Estuarine Mangrove Forest Ecosystems, Treatise on Estuarine and Coastal Science. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374711-2.00606-9>
- Spear, N., Aust, S.D., 1995. Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 111–116. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.9921>
- Spicer, J.I., Weber, R.E., 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 100, 339–342. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90005-E](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90005-E)
- St-Louis, R., Parmentier, C., Raison, D., Grange-Messent, V., Hardin-Pouzet, H., 2012. Reactive oxygen species are required for the hypothalamic osmoregulatory response. *Endocrinology* 153, 1317–1329. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1350>
- Stentiford, G.D., Bonami, J.R., Alday-Sanz, V., 2009. A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture* 291, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.042>
- Stevenson, R.D., 2006. Ecophysiology and conservation: The contribution of energetics - Introduction to the symposium. *Integr. Comp. Biol.* 46, 1088–1092. <https://doi.org/10.1093/icb/icl053>
- Stevenson, R.D., Tuberty, S.R., DeFur, P.L., Wingfield, J.C., 2005. EcoPhysiology and conservation: The contribution of endocrinology and immunology - Introduction to the symposium. *Integr. Comp. Biol.* 45, 1–3. <https://doi.org/10.1093/icb/45.1.1>
- Stickle, W.B., Kapper, M. a, Liu, L.-L., Gnaiger, E., Wang, S.Y., Rouge, B., 1989. Metabolic adaptations of several species of crustaceans and molluscs to hypoxia: tolerance and microcalorimetric studies. *Biol. Bull.* 177, 303–312. <https://doi.org/10.2307/1541945>
- Sturma, A., 2013. Les défis de l'aissinissement à Mayotte: Dynamiques de changement social et effets pervers de l'action publique. Université de Toulouse.
- Sturve, J., Almroth, B.C., Förlin, L., 2008. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.004>

- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G., 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell Environ.* 35, 259–270.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>
- Szmant, A.M., 2002. Nutrient Enrichment on Coral Reefs: Is It a Major Cause of Coral Reef Decline? *Estuaries* 25, 743–766. <https://doi.org/10.1007/BF02804903>
- Takeda, S., Matsumasa, M., Kikuchi, S., Poovachiranon, S., Murai, M., 1996. Variation in the branchial formula of semiterrestrial crabs (Decapoda: Brachyura: Grapsidae and Ocypodidae) in relation to physiological adaptations to the environment. *J. Crustac. Biol.* 16, 472–486.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1996a. Retention of wastewater-borne nitrogen and phosphorus in mangrove soils. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 17, 851–859.
<https://doi.org/10.1080/09593331708616453>
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1996b. Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater. *Environ. Pollut.* 94, 283–291. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00115-7)
- Tankersley, R.A., Forward, R.B., 1994. Endogenous swimming rhythms in estuarine crab megalopae: implications for flood-tide transport. *Mar. Biol.* 118, 415–423.
<https://doi.org/10.1007/BF00350298>
- Tankersley, R.A., Wieber, M.G., 2000. Physiological responses of postlarval and juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* to hypoxia and anoxia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 194, 179–191. <https://doi.org/10.3354/meps194179>
- Taquet, C., Taquet, M., Dempster, T., Soria, M., Ciccione, S., Roos, D., Dagorn, L., 2006. Foraging of the green sea turtle *Chelonia mydas* on seagrass beds at Mayotte Island (Indian Ocean), determined by acoustic transmitters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 306, 295–302.
<https://doi.org/10.3354/meps306295>
- Taylor, E., 1982. Control and co-ordination of ventilation and circulation in crustaceans: responses to hypoxia and exercise. *J. Exp. Biol.* 100, 289–319.
- Taylor, E.W., Butler, P.J., 1973. The behaviour and physiological responses of the shore crab *Carcinus maenas* during changes in environmental oxygen tension. *Netherlands J. Sea Res.* 7, 496–505. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(73\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0077-7579(73)90069-0)

- Taylor, E.W., Butler, P.J., Al-Wassia, A., 1977. The effect of a decrease in Salinity on Respiration, Osmoregulation and Activity in the Shore Crab, *Carcinus maenas* (L.) at Different Acclimation Temperatures. *J. Comp. Physiol. - B* 170, 155–170.
- Taylor, H.H., Greenaway, P., 1984. The role of the gills and branchiostegites in gas exchange in a bimodally breathing crab, *Holthuisana transversa*: Evidence for a facultative change in the distribution of the respiratory circulation. *J. Exp. Biol.* 111, 103–121.
- Taylor, H.H., Greenaway, P., 1979. The structure of the gills and lungs of the arid-zone crab, *Holthuisana (Austrothelphusa) trasversa* (Brachyura: Sundathelphusidae) including observations on arterial vessels within the gills. *J. Zool.* 189, 359–384.
- Taylor, H.H., Taylor, E.W., 1992. Gills and lungs: The exchange of gases and ions, in: Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss, New York, pp. 203–293.
- Teal, J.M., 1959. Respiration of Crabs in Georgia Salt Marshes and Its Relation to Their Ecology. *Physiol. Zool.* 32, 1–14.
- Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Mercky, Y., Lejeune, M., Lignot, J.H., Sucré, E., 2018a. Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: Integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species. *Aquat. Toxicol.* 196, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.003>
- Theuerkauff, D., Rivera-ingraham, G.A., Roques, J.A.C., Bertini, M., Lejeune, M., Farcy, E., Lignot, J., 2018b. Salinity Variation in a Mangrove Ecosystem : A Physiological Investigation to Assess Potential Consequences of Salinity Disturbances on Mangrove Crabs. *Zool. Stud.* 57, 1–16. <https://doi.org/10.6620/ZS.2018.57-36>
- Thomassin, B.A., Garcia, F., Sarrazin, L., Schembri, T., Wafo, E., 2011. Coastal seawater pollutants in the coral reef lagoon of a small tropical island in development: the Mayotte example (N Mozambique Channel, SW Indian Ocean), in: *Global Change: Mankind-Marine Environment Interactions, Proceedings of the 13th French-Japanese Oceanography Symposium*. pp. 1–447. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8630-3_73
- Thongo, A., 2016. Les mangroves à Mayotte. Etat des lieux et enjeux de gestion.
- Thongtham, N., Kristensen, E., 2005. Carbon and nitrogen balance of leaf-eating sesarmid crabs (*Neopisesarma versicolor*) offered different food sources. *Estuar. Coast. Shelf*

- Sci. 65, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2005.05.014>
- Thurman, C., 2003. Osmoregulation in fiddler crabs (*Uca*) from temperate Atlantic and Gulf of Mexico coasts of North America. *Mar. Biol.* 142, 77–92.
<https://doi.org/10.1007/s00227-002-0920-8>
- Thurman, C., Hanna, J., Bennett, C., 2010. Ecophenotypic physiology: Osmoregulation by fiddler crabs (*Uca* spp.) from the northern Caribbean in relation to ecological distribution. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 43, 339–356.
<https://doi.org/10.1080/10236244.2010.526407>
- Torres, A.M., Testa, P.C., Gáspari, C., Masutti, B.M., Panitz, C.M.N., Curi-Pedrosa, R., Alves De Almeida, E., Di Mascio, P., Filho, D.W., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 923–932. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00142-X)
- Towle, D.W., Palmer, G.E., Harris, J.L., 1976. Role of gill Na^+K^+ -dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *J. Exp. Zool.* 196, 315–321. <https://doi.org/10.1002/jez.1401960306>
- Tsai, I.H., Lu, P.J., Chuang, J.L., 1991. The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1080, 59–67. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90112-D](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90112-D)
- Tsai, J.-R., Lin, H.-C., 2014. Functional anatomy and ion regulatory mechanisms of the antennal gland in a semi-terrestrial crab, *Ocypode stimpsoni*. *Biol. Open* 3, 409–17.
<https://doi.org/10.1242/bio.20147336>
- Tsai, J.-R., Lin, H.-C., 2007. V-type H^+ -ATPase and Na^+K^+ -ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J. Exp. Biol.* 210, 620–627.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02684>
- Tsang, L.M., Schubart, C.D., Ahyong, S.T., Lai, J.C.Y., Au, E.Y.C., Chan, T.Y., Ng, P.K.L., Chu, K.H., 2014. Evolutionary history of true crabs (crustacea: Decapoda: brachyura) and the origin of freshwater crabs. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1173–1187.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu068>
- Turcios, A.E., Papenbrock, J., 2014. Sustainable treatment of aquaculture effluents-What can we learn from the past for the future? *Sustain.* 6, 836–856.

<https://doi.org/10.3390/su6020836>

- Uchiyama, M., Mihara, M., 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 86, 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
- Vaal, M., Wal, J.T. Van Der, Hermens, J., Hoekstra, J., 1997. Pattern analysis of the variation in the sensitivity of aquatic species to toxicans. *Chemosphere* 35, 1291–1309.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Van Nederveelde, F., Cannicci, S., Koedam, N., Bosire, J., Dahdouh-Guebas, F., 2015. What regulates crab predation on mangrove propagules? *Acta Oecologica* 63, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2014.11.006>
- Vannini, M., Oluoch, A., Ruwa, K., 1997. Tree-climbing decapods of Kenyan mangroves, in: Kjerfve, B., Lacerda, L.D., Diop, E.S. (Eds.), *Mangrove Ecosystem Studies in Latin America and Africa*. UNESCO / ISME/USDA Paris, France, Paris, France, pp. 325–338.
- Vannini, M., Ruwa, R.K., 1994. Vertical migrations in the tree crab *Sesarma leptosoma* (Decapoda, Grapsidae). *Mar. Biol.* 118, 271–278. <https://doi.org/10.1007/BF00349794>
- Ventura, R., Da Silva, U.A.T., Perbiche-Neves, G., Ostrensky, A., Boeger, W.A., Pie, M.R., 2008. Larval cannibalism rates in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) under laboratory conditions. *Aquac. Res.* 39, 263–267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01887.x>
- Vijayavel, K., Balasubramanian, M.P., 2006. Changes in oxygen consumption and respiratory enzymes as stress indicators in an estuarine edible crab *Scylla serrata* exposed to naphthalene. *Chemosphere* 63, 1523–1531. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.010>
- Vo, Q.T., Kuenzer, C., Vo, Q.M., Moder, F., Oppelt, N., 2012. Review of valuation methods for mangrove ecosystem services. *Ecol. Indic.* 23, 431–446.

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.022>

Vogt, G., Stöcker, W., Storch, V., Zwilling, R., 1989. Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry* 91, 373–381.

<https://doi.org/10.1007/BF00493824>

Von Sperling, M., 2005. Modelling of coliform removal in 186 facultative and maturation ponds around the world. *Water Res.* 39, 5261–5273.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.016>

Wada, K., 1993. Territorial behavior, and sizes of home range and territory, in relation to sex and body size in *Ilyoplax pusilla* (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Mar. Biol.* 115, 47–52.

Walters, B.B., Rönnbäck, P., Kovacs, J.M., Crona, B., Hussain, S.A., Badola, R., Primavera, J.H., Barbier, E., Dahdouh-Guebas, F., 2008. Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. *Aquat. Bot.* 89, 220–236.

<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.02.009>

Walters, C.R., Cheng, P., Pool, E., Somerset, V., 2016. Effect of temperature on oxidative stress parameters and enzyme activity in tissues of Cape River crab (*Potamonautes perlatius*) following exposure to silver nanoparticles (AgNP). *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A* 79, 61–70. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1106357>

Wang, J., Zhang, P., Shen, Q., Wang, Q., Liu, D., Li, J., Wang, L., 2013. The Effects of Cadmium Exposure on the Oxidative State and Cell Death in the Gill of Freshwater Crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS One* 8, 1–9.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064020>

Wang, W., 2011. Bacterial diseases of crabs: A review. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 18–26.

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.018>

Wang, W., Gu, W., Gasparich, G.E., Bi, K., Ou, J., Meng, Q., Liang, T., Feng, Q., Zhang, J., Zhang, A.Y., 2011. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., associated with mortality in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 703–708.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.020529-0>

Wang, W., Wen, B., Gasparich, G.E., Zhu, N., Rong, L., Chen, J., Xu, Z., 2004. A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir*

- sinensis*). *Microbiology* 150, 3035–3040. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26664-0>
- Wang, W., Wu, X., Liu, Z., Zheng, H., Cheng, Y., 2014. Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: Gene discovery in the comparative transcriptome of different hepatopancreas stages. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084921>
- Warren, J.H., 1990. Role of burrows as refuges from subtidal predators of temperate mangrove crabs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 295–299. <https://doi.org/10.3354/meps067295>
- Warren, J.H., Underwood, A.J., 1986. Effects of burrowing crabs on the topography of mangrove swamps in New South Wales. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 102, 223–235. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90178-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90178-4)
- Watson, G.M., Andersen, O.K., Depledge, M.H., Galloway, T.S., 2004. Detecting a field gradient of PAH exposure in decapod crustacea using a novel urinary biomarker. *Mar. Environ. Res.* 58, 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.068>
- Wear, R.J., Tanner, J.E., 2007. Spatio-temporal variability in faunal assemblages surrounding the discharge of secondary treated sewage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.03.008>
- Wear, S.L., Thurber, R.V., 2015. Sewage pollution: Mitigation is key for coral reef stewardship. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1355, 15–30. <https://doi.org/10.1111/nyas.12785>
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K.H., 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1–80. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0009-x>
- Weihrauch, D., Becker, W., Postel, U., Riestenpatt, S., Siebers, D., 1998. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 168, 364–376. <https://doi.org/10.1007/s003600050156>
- Weihrauch, D., Donnell, M.O., 2017. Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39617-0>
- Weihrauch, D., Fehsenfeld, S., Quijada-rodriguez, A., 2017. Nitrogen Excretion in Aquatic Crustaceans, in: *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates*. pp. 1–24. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39617-0>

- Weihrauch, D., Morris, S., Towle, D.W., 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491–4504. <https://doi.org/10.1242/jeb.01308>
- Weis, J.S., 2014. Physiological, developmental and behavioral effects of marine pollution, *Physiological, Developmental and Behavioral Effects of Marine Pollution*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6949-6>
- Welker, A.F., Moreira, D.C., Campos, É.G., Hermes-Lima, M., 2013. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 165, 384–404. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003>
- Werner, I., Deanovic, L.A., Connor, V., De Vlaming, V., Bailey, H.C., Hinton, D.E., 2000. Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) in the Sacramento-San Joaquin River Delta, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 215–227. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190126>
- Werner, I., Deanovic, L.A., Miller, J., Denton, D.L., Crane, D., Mekebri, A., Moore, M.T., Wrynski, J., 2010. Use of vegetated agricultural drainage ditches to decrease toxicity of irrigation runoff from tomato and alfalfa fields in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2859–2868. <https://doi.org/DOI:10.1002/etc.356>
- Werry, J., Lee, S.Y., 2005. Grapsid crabs mediate link between mangrove litter production and estuarine planktonic food chains. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 293, 165–176. <https://doi.org/10.3354/meps293165>
- Wharfe, J., Adams, À.W., Apitz, S.E., Barra, R., Bridges, T.S., Hickey, C., 2007. In Situ Methods of Measurement — An Important Line of Evidence in the Environmental Risk Framework. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 268–274.
- Wheatly, M.G., 1985. The role of the antennal gland in ion and acid-base regulation during hyposaline exposure of the Dungeness crab *Cancer magister* (Dana). *J. Comp. Physiol. B* 155, 445–454. <https://doi.org/10.1007/BF00684674>
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., Shipin, O. V., 2009. Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol. Eng.* 35, 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.021>
- Wikelski, M., Cooke, S.J., 2006. Conservation physiology. *Trends Ecol. Evol.* 21, 38–46.

<https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.018>

- Wilkins, J.L., Mercier, A.J., Evans, J., 1985. Cardiac and ventilatory responses to stress and to neurohormonal modulators by the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 82, 337–343. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90172-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90172-0)
- Wilkins, J.L., Young, R.E., 1992. Regulation of Pulmonary Blood Flow and of Blood Pressure in a Mangrove Crab (*Goniopsis Cruentata*). *J. Exp. Biol.* 163, 297–316.
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I. a., 2005. *Environmental physiology of animals*, Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Wilson, K.A., 1989. Ecology of mangrove crabs: predation, physical factors and refuges. *Bull. Mar. Sci.* 44, 263–273.
- Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., Lan, C.Y., 1997. Mangrove wetlands as wastewater treatment facility: A field trial, in: *Hydrobiologia*. pp. 49–59. <https://doi.org/10.1023/A:1003040920173>
- Woodburn, K., Walton, R., McCrohan, C., White, K., 2011. Accumulation and toxicity of aluminium-contaminated food in the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Aquat. Toxicol.* 105, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.008>
- Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8244–8259. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>
- Wu, Y., Chung, A., Tam, N.F.Y., Pi, N., Wong, M.H., 2008a. Constructed mangrove wetland as secondary treatment system for municipal wastewater. *Ecol. Eng.* 34, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.07.010>
- Wu, Y., Tam, N.F.Y., Wong, M.H., 2008b. Effects of salinity on treatment of municipal wastewater by constructed mangrove wetland microcosms. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 727–734. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.026>
- Yamaguchi, T., 2001. The mating system of the fiddler crab, *Uca lactea* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana* 74, 389–399.
- Yamaguchi, T., 1998. Evidence of actual copulation in the burrow in the fiddler crab, *Uca*

- lactea* (De Haan, 1835) (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana* 71, 565–570.
<https://doi.org/10.1163/156854098X00437>
- Yang, Q., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Luan, T.G., Su, W.S., Lan, C.Y., Shin, P.K.S., Cheung, S.G., 2008. Potential use of mangroves as constructed wetland for municipal sewage treatment in Futian, Shenzhen, China. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 735–743.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.037>
- Ye, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 2001. Livestock wastewater treatment by a mangrove pot-cultivation system and the effect of salinity on the nutrient removal efficiency. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 512–520. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00196-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00196-X)
- Yin, H., Xu, L., Porter, N.A., 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* 111, 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yu, R.Q., Chen, G.Z., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., Lan, C.Y., 1997. Benthic macrofauna of the mangrove swamp treated with municipal wastewater. *Hydrobiologia* 347, 127–137.
<https://doi.org/10.1023/A:1003027520750>
- Zenteno-Savín, T., Saldierna, R., Ahuejote-Sandoval, M., 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 142, 301–308.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.001>
- Zhang, F.Q., Wang, Y.S., Lou, Z.P., Dong, J. De, 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere* 67, 44–50.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.007>
- Zhang, J.E., Liu, J.L., Ouyang, Y., Liao, B.W., Zhao, B.L., 2010. Removal of nutrients and heavy metals from wastewater with mangrove *Sonneratia apetala* Buch-Ham. *Ecol. Eng.* 36, 807–812. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.02.008>
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, L., Cai, C., Qiao, F., Du, Z., Li, E., 2016. Symbiotic bacteria in gills and guts of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) differ from the free-living bacteria in water. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148135>
- Zheng, W.J., Hu, Y.H., Zhang, M., Sun, L., 2010. Analysis of the expression and antioxidative property of a peroxiredoxin 6 from *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish*

Immunol. 29, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.04.008>

Zhou, X., Ferraris, J.D., Cai, Q., Agarwal, A., Burg, M.B., 2005. Increased reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP. *AJP Ren. Physiol.* 289, 377–385.

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00463.2004>

Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J., 2014. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol. Rev.* 94, 909–950.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

Résumé : Les mangroves sont de plus en plus mentionnées comme outil de bioremédiation potentiel dans le traitement des eaux usées (EU). Actuellement, les effets des rejets d'EU sur la macrofaune, et plus particulièrement sur les crabes de mangrove, ne sont pas clairs. Ces espèces sont dites ingénieurs de cet écosystème, notamment grâce à leur activité de bioturbation qui permet, entre autres, l'infiltration des EU dans le sédiment via leurs terriers. L'objectif ont donc été d'étudier l'impact du rejet d'EU domestiques sur la physiologie (osmorégulation, métabolisme et balance oxydative) de 3 espèces de crabe (2 Sesarmidae et 1 Ocypodidae) par une approche combinant expérimentations en laboratoire et sur le terrain en utilisant un site pilote expérimental sur l'île de Mayotte. Ces crabes qui vivent dans la zone intertidale ont un mode de vie bimodal et font fréquemment face à des salinités variables. Ils sont de bons hyper-hypo-osmorégulateur et sont adaptés à cette vie à l'interface entre terre et eau aussi bien au niveau de la régulation ionique que de la respiration. Les résultats indiquent que la densité des terriers diminue dans les zones d'écoulement des EU et que la communauté des espèces est modifiée avec la dominance de *Parasesarma guttatum* (PG) qui n'est pas une espèce bioturbatrice. Les EU induisent donc une modification potentielle du fonctionnement de l'écosystème. PG diminue son métabolisme alors que les deux autres espèces étudiées l'augmentent significativement. Immérgées dans les EU, les trois espèces étudiées présentent des atteintes de la fonction osmorégulatrice (activité de la Na^+/K^+ -ATPase et épaisseur d'épithélium branchiale) et de la balance oxydative (formation d'espèces réactives de l'oxygène dans l'hémolymphe et enzymes antioxydantes des branchies) en laboratoire mais des effets moins marqués sont observés chez les crabes maintenus *in situ* dans des terriers artificiels. Les biomarqueurs étudiés peuvent ainsi être utilisés pour mesurer l'état physiologique des crabes soumis à des rejets d'EU domestique. Ces atteintes qui entraînent des coûts métaboliques supplémentaires peuvent mener à la réduction de leur fitness, contribuant à expliquer les observations écologiques. De plus, les résultats montrent que les crabes violonistes sont les plus sensibles, suivis des deux *Sesarmidae* alors que PG semble mieux adapté pour éviter les EU. Si aucun dysfonctionnement majeur n'a été observé à l'échelle de l'écosystème jusqu'à présent, il convient de maintenir un suivi régulier de ces espèces, en tenant compte de leur spécificité en termes d'activité bioturbatrice et de santé physiologique.

Mots clés : Mangrove, crabe, biomarqueur, osmorégulation, stress oxydatif, eaux usées

Abstract: Mangroves are increasingly proposed as a bioremediation tool for wastewater (WW) treatment. However, this practice can impact mangrove crabs which are key engineer species of the ecosystem through their bioturbation activities. Their burrows are directly involved in the bioremediation process allowing WW infiltration in the sediment. This study aimed to determine the effects of WW on the physiology (osmoregulation, bioenergetics, oxidative balance) of 3 species of crabs (2 Sesarmidae and 1 Ocypodidae) with laboratory and *in situ* experiments (burrow density and caging experiment in an experimental area with controlled WW releases on a mangrove located on the island of Mayotte). These crabs inhabit the intertidal area of variable salinity with a bimodal life (aquatic and terrestrial). They are good hyper-hypo-osmoregulators and well adapted to terrestrial life both in terms of osmotic and aerial breathing capacities. Burrow density decreases in flat areas where WW flows and crab community is altered with a marked dominance of *Parasesarma guttatum* (PG) (a species with no bioturbation activity). This change may induce drastic alterations of the ecosystem functioning. The bioenergetic response of PG is totally different from the other studied species. PG decreases its metabolic rate in WW but the other species have increased metabolic activity. Moreover, after laboratory exposure the 3 species show impairments in their osmoregulatory capacity (Na^+/K^+ -ATPase activity and epithelium gill thickness) and oxidative balance (reactive oxygen species formation in haemolymph and antioxidant enzyme activity in gills) due to WW exposure in laboratory conditions. *In situ*, encaged crabs showed a similar but reduced pattern. These effects could decrease their fitness and may also explain the observed ecological changes. The biomarkers used in this study may be a useful tool to monitor crab populations. Moreover, our results show that fiddler crabs are the most sensitive to WW followed by other Sesarmidae. PG seems better adapted to avoid WW exposure. Even if no major dysfunction is observed at the ecosystem level yet, WW release should be carefully monitored nevertheless with an emphasis on crab bioturbation activity and their physiological health according to species sensitivity.

Keywords: Mangrove, crab, biomarker, osmoregulation, oxidative stress, wastewaters