



Biodiversité et rôle des microbiomes entériques des poissons dans les écosystèmes coralliens

Marie-Charlotte Cheutin

► To cite this version:

Marie-Charlotte Cheutin. Biodiversité et rôle des microbiomes entériques des poissons dans les écosystèmes coralliens. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTG074 . tel-03608249

HAL Id: tel-03608249

<https://theses.hal.science/tel-03608249>

Submitted on 14 Mar 2022

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 Écologie Fonctionnelle et Sciences Agronomiques

École doctorale GAIA

Unité de recherche MARBEC

Biodiversité et rôle des microbiomes entériques des poissons dans les écosystèmes coralliens

Présentée par Marie-Charlotte CHEUTIN

Le 16 Décembre 2021

Sous la direction de Thierry BOUVIER
Jean-Christophe AUGUET et de Sébastien VILLEGER

Devant le jury composé de

Thierry BOUVIER, DR, CNRS

Jean-Christophe AUGUET, CR, CNRS

Sébastien VILLEGER, CR, CNRS

Gwenaëlle LE BLAY, Pr, Université de Bretagne Occidentale

Sébastien DUPERRON, Pr, Muséum National d'Histoire Naturelle

Eve TOULZA, MCF, Université de Perpignan

Frédéric DELSUC, DR, CNRS

Pierre GALAND, DR, CNRS

Guillaume BORREL, CR, Institut Pasteur

Directeur

Co-encadrant

Co-encadrant

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examineur

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Résumé

Le microbiome entérique est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière pour son rôle bénéfique apporté à l'hôte. Bien que les poissons téléostéens représentent l'un des plus vieux et diversifié groupe de vertébrés sur Terre, son microbiome entérique et les fonctions associées restent peu documentés en comparaison de leurs pairs terrestres. Ceci est d'autant plus vrai concernant les > 6 000 espèces coralliennes de plus en plus menacées par le changement climatique et les activités humaines. Cette thèse vise à caractériser et à quantifier la biodiversité microbienne intestinale des poissons coralliens pour identifier ses déterminants afin de mieux comprendre (i) comment les poissons téléostéens et leurs symbiotes ont co-évolué au cours de leur histoire mutuelle, et (ii) quelle est en retour l'influence de cette relation sur les flux de matière vers le milieu marin.

Dans un premier temps, nous avons pu démontrer que les archées, et principalement les méthanogènes, sont en présence de trace dans le microbiome entérique des poissons marins, suggérant une contribution négligeable dans les émissions de méthane. Cette absence semble être liée à l'abondance de bactéries sulfato-réductrices, plus compétitives dans l'utilisation d'un substrat commun (*e.g.* le dihydrogène). Nous intéressant aux mécanismes expliquant l'assemblage du bactériome intestinal des poissons téléostéens au cours de leur évolution, nos résultats apportent la première preuve d'un modèle cohérent de phyllosymbiose chez les poissons coralliens et soulignent l'effet combiné de la phylogénie de l'hôte et du régime alimentaire. Bien que jouant un rôle moins influent, le régime alimentaire structure les compositions bactériennes et leurs fonctions associées, avec une richesse et une variabilité du bactériome corrélée à la position trophique de l'hôte. Enfin, nous avons pu démontrer que la transition d'une couverture corallienne à une domination macroalgale dans les récifs influence les compositions entériques bactériennes des téléostéens, notamment des herbivores, avec une augmentation significative de bactéries et de métabolismes fermenteurs. Compte tenu de l'érosion croissante des systèmes coralliens, inventorier la biodiversité microbienne récifale et comprendre sa vulnérabilité face au changement climatique et aux pressions anthropiques est une problématique de conservation urgente pour le maintien des processus écologiques dans les systèmes coralliens.

Mots-clefs : Ecologie microbienne ; Poissons coralliens ; Diversité taxonomique, phylogénétique et fonctionnelle ; Méthanogenèse ; Co-évolution ; Perturbation environnementale.

Abstract

Microbes residing in the intestinal tract of teleost fish provide a range of essential functions for their host. Although fishes represent the most diverse and oldest group of vertebrates, our understanding of their gut microbiome and its functional significance is scarce in contrast to their terrestrial counterparts. This is particularly true for the >6 000 fish species living in coral reefs, whose status are severely threatened by climate change and human pressures. This thesis aims to characterise and quantify the microbial biodiversity associated to the gastro-intestinal tract of coral reef fish in order to identify its determinants to understand (i) how teleost fish and their microbes coevolved, and (ii) what is the influence of this interaction on material flows into marine environments.

First, we demonstrated that archaea, of which methanogens, are in trace abundances in the gut microbiome of marine fishes, suggesting their negligible contribution to methane emission. This absence seems to be explained by the abundance of sulfato-reducing bacteria which compete for the utilization of common substrates (*e.g.* dihydrogene). Investigating the mechanisms underlying the bacterial assembly associated to reef fish guts, our results showed for the first time a phylosymbiosis pattern in reef fish, supporting the combined effect of the host phylogeny and of the diet, which involves horizontal acquisition since the first evolutionary steps of fish. Even if its influence is lower, the diet structures bacterial compositions and their associated functions, with a richness and a bacterial variability which correlates with the host trophic positions. Finally, we investigated the influence of an environmental shift in a post-disturbed reef and demonstrated that macroalgal dominance in reefs influenced the enteric bacterial composition of coral fishes, mainly in herbivores, with a significant increase in the proportion of fermentative bacteria and associated metabolisms. Because of the ongoing erosion of coral systems, assessing the marine microbial biodiversity and its vulnerability under climatic and anthropogenic pressures is an imperative issue for their conservation.

Keywords: Microbial ecology ; Coral reef fish ; Taxonomic, phylogenetic and functional diversity ; Methanogenesis ; Phylosymbiosis ; Environmental disturbance.

Remerciements

Il me faudrait bien plus d'une page pour remercier toutes les personnes qui ont apporté leur soutien à ces travaux (et à ma santé mentale) durant cette thèse. Une thèse est une épreuve éprouvante, d'autant plus lorsque deux ans de celle-ci se déroulent en télé-travail.

Je remercie donc tout.e.s cell.eux qui m'ont appuyée, dans cette aventure, en ayant une pensée particulière pour ma compagne et pour tous les animaux qui m'auront supportée à la maison (bien que mon axolotl de m'ait pas été d'une grande interaction).

Mon rêve d'enfant de 8 ans qui souhaitait devenir biologiste marin - une pensée à Yann Bassaglia - s'accomplit et n'aurait pu se réaliser si ma famille, mes proches et mes profs ne m'avaient pas guidée dans le merveilleux monde de la recherche. Merci Fabiola, Cédric, Florence G., (et une pensée au ciel pour Florence R.) et Dario de m'y avoir motivée. J'ai donc atteint le bout d'un parcours universitaire riche en rencontres, avec mes ami.e.s de la Licence de Versailles qui m'ont toujours suivie et soutenue et qui auront mis leur grains de sels à ce manuscrit, que ce soit pour la relecture, les illustrations ou les cartes (mes dudu.e.s d'amours, cœur sur vous). J'ai également une pensée spéciale à tout.e.s mes brestois.e.s des quatre coins du monde, qui ont également embelli ce parcours de biologie marine et avec qui j'ai pu partager ma passion (pour le cidre et la biologie marine). Je remercie également les proches et ma compagne qui m'auront toujours écoutée et fait semblant de s'intéresser à mes recherches, alors qu'ils n'y comprennent toujours pas d'intérêt (les cacas et pêts de poisson, sérieux ?). Et l'aventure continue avec les cacas des perces-oreilles ! (Mon pseudo Lady caca me colle bien). La recherche est un monde de passionné.e.s et elle ne serait rien sans discussions et questions autour d'un bon verre avec les collègues. J'ai donc une pensée particulière pour tout.e.s mes collègues de MARBEC, Virginie, Amandine(s), Laura, Elsa, Thibaut, Justine, Tanguy, Thomas, Arthur avec qui l'aventure n'aurait pu être aussi fun. Je voudrais également remercier Fabien et Audrey, qui m'auront été d'un soutien incroyable et qui m'auront aidée dans les plus durs moments, lorsque rien ne fonctionne et qu'on se demande si tout cela en vaut la peine. Cet acharnement n'aurait pu être maintenu sans l'aide de mes étudiants qui m'auront apporté un sacré coup de main. Pour votre moral et pour vous être autant acharné.e.s que moi, merci Martin, Clémence, Emilie et Julie, vous êtes les piliers de cette thèse (en espérant ne pas vous avoir dégouté.e.s du monde de la recherche). Merci également à Corinne qui n'aura cessé de me donner des idées et astuces pour résoudre mes problèmes de biologie moléculaire (une pensée à Nono le lapin dont la crotte aura contribué à servir de témoin positif pour l'amplification d'archées). Un merci également à Claudia qui m'a formée à la biologie moléculaire et qui m'a souvent débloquée dans les analyses bioinformatiques.

Enfin, je voudrais remercier ma direction de thèse, sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour (c'est évident) avec une pensée particulière pour JC (ce n'est pas Jésus Christ) qui m'aura accompagnée du début à la fin, à relire mes travaux, à m'aider sur les analyses et à me donner de nouvelles idées. Merci Sébastien et Thierry pour avoir également contribué à mes travaux (et oui, les pets et les cacas de poissons passionnent vraiment du monde) et à avoir eu un œil attentif sur le bon déroulement de cette thèse.

Plan de thèse

Sommaire des illustrations et tables	9
1. Introduction	19
1. I – Le microbiome, un organe à part entière	19
1. I. A - Un peu d'évolution et d'épistémologie sur les microbiomes.....	21
1. I. B – Les microbiomes comme métacommunautés.....	25
i) Dispersion	26
ii) Sélection.....	29
iii) Dérive.....	36
iv) Diversification.....	36
1. I. C – Rôles des microbiomes	40
1. II- Cas du microbiome des poissons téléostéens	43
1. II. A- Description du microbiome des poissons téléostéens.....	45
i) L'eucaryome	47
ii) L'archaeome.....	47
iii) Le virome	48
iv) Le bactériome.....	49
1. II. B - Déterminants du microbiome des poissons téléostéens	50
i) Facteurs extrinsèques	50
ii) Facteurs biotiques.....	53
1. II. C - Rôles du microbiome intestinal des poissons	59
1. II. D - Cas du microbiome des poissons coralliens	61
i) Les récifs coralliens.....	61
ii) Les poissons coralliens et leur rôle pour les services écosystémiques	62
iii) Les microbiomes associés aux poissons coralliens	65
1. III – Objectifs de la thèse.....	73
2. Méthode d'analyse du microbiome entérique des poissons récifaux.....	77
2. I - Collecte des échantillons	79
2. I. A- Campagnes de prélèvements.....	79
i) La pêche	80
ii) La collecte des données biométriques	81
iii) Dissection.....	82
2. I. B- Extraction des acides nucléiques	85
2. II – Mesure de la diversité taxonomique	87
2. II. A- Le bactériome	87
i) Amplification par PCR.....	87
ii) Traitement bioinformatique des séquences	88
iii) Calcul du core microbien	89
2. II. B- L'archaeome	91
2. III – Mesure de la diversité fonctionnelle.....	93
2. III. A- Par amplification (q)PCR.....	93
i) Données du metabarcoding de l'ARNr 16S	93
ii) PCR et qPCR de gènes fonctionnels	94
2. III. B - Par chromatographie sur phase gazeuse	96
i) Extraction des gaz	96
ii) Chromatographie sur phase gazeuse	96
3. Inventaire du core microbien	99
3. I – Inventaire du bacteriome : Manuscrit A	99
3. II – Inventaire de l'archaeome : Manuscrit B	101
4. Déterminants biotiques	147

4.	I – Effet de la phylogénie : Manuscrit C.....	147
4.	II – Effet du régime alimentaire : Manuscrit D.....	147
5.	Déterminants extérieurs	215
5.	I - Réponse du microbiome à la transition d'un régime corallien à un régime de macroalgue : Manuscrit E.....	215
6.	Conclusions et perspectives	239
6.	I - Quel est l'inventaire microbien du tractus digestif des poissons coralliens ?	239
6.	I. A - Un microbiome bactérien, très variable, spécifique du tractus entérique et du domaine marin.	239
6.	I. B- Les poissons n'émettent pas de méthane	242
6.	II- Quels sont les déterminants intrinsèques expliquant la structure du microbiome ?	245
6.	II. A - La phylogénie.....	245
6.	II. B - Le régime alimentaire.....	248
6.	III- Y a-t-il une influence d'un changement de récif corallien à un récif à dominance algale sur le microbiome?.....	251
7.	Références bibliographiques	255
8.	Annexes	305
8.	I. Protocoles expérimentaux	305
8.	I. A – Protocole d'extraction des acides nucléiques à partir du kit MagAttract PowerSoil®	305
8.	I. B – Expérience de mesure du méthane in vivo	310
8.	II. Informations supplémentaires	313
8.	II. A – Supplementary material – Manuscrit A	313
8.	II. B – Supplementary material – Manuscrit B.....	317
8.	II. C – Supplementary material – Manuscrit C.....	321
8.	II. D – Supplementary material – Manuscrit D	333
8.	II. E – Supplementary material – Manuscrit E	341
8.	III – Collaborations Megafauna.....	353

Sommaire des Illustrations et Tables

-Chapitre 1-

Figure 1.1.1 : Nombre d'articles publiés par an sur les études associées au microbiome des humains (en rouge), des métazoaires terrestres (en vert) et aux métazoaires aquatiques (en bleu) depuis 1985. La recherche a été effectuée sur Web of Science avec les mots clés : (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) AND human* pour les humains ; (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) NOT human* AND (animal* OR metazoa*) NOT (sea OR freshwater OR marin*) pour les animaux terrestres ; et (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) AND (animal* OR metazoa*) AND (sea OR freshwater OR marin*). 24

Figure 1.1.2 : Schéma des mécanismes structurant la métacommunauté. Celle-ci est expliquée par quatre processus de dispersion, sélection, diversification et dérive. Les facteurs impliqués dans ces processus peuvent être d'origine biotique (en rouge), extrinsèques à l'hôte (en vert) et liés aux microbiomes (en bleu) (adapté de Walter, 2015). 25

Figure 1.1.3 : Habitats microbiens dans le tractus intestinal humain. Les phyla bactériens dominants dans le tractus intestinal humain sont les *Bacteroidetes* (en vert), les *Firmicutes* (en violet), les *Proteobacteria* (en orange), les *Actinobacteria* et les *Verrucomicrobia* (non représentés ici). Les familles bactériennes dominantes dans le petit intestin et dans le colon reflètent les différences physiologiques le long du transit. Par exemple, un gradient d'oxygène, la concentration des peptides antimicrobiens (dont les acides biliaires) et le pH régulent la densité bactérienne des communautés intestinales, avec des charges importantes dans le colon. *cfu = Colony forming units. Figure reprise de Donaldson *et al.*, (2015). 31

Figure 1.1.4 : Diversité des interactions microbiennes. La compétition survient entre deux espèces utilisant la même niche écologique et les mêmes ressources. La sélection naturelle va ainsi favoriser la plus adaptée et moduler les compositions microbiennes avec l'extinction de certaines espèces au profit du développement d'autres. L'amensalisme, à l'instar de la compétition, va nuire à une espèce sans favoriser l'autre. La modulation des conditions physico-chimiques de la niche par une espèce (expression d'enzyme antibactérienne et antifongique) peut ainsi limiter le développement de certaines espèces sensibles à ces produits métaboliques. Lorsque cette nuisance apporte un bénéfice à l'autre espèce, nous parlerons de prédation (dans le cas d'une relation trophique où un control top-down peut régir sur le développement des espèces microbiennes, comme c'est le cas avec les bactériophages) ou de parasitisme (notamment entre les bactéries et les champignons). Des bénéfices peuvent être attribués sans retour d'une espèce à une autre, c'est le cas du commensalisme, où la présence d'une espèce va favoriser le développement d'une autre. Lorsque ce bénéfice est mutuel entre les deux espèces, nous parlerons de mutualisme, qui va dominer de façon importante dans les réseaux microbiens. Enfin, deux espèces peuvent prospérer sans aucune interaction, c'est le neutralisme. Les espèces partagent la même niche écologique avec une ressource illimitée. 32

Figure 1.1.5 : Schéma expliquant les quatre processus d'évolution du système hôte-microbiome. Les phénomènes de co-occurrence dans le système hôte-microbiome peuvent être expliqués par quatre processus évolutifs. L'hôte et son microbiome peuvent se co-spécifier (trait rouge) ; le microbiome peut se diversifier au sein d'un hôte (trait rose) ; certaines espèces microbiennes peuvent passer d'une espèce hôte à une autre ; ou bien s'éteindre (adapté de Groussin *et al.*, 2020). 37

Figure 1.1.6 : Les holobiontes sont des entités comprenant l'hôte et tous ses microbiomes, incluant ceux qui affectent le phénotype de l'holobionte et qui ont co-évolué avec l'hôte (en bleu), ceux qui affectent le phénotype de l'hôte sans avoir co-évolué avec (en rouge), et ceux qui n'affectent pas le phénotype de l'hôte (en gris). Les microorganismes peuvent être transmis verticalement ou horizontalement, peuvent être acquis de l'environnement, et peuvent être transitoires ou permanents. Ainsi, les phénotypes de l'holobionte peuvent changer dans le temps et l'espace, en fonction des microorganismes transitant dans l'holobionte. Les microorganismes environnementaux ne font pas partie de l'holobionte (en blanc). Figure tirée de Theis *et al.*, 2016. 39

Figure 1.2.1 : Nombre d'articles publiés par an sur les études associées au microbiome des métazoaires terrestres sans l'humain (en vert) comparés aux poissons (en bleu) depuis 1985. La recherche a été effectuée sur Web of Science avec les mots clés : (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) NOT human* AND (animal* OR metazoa*) NOT (sea OR freshwater OR marin*) pour les métazoaires terrestres ; et (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) AND (animal* OR metazoa*) AND (fish* OR teleost* OR actinopteryg*) pour cibler les études sur les poissons. 45

Figure 1.2.2 : Colonisation et établissement du microbiome pendant le développement. Ce schéma représente le développement d'un poisson en association avec ses microbiomes (les couleurs représentent différents taxa). **(1)** Les microorganismes libres colonisent le chorion de l'œuf. La variabilité du microbiome en fonction des espèces de poissons suggère des interactions spécifiques très tôt dans le développement qui sont régies par les précurseurs de l'immunité innée (symbolisé par les triangles et les carrés sur la surface du chorion). **(2)** L'œuf éclot, la larve est colonisée par les microorganismes environnementaux et ceux initialement présents sur le chorion. **(3)** La première colonisation du tractus digestif débute lors des premiers repas. Les taxa microbiens ressemblent, dans un premier temps, à ceux associés aux ressources alimentaires. **(4)** Le microbiome se développe et s'enrichit **(5)** Le microbiome adulte est un assemblage divers de taxa microbiens. Des différences existent entre les communautés cutanées et intestinales, également spécialisées en fonction des différentes niches le long du tractus et sur l'ensemble du corps. De potentielles transmissions verticales ont été observées chez certaines espèces mais restent encore mal connues. Figure tirée de Llewellyn et al. (2014)... 51

Figure 1.2.3 : Déterminants majeurs des communautés microbiennes associées aux poissons. Les facteurs extrinsèques comme la chimie de l'eau (*i.e.* température, salinité) vont directement sélectionner les microbiomes, voire les déséquilibrer en cas de parasitisme, pollution ou de stress. Les interactions entre les hôtes ou avec un type de ressource nutritionnelle (*i.e.* nature de la proie) va également favoriser les transmissions horizontales et permettre la colonisation de certains microorganismes qui seront sélectionnés par les facteurs biotiques. Ces derniers sont directement liés aux traits fonctionnels de l'hôte (*i.e.* régime alimentaire, comportement) et à sa génétique (*i.e.* structures anatomiques, système immunitaire). 53

Figure 1.2.4 : Représentation schématique des compositions microbiennes au niveau du Phylum selon les observations générales trouvées dans la bibliographie. Le microbiome cutané est fortement similaire à celui des nageoires bien que des différences entre individus et entre espèces puissent survenir, suggérant l'influence de processus stochastiques (Chiarello *et al.*, 2015; Gallet *et al.*, 2019). Le mucus présent à la fois sur la peau, les branchies, la cavité buccale et le système olfactif semble favoriser l'installation et le développement des même

phyla microbiens (Lowrey *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2018; Gallet *et al.*, 2019; Rosado *et al.*, 2019; Brown *et al.*, 2019; Legrand *et al.*, 2020). Ces niches écologiques exposées à l'environnement sont pourtant constituées de microorganismes différents des communautés planctoniques. Elles se distinguent également des communautés entériques, majoritairement constituées d'espèces anaérobies (Sullam *et al.*, 2012; Llewellyn *et al.*, 2014; Egerton *et al.*, 2018a) sélectionnées par les différentes micro-niches écologiques le long du transit digestif (Ringø *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2017). 55

Figure 1.2.5 : Représentation des différents types d'appareils digestifs chez les poissons marins. Environ 20% d'espèces comme les gobies ou les blennies n'ont pas d'estomacs mais peuvent présenter d'autres structures comme un pharynx ou une vésicule biliaire. L'estomac, quand il est présent, peut également présenter différentes formes : I chez les mulets, les anchois ou les aloses, U chez les omnivores et carnivores comme le bar et les *Salmonidae*, Y avec la présence d'un caecum gastrique chez les macrophages comme les anguilles. Figure reprise de Egerton *et al.* (2018). 57

Figure 1.2.6 : Arbre phylogénétique des poissons coralliens et leur taux de diversification. Les branches bleues représentent des taux de diversification faibles, le jaune des taux intermédiaires et le rouge, des valeurs de forte diversification. Les arcs extérieurs représentent le taux de diversification médian pour chaque famille représentée par leur silhouette respective, issues du package R *fishualize* (Schiettekatte *et al.*, 2020). Figure reprise de Siqueira *et al.*, 2020. 63

Figure 1.3.1 : Schéma représentant le plan de thèse en trois objectifs. Les manuscrits répondant aux différentes problématiques posées sont écrits en rouge. 74

Table 1.1.1 : Références sur les menaces pesant sur les associations hôtes-microorganismes. La plupart des études sont basées sur des modèles terrestres et sur leurs microbiomes digestifs. Pourtant les menaces sont diverses et semblent impacter tous les compartiments microbiens associés aux animaux, y compris ceux associés aux mondes aquatique et marin. 34

Table 1.2.1 : État de l'art des 35 publications faites sur les poissons coralliens et leurs microbiomes associés. Les microbiomes associés au tractus digestif, à la peau et aux branchies représentent la majorité des études et se concentrent principalement sur les modèles herbivores ou coralivores (*i.e.* *Acanthuridae*, *Scaridae*, *Chaetodontidae*) et les poissons à intérêt aquariophiles (*i.e.* *Pomacentridae*, *Labridae*). Au total, 101 espèces ont été étudiées pour leur microbiome entérique, 61 espèces pour le microbiome cutané, 46 espèces pour le microbiome branchiale, 3 espèces pour le microbiome buccale, 2 pour le microbiome des œufs et une seule pour le microbiome du sang. Le nombre d'espèces étudiées par type de microbiome est représenté dans la colonne N. 67

-Chapitre 2-

Figure 2.1.1 : Carte d'échantillonnage dans la zone Caraïbienne avec la Martinique (à gauche) et de l'océan Indien (à droite) avec les îles Eparses (Europa et Juan de Nova) et les îles Seychelles. 79

Figure 2.1.2 : Mise en place d'un filet maillant dans le récif pour le projet Megafauna. Placés entre ou autour des amas coralliens, ils nous permettaient de récolter un grand nombre

d'espèces et d'individus de petites tailles, qui n'auraient pu être pêchés au harpon. Par ailleurs, cette technique était plus appréciée que la pêche au harpon qui pouvait perforer le tractus intestinal ou abimer l'individu et ainsi induire une contamination pour le prélèvement du microbiome intestinal, ou empêcher des études de morphométries. 80

Figure 2.1.3 : Photo illustrant la dissection du tractus intestinal d'un poisson coffre à cornes (*Acanthostracion polygonius*) des Caraïbes. Les sections IV et V correspondantes à l'intestin terminal sont celles utilisées pour l'étude du microbiome durant cette thèse. 83

Figure 2.2.1 : Distribution d'abondance d'ASVs. L'occurrence de chaque ASV est représentée en fonction de son indice de dispersion. La ligne en pointillée représente la limite de l'intervalle de confiance de la distribution de Khi^2 à 2.5%. Les ASVs présents sous cette ligne représentent les ASVs aléatoirement distribués et sont donc considérés comme ASVs satellites. 90

Figure 2.2.2 : Schéma récapitulatif des différents couples d'amorces de l'ARNr 16S. Le gène 16S s'étend de la région hypervariable V1 à V9, pour lequel plusieurs couples ont été testé sur différentes région (trait au de dessus des couples). Les couples sont séparés par ; et sont présentés sous la forme amorce sens /amorce anti-sens. 91

Figure 2.3.1 : Schéma illustratif du fonctionnement d'un CPG. La substance est introduite par l'injecteur et va passer au travers d'une colonne capillaire pour la rendre volatile. Cette colonne se termine sur un détecteur de conductibilité thermique (TCD) sous la forme d'un bloc catharomètre (A) ou bien par un détecteur à ionisation de flamme (FID) où le courant gazeux issu de la colonne va pénétrer dans la flamme d'un brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées qui vont alors former un courant ionique dans l'électrode collectrice (B). Le courant produit émet un signal générant un chromatogramme dont l'aire présente sous le pic est proportionnelle à la masse de soluté présent dans le mélange injecté (ici l'air). Chaque soluté est caractérisé par un temps de rétention (C). 97

-Chapitre 3-

Figure 3.1.1 : Dissimilarité entre les communautés planctoniques et les communautés microbiennes cutanées associées aux poissons récifaux de Mayotte. (A) Visualisation par PCoA des microbiomes cutanées et planctoniques basée sur la distance pondérée Unifrac (« Weighted Unifrac »). Chaque point représente une communauté (*i.e.* échantillon d'eau de mer ou un poisson). Ces communautés sont significativement différentes (PERMANOVA : $R^2 = 0.14$; $p = 0.001$). La forme et la couleur des points indiquent le type de communauté et l'ordre taxonomique du poisson. L'effet espèce est l'un des plus important dans la composition des microbiomes (PERMANOVA : $R^2 = 0.44$; $p = 0.001$). (B) Les valeurs de dispersion avec l'indice pondéré Unifrac sont toutes significativement différentes entre les communautés planctoniques ($n = 35$ échantillons), les communautés cutanées et planctoniques ($n = 173$), entre les individus d'une même espèce ($n = 34$ espèces avec plus d'un individu) et les individus de différentes espèces ($n = 44$ espèces). Figure et résultats tirés de Chiarello *et al.*, (2018). 99

-Manuscrit A-

Figure 1 : Phylogenetic tree of the 101 coral reef fish species sampled. Each color node corresponds to the diet of the species according to Mouillot *et al.*, (2014). The phylogeny of

fish was inferred following the fish tree of life (<https://fishtreeoflife.org/>) (Rabosky et al., 2018)..... 109

Figure 2 : Treemaps of the core microbiomes associated with reef fish gut (A), sediment (B) and seawater (C) 115

Figure 3 : Diversity comparisons between core microbiomes of reef fish gut (red), sediment (Sed. ; gray) and seawater (blue). Alpha diversity is represented by the richness observed and the Shannon index transformed in effective number of species (ENS) (A). The beta-diversity is calculated with the Bray-Curtis index between pairs of samples and visualized with a Principal Coordinates Analysis and the Local contribution to Beta diversity (LCBD) (B). Significant codes for p-value : *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not (NS.)..... 116

Figure 4 : Venn diagram of the core ASVs between gut, sediment and seawater microbiomes..... 117

Figure 5 : Maximum parsimony phylogenetic tree of the 2 080 ASVs from the reef fish gut core microbiome. The 16S rRNA sequences were inserted into the original SILVA (release 138.1) tree using parsimony criteria with the Bacteria filter excluding highly variable positions. The inner ring represents the taxonomy provided by default in the SILVA bacterial tree. The three outer rings depict the habitat preferences of each ASV described here as three categories (i.e. compartment, host and organ) clustered from the environmental information associated with each closest blast. The tree was drawn using the web-based interface interactive tree of life (iTOL). Abbreviations : Eu. = *Euryarchaeota* ; T. = *Thaumarchaeota* ; E. = *Elusomicrobia* ; S. = *Synergistetes* ; Cyano. = *Cyanobacteria* ; Actino. = *Actinobacteria* ; Tene.= *Tenericutes* ; D. = *Deferribacteres* ; A. = *Acidobacteria* ; K. = *Kiritimatiellaeota* ; Verruco. = *Verrucomicrobia* ; Spiro. = *Spirochaetes* ; Fuso. = *Fusobacteria*. 118

Table 1 : Primers set and their respective protocol used for the amplification of the 16S rRNA and functional genes of methanogens (*mcrA*) and sulfate-reduction (*dsrB*)...... 131

Table 2 : Studies which have investigated the archaeal diversity associated with fish gut. W = Wild ; C = Captive 136

Supplemental Table 1 : Ecological traits of the sampled reef fish (n = sampling size).. 314

-Manuscript B-

Figure 1 : Taxonomic diversity of the gut microbiome of coral reef fishes assessed with universal-targeted 16S rRNA gene primers. Archaeal ASVs which represent 0.05% of the gut microbiome are represented in a treemap. 133

Figure 2 : Venn diagram representing the number of archaeal ASVs specific to and shared between gut microbiomes of reef fishes (19 species), sediment and seawater. 138

Figure 3 : Amplification success of the *mcrA* and *dsrB* genes. Number of samples which had amplified (in red) or not (grey) are represented across fish families (A ; C) and trophic guilds (B ; D). 141

Figure 4 : Relative contribution of predictional genes associated to sulfate-reduction (in gray) and to methanogenesis (in red) between fish families. Sulfate-reduction enzymes were predicted with the four genes coding for the adenylylsulfate reductase, subunit A and B [EC : 1.8.99.2] and the sulfite reductase dissimilatory-type, subunit A and B [EC: 1.8.99.3]. Methanogenesis enzymes were predicted with the five genes coding for the methyl coenzyme reductase, subunit A,B and G [EC: 2.8.4.1]. 142

Figure 5 : Relative abundances of sulfate-reducing bacteria in the gut microbiome of fish families. ASVs were assessed with universal-targeted 16S rRNA gene primers. 143

Supplemental Table 1 : Ecological traits of the sampled reef fish (n = sampling size).. 318

-Manuscript C-

Figure 1 : Fish phylogenetic tree with respective core bacteriome and followed by fish metadata. The dated fish phylogeny was obtained from Rabosky *et al.* (2018). From inner to outer, the data mapped onto the tree is the relative abundances of microbial phyla in each host (relative abundances are an estimated average generated from all samples for each host species), fish dietary classes, fish oceanic region and fish family. 160

Figure 2 : Alpha diversity of all fish species, organized by host phylogenetic affiliation. The phylogeny is based on the Rabosky *et al.* (2018) fish phylogeny. Four complementary diversity indices were computed to assess the taxonomic (*i.e.* observed richness and Shannon's index H exponentially transformed in Effective Number of Species (ENS)) and phylogenetic (*i.e.* Faith PD and Chao1 index facets of diversity. Fish families are color coded. Individual fish species displaying alpha diversity indices differing significantly from random expectation (local Moran index (I_i) test) are indicated with a star. Local Moran index for each fish species is plotted in **Supplemental Figure 1** and values are available in **Supplemental File 2**..... 165

Figure 3 : Beta-diversity values for the Bray-Curtis, the Unweighted (U-Uni) and the Weighted Unifrac (W-Uni) distances, among **(A)** fish species (n = 48 species with more than 2 individuals), and among **(B)** fish families (n = 19 with more than 2 individuals). 167

Figure 4 : Mantel tests assessing the degree of correlation between fish evolutionary distances in million years (My) and bacteriome Bray-Curtis dissimilarities (left panel). Within trophic guilds, carnivores and herbivores show a strong correlation between fish divergence time and bacterial community dissimilarity, but omnivores do not (Right panel). Mantel results are presented at different scales and for other dissimilarity metrics in the **Table 1** and in the **Supplemental Table 1**. 168

Figure 5 : Tanglegram illustrating the topological relationships between fish phylogeny and microbial communities clustered with an UPGMA algorithm. Topological congruencies are quantified by the normalized Robinson-Foulds (nRF) metric, which takes into account symmetry in rooted tree shape on a scale from 0 (complete congruence) to 1 (incomplete incongruence). Parallel lines connect species whose position is concordant between host phylogeny and microbiota dendrogram. Host species and their microbiome are colored following a gradient by phylogenetic proximity. 170

Figure 6 : Principal Coordinates Analysis (PCoA) plot illustrating Bray-Curtis distance between pairs of bacteriome samples. Bacteriomes are colored according to their families following a gradient by phylogenetic proximity and are plotted in the same window. 171

Figure 7 : Bacteriome phylogenetic tree of major phyla and sub clades identified as CTUs with the branches colored following their Mantel correlation coefficient for all species (left) and faceted for carnivores and herbivores dietary strategies (right). Values of the Mantel test are available in the **Supplemental Table 1**. 174

Figure 8 : Patterns of conserved bacterial eco-phylogenetic groups across the fish phylogeny. The 900 eco-phylogenetic groups that were conserved significantly ($p \leq 0.05$) in at least one fish family are plotted as columns in a heatmap that illustrates their occurrence across the fish phylogeny. Black ticks indicate an eco-phylogenetic group was detected in a given fish family. 175

Supplemental Figure 1 : Species abundance distribution (SAD) pattern of bacterial ASVs in the fish gut. Occurrence of each ASV is plotted against its dispersion index. The line depicts the 2.5% confidence limit of the Chi2 distribution: ASVs falling below this line follow a Poisson distribution and are randomly dispersed within bacteriomes. 328

Supplemental Figure 2 : Alpha diversity of gut bacteriome between trophic guilds in bold (*i.e.* Carnivores, Omnivores and Herbivores) and the intra-dietary levels. Alpha diversity is expressed in phylogenetic diversity (PD) with the Faith's index (A) and in taxonomical diversity with the observed richness (B) and the Shannon's index H exponentially transformed in Effective Number of Species (ENS) (C). 329

Supplemental Figure 3 : Fish gut bacteriome dissimilarities between individuals of the same fish species (*i.e.* intraspecific, $n = 101$ species with more than 1 individual) and among individuals from different species (*i.e.* interspecific, $n = 101$ species). Dissimilarities were calculated using the Bray-Curtis, Weighted Unifrac and Unweighted Unifrac metrics. Boxes represent the interquartile range dissimilarity values. Thick bars represent the median of dissimilarity values, and vertical segments extend to the fifth and the 95th percentiles of the distribution of values. Horizontal brackets indicate pairs which differ significantly: *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05) or not (NS.) with a Wilcoxon test. 330

Supplemental Figure 4 : Krona chart of the enteric bacteria represented by the 900 CTUs conserved ($p < 0.05$) from coral fish species. 331

Table 1 : Phylosymbiosis and Co-phylogeny results resulting from the Mantel test, the normalized Robinson-Foulds (nRF) and the normalized Matching cluster (nMC) analyses. The Mantel test is based on Spearman correlations between host divergence and bacteriome beta dispersion. The nRF and the nMC are based on the topology of the phylogenetic relatedness for bacteriome considering all bacteria and phylogenetic tree of hosts (**See the Supplemental Table 1 analyses on bacterial Order and Family levels**). The resulting scores are comprised between 0 (complete congruence) and 1 (complete incongruence). P-values for nRF and nMC were determined by the probability of 10 000 randomized dendrogram topologies yielding equivalent or more congruent phylosymbiotic patterns than the actual microbiota dendrogram. All tests were proceeded on the Bray-Curtis (BC), W-Uni (Weighted Unifrac) and U-Uni (Unweighted Unifrac) bacteriome matrices for n sampling size of species. Codes for p-value : *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not ($0.05 < NS < 0.1 < NS$). 169

Table 2 : Results of the PERMANOVAs for the Bray-Curtis (BC), Unweighted-Unifrac (U-Uni) and the Weighted-Unifrac (W-uni) indices to test the effect of the taxonomy (family, genus, species), the diet (trophic guilds and intra-dietary classes) and the region. The host community (with n = sampling size) was tested at global (full dataset), dietary and taxonomical scales. When it was able, the influence of the region was tested inside the species. Codes for p-value : *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not, even with a low probabilities $p \leq 0.1$ (NS*). For each test, only triplicates were considered, if not, the test was not proceeded (-)..... 172

Supplemental Table 1 : Phyllosymbiosis and Co-phylogeny results resulting from the Mantel test, the normalized Robinson-Foulds (nRF) and the normalized Matching cluster (nMC) analyses for bacteriome considering the conserved bacterial lineages from the ClaaTU analyses. The resulting normalized scores nRF and nMC are comprised between 0 (complete congruence) and 1 (complete incongruence). P-values were determined by the probability of 10 000 randomized dendrogram topologies yielding equivalent or more congruent phyllosymbiotic patterns than the actual microbiota dendrogram. All tests were proceeded on the Bray-Curtis (BC), W-Uni (Weighted Unifrac) and U-Uni (Unweighted Unifrac) bacteriome matrices. Codes for p-value : *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not ($0.05 < NS^* < 0.1 < NS$). 322

-Manuscript D-

Figure 1 : Relative composition of the core gut microbiome of coral reef fishes according to their predicted diet modelled by Parravicini et al., 2020. Microbial constitution are represented in levels of (A) Phylum, (B) Class, and (C) Genus. *HMD = Herbivores Microvores Detritivores..... 195

Figure 2 : Alpha diversity of gut bacteriome expressed in taxonomic diversity with the Shannon's index H exponentially transformed in Effective Number of Species (ENS) and the phylogenetic equivalent with the Chao1 index. (A) Alpha-diversity boxplots of 8 dietary classes predicted by Parravicini et al., 2020. Significant results ($p \leq 0.05$) ensuing from Dunn pairwise tests are available in the **Table 1**. (B) Correlation between alpha-diversity and the trophic position of species. Codes for p-value: *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not (NS). HMD* = Herbivores Detritivores Microvores 196

Figure 3 : Gut core microbial variability in dietary classes. (A) Principal Coordinates Analysis on the core gut microbiome according to the diet predicted. PERMANOVA proceeded indicated that this effect explained significantly 11% of the variability of microbial composition. (B) The LEfSe result obtained does not indicate any discriminant at diet predicted level but exhibited significant (LDA score ≥ 2.0) Genera at trophic guild scale (carnivore in red, herbivores in green and omnivores in blue). HMD* = Herbivores Detritivores Microvores 199

Figure 4 : Top 10 of metabolic pathways at level B related to the core gut microbiome of coral reef fishes in each predicted diets modelled by Parravicini et al., 2020. Those pathways constitute 61% of the genes predicted by the Tax4Fun2 algorithm. 203

Figure 5 : Variability of the predicted functions obtain with Tax4Fun2 algorithm associated to the gut core microbiome in dietary classes. (A) Principal Coordinates Analysis on the Kegg Orthologs according to the diet predicted. PERMANOVA proceeded indicated that this effect explained significantly 20% of the variability of KOs constitution. (B) The

LEfSe result obtained exhibited significant (LDA score ≥ 2.0) predicted genes associated to KOs at trophic guild scale (carnivore in red, herbivores in green and omnivores in blue).... 205

Figure 6 : Heatmap of potential functional genes predicted in the carbohydrate, chitin, uric acid, sugar and amino acid metabolisms. important for carnivores, omnivores and herbivores..... 206

Supplemental Figure 1 : Rarefaction curve for gut bacteriome of herbivores (green), carnivores (red) and omnivores (blue), after a rarefaction at 1 060 sequences in each sample. The dotted line represents the number of sequences at which 99 % of the diversity is reached in all samples determined by the Good's coverage estimator. 337

Supplemental Figure 2 : Beta diversity of fish gut core bacteriomes. Principal coordinates analysis (PCoA) plots illustrating distances between pairs of all bacteriome samples (A-B) and within bacteriomes of carnivorous samples (C-E) using Unweighted (A-D), Weighted (B-E) and Bray-Curtis (C) metrics. Bacteriomes are colored according to the dietary strategy predicted by Parravicini et al., 2020. The p and R² values of a PERMANOVA testing whether the dietary strategy has an influence are reported. 338

Supplemental Figure 3 : Effect of the trophic strategy (A) and the trophic position (B) on the beta-diversity for the Bray-Curtis, the Unweighted (U-Uni) and the Weighted Unifrac (W-Uni) distances. The Spearman rank test is used to test the correlation between the dispersion (distance to the centroid of each sample). Lines red indicate a significant correlation ($p \leq 0.05$). 339

Supplemental Figure 4 : Significant contribution (LDA score > 2) at functional level B in trophic guild after LEfSe algorithm. 340

Table 1 : P-values resulting from the pairwise Dunn test on the taxonomic richness (lower half) and phylogenetic diversity (upper half) on the dietary classes at high levels (in upper case) and finer levels following the classification of Parravicini et al., 2021 (lower case). Significant p-values ($p \leq 0.05$) are indicated in bold..... 197

Table 2 : Unique gut microbes found at genus level in five dietary classes. The occurrence corresponds to the number of individuals which load the genus with their mean relative abundance inside their host. 200

Table 3 : Spearman correlation results between the alpha diversity (Shannon entropy), the trophic level, the beta diversity (dispersion) and the abundance of *Staphylococcus* and *Vibrio* in the core microbiome of reef fish. Significant results ($p \leq 0.05$) are indicated in bold..... 202

Supplemental Table 1 : Sampling size of host fish species with their corresponding diet (according to the prey items indicated in FishBase) and their diet predicted (following the model of Parravicini et al., 2020). *HMD = Herbivores Microvores Detritivores. 334

-Chapitre 5-

Figure 5.1.1 : Transition ("Shift") d'un récif corallien à un récif dominé par des macroalgues et du turf. Les photos ont été prises par Olivier Borde (Gauche) et Nick Graham (Droite). 215

-Chapitre 6-

Figure 6.1.1 : Distribution des ASVs chez les poissons coralliens. La plupart des ASVs sont rares et sont présents chez peu d'individu (faible occurrence). En moyenne, un ASV est distribué chez seulement 3 individus. Le 1% des ASVs présents à forte occurrence constitue des taxa essentiellement spécifiques des tractus digestifs (*i.e. Clostridiales, Vibrionales*)... 241

Figure 6.1.2 : Schéma d'un mésocosme pour servir de chambre de mesure pour les gaz émis par les poissons. Les molécules volatiles seraient directement concentrées dans la phase gazeuse hermétique qui serait connectée à un septum permettant une prise de mesure. Ce mésocosme permettrait d'incuber des poissons sur une période plus longue que la précédente expérience que j'avais faite. 243

Figure 6.1.3 : Processus simplifié de la chaîne détritique anaérobie en 3 étapes. Les polymères issus de l'alimentation sont hydrolysés en monomères par une première fermentation. Les monomères sont ensuite transformés en alcools, dihydrogène, CO₂ et acides organiques à courtes chaînes (*e.g.* acétate, formate). La présence en sulfate SO₄²⁻ dans le milieu marin (*i.e.* eau de mer, algues) favorise la sulfato-réduction comme processus de fermentation des seconds produits, à l'instar de la méthanogenèse. 244

Figure 6.2.1 : Deux groupes phylogénétiquement et morphologiquement distincts d'*Epulopiscium*. Les forces déterminantes qui influencent la distribution et l'évolution de cette bactérie chez les poissons coralliens et, plus largement, dans le règne animal, sont encore à élucider. Il se peut que cette bactérie ne soit pas seulement symbionte des *Acanthuridae* mais plutôt généraliste des poissons coralliens. L'existence de ces deux groupes distincts, qui semblent être distribués de façon spécifique chez les *Acanthuridae* et chez les autres espèces, peut suggérer des rôles distincts apportés à leurs hôtes avec une co-évolution propre à chaque groupe. 248

Figure 6.3.1 : Le phénotype étendu chez les herbivores. Leur microbiome est adapté pour dégrader les macroalgues à travers de multiples processus de fermentation incluant plusieurs clades microbiens (*i.e.* syntrophie). Grâce aux rôles du microbiome dans les processus digestifs, les herbivores peuvent dégrader l'abondance macroalgale de plus en plus dominante dans les récifs coralliens. Par ce biais, cet holobionte contrôle, par la prédation, le développement de celles-ci et peuvent ainsi favoriser la résilience des coraux. 252

1. Introduction

1. I – Le microbiome, un organe à part entière



“Les animaux sont peut-être la cerise de l’évolution mais les bactéries en sont certainement le gâteau”, Andrew Knoll

1. I. A – Un peu d'évolution et d'épistémologie sur les microbiomes

Le monde est façonné de microorganismes, que ce soit des bactéries, archées, virus et eucaryotes unicellulaires. Si nous devions reprendre l'année calendaire de l'histoire de la Terre, les procaryotes seraient là depuis fin février, alors que les premiers organismes multicellulaires n'apparaîtraient que fin septembre. Responsables de l'oxygénation de nos océans puis de notre atmosphère il y a 2.5 Milliards d'années grâce à la photosynthèse, les microorganismes perpétuent leur rôle au sein de la boucle microbienne en jouant un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques, notamment dans le recyclage de la matière et dans la séquestration du carbone. Les microorganismes grouillent littéralement sur Terre avec une biomasse qui équivaut aujourd'hui à 17% de la biomasse totale sur Terre, après les plantes. Dans les océans, cette biomasse atteint les 70%, avec ~ 1 milliard de bactéries/litre et 10 fois plus de virus (Hendrix, 2002), allant jusqu'à atteindre 90% dans les aquifères et en sous-sols (Bar-On *et al.*, 2018). Leur présence est ubiquiste, que ce soit dans les eaux abyssales, leurs roches souterraines, ou même dans les déserts glaciaux de l'Antarctique et arides du Sahara. Ils nous surplombent également en étant présents dans les nuages, et nous entourent dans notre mobilier, nos animaux et nous-mêmes. L'évolution des métazoaires s'est donc déroulée parmi eux mais également à partir d'eux. Les eucaryotes proviennent d'un ancêtre commun de ~ 2 milliards d'années, qui résulterait d'une fusion entre une bactérie et une archée. Ce scénario est encore en débat, mais serait celui de la plus grande symbiose à partir de laquelle nous puisons notre origine : la théorie de l'endosymbiose (Lane and Martin, 2015; Martin *et al.*, 2015; Archibald, 2015). De cette union, nous dénombrons une diversité d'espèces approximant 370 000 végétaux, 5 millions d'insectes, 28 000 poissons et 5 500 mammifères.

Malgré leur importance dans l'évolution de la Terre et de ses habitants, leur découverte n'est que relativement récente et la compréhension de leur diversité et fonctionnement reste encore bien méconnue. Le premier explorateur du monde microbien fut le drapier hollandais Antonie van Leeuwenhoek, qui mit au point au XVIIe siècle le premier microscope capable d'atteindre un grossissement de 270 fois, soit ~5 fois supérieur à celui des microscopes complexes du polymathe anglais Hooke. Examinant les liquides turbides des eaux de lacs, il s'aperçut que celles-ci grouillaient de minuscules créatures dansantes qu'il nomma par la suite "animalcules" (Leeuwenhoek, 1674). Il fut ainsi le premier à avoir pu observer des microorganismes issus de sources différentes comme les eaux de bassins, les eaux de pluies et

même de ces dents. Malheureusement, ses découvertes n’eurent que peu de succès auprès de la communauté scientifique, qui était principalement concentrée sur les pathogènes humains et les maladies infectieuses associées. Ce n’est que deux siècles plus tard que la distinction entre « bons » et mauvais « germes » commence à naître (Hiss and Zinsser, 1910).

A partir du XIX^e siècle, des scientifiques observèrent que les lichens, les anémones de mer et certains vers plats étaient issus d’une association entre un animal et des algues microscopiques. Vivant avec un animal hôte et fournissant des nutriments en échange de minéraux ou de protection, ces microalgues forment un parfait partenariat, du nom de “symbiose”, issu du grec “ensemble” et “vivant” (Sapp, 1994; Duperron, 2017). Le terme de “microflore” fut alors assigné à ces ensembles de microalgues symbiotiques (Zacharias, 1896; Bachmann, 1901) et reste encore aujourd’hui un terme courant pour désigner les microorganismes associés à un hôte. Ce même siècle, des scientifiques tels que Arthur Isaac Kendall décrivirent la multitude de bactéries symbiotiques présentes dans la “flore intestinale” (Kendall, 1923). L’intestin est alors considéré comme un incubateur parfait dans lequel s’accumulent des bactéries suivant une succession définie par l’âge et les aliments ingérés. Ces ensembles microbiens, les espèces mais également leurs gènes, en association avec leur hôte, constituent ce que l’on nomme aujourd’hui le *microbiome* (Turnbaugh *et al.*, 2006). Les travaux qui vont suivre cette introduction se basent principalement sur les gènes portés par ces ensembles microbiens, d’un point de vue fonctionnel. Nous utiliserons donc majoritairement le terme de *microbiome*, à la place de *microbiote*, communément utilisé. Ce dernier terme se définit comme étant l’ensemble des espèces microbiennes commensales, pathogènes et symbiotiques « qui partagent littéralement notre corps » d’un point de vue taxonomique (Lederberg and McCray, 2001).

L’intérêt porté à son rôle n’arrive que plus tard, avec l’émergence de nouvelles techniques de cultures anaérobies, découlant ainsi en 1962 et en 1969 aux premières ébauches microbiennes du corps humain par Theodor Rosebury intitulé “Microorganisms Indigenous to Man” et “Life on man” (Rosebury, 1962, 1969). A l’issue de ces portraits microbiens, d’autres recherches naquirent, avec notamment les études de René Dubos, qui étudia pour la première fois des souris en condition axénique (*i.e.* stérile), démontrant ainsi l’importance du microbiome pour le développement et la physiologie de son hôte (Dubos, 1959). Ces découvertes majeures sur l’importance que le microbiome peut avoir pour la santé et le bien-être de l’hôte, le placèrent comme un organe à part entière (Stappenbeck *et al.*, 2002; Backhed *et al.*, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2006).

Les premières techniques d'observations des espèces microbiennes consistant à les isoler sur des milieux de culture permirent de découvrir une grande diversité de nouvelles espèces. De nos jours, il est possible d'isoler de nombreuses espèces microbiennes, même extremophiles, notamment grâce à de nouveaux milieux sélectifs (Merino *et al.*, 2019). Ceci-dit, ces techniques ne permettent pas d'acquérir l'ensemble du vivant qui ne représenterait que 0.1-18% de la diversité totale des biomes (Rappé and Giovannoni, 2003; Pedrós-Alió and Manrubia, 2016; Hofer, 2018; Steen *et al.*, 2019). Ce n'est qu'en 1960 que l'américain Carl Woese décida de se baser sur les molécules conservées au sein de toutes les espèces, et non plus sur des caractères phénotypiques. Il se pencha ainsi sur la description de la molécule de fabrication des protéines : le ribosome, et plus particulièrement sur son ARNr 16S¹. Grâce à cette technique innovante, il décrivit seize ans plus tard la troisième branche du vivant, qu'il nommera les Archéobactéries, aujourd'hui appelées Archées (Woese and Fox, 1977). Cette innovation moléculaire, basée sur l'assignation taxonomique à partir de gènes conservés, révolutionna le monde de la microbiologie et fut nommée la *Metagénomique* (Handelsman, 2007). La méthode Sanger, la plus utilisée, permet le séquençage de divers génomes et révolutionna ainsi le domaine de la biologie moléculaire. Toutefois, cette méthode nécessitait un immense effort de séquençage très chronophage et coûteux. Alors que le génome humain fut séquencé en 10 ans avec la méthode de Sanger et couta près de 3 milliards de dollars, il est aujourd'hui possible avec les techniques de séquençage à haut débit nouvelles générations (NGS), de le séquencer en quelques jours pour moins de 1 000 dollars. Les chercheurs purent séquencer ainsi une multitude d'échantillons provenant de milieux et d'organismes divers, notamment de l'humain. La majorité de ces microorganismes était alors inconnue (Eckburg, 2005) et ce n'est qu'à partir du début du millénaire que les feux des projecteurs illuminèrent la grande diversité microbienne libre et associée aux organismes (**Figure 1.1.1**). Des projets d'envergures internationales ayant pour but de décrire le microbiome de la Terre (Earth Microbiome Project) (Gilbert *et al.*, 2014), de l'humain (The Human Microbiome Project Consortium, 2012) et même de son mobilier (Home Microbiome Project) (Azad *et al.*, 2013) furent menés à bien et mirent en évidence l'importance des microorganismes dans l'environnement, au sein et sur l'organisme.

¹ Acide Ribonucléique de la petite sous unité du ribosome dite 16S

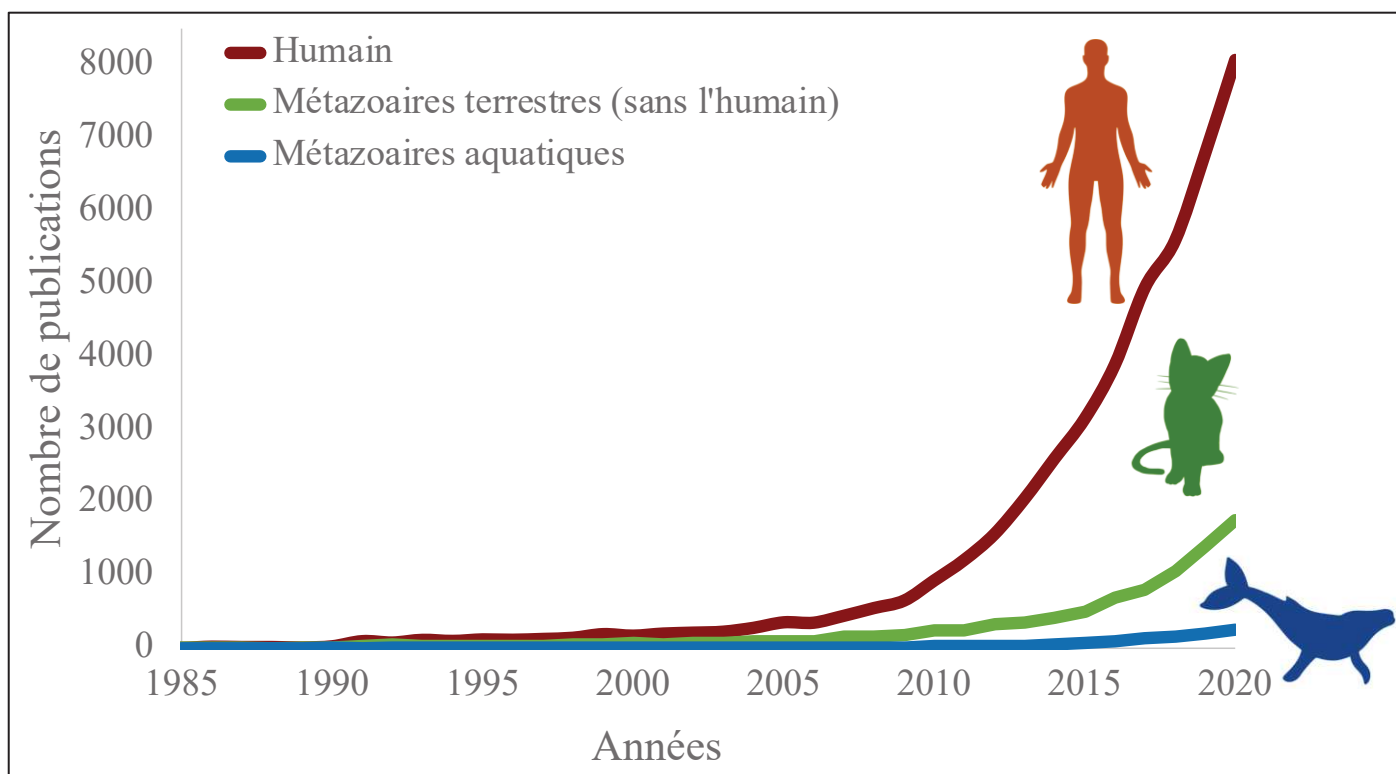


Figure 1.1.1 : Nombre d'articles publiés par an sur les études associées au microbiome des humains (en rouge), des métazoaires terrestres (en vert) et aux métazoaires aquatiques (en bleu) depuis 1985. La recherche a été effectuée sur Web of Science avec les mots clés : (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) AND human* pour les humains ; (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) NOT human* AND (animal* OR metazoa*) NOT (sea OR freshwater OR marin*) pour les animaux terrestres ; et (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) AND (animal* OR metazoa*) AND (sea OR freshwater OR marin*).

1. I. B – Les microbiomes comme métacommunautés

“Je suis vaste et je contiens des multitudes” Walt Whitman

Chaque animal, à l’exception de certaines chenilles (Hammer *et al.*, 2017), possède son propre microbiome, façonné par son environnement, ses gènes et son histoire (Ley *et al.*, 2006; Dethlefsen *et al.*, 2007; The Human Microbiome Project Consortium, 2012; Relman, 2012). Celui-ci va ainsi varier dans l’espace mais également dans le temps, que ce soit à l’échelle de la journée (Thaiss *et al.*, 2014) ou à l’échelle de l’année (Caporaso *et al.*, 2011). Les métazoaires sont des créatures chimères, formant un assemblage avec de multiples espèces microbiennes dont la variabilité spatio-temporelle est structurée *via* quatre processus : la **dispersion**, la **sélection**, la **dérive** et la **diversification** (spéciation) (Leibold *et al.*, 2004; Vellend, 2016; Miller *et al.*, 2018). Nous pouvons considérer les microbiomes comme des métacommunautés reliées par la dispersion d’espèces en interaction (Leibold *et al.*, 2004) et en évolution, dont l’abondance relative est soumise à des processus de dérive et de sélection (**Figure 1.1.2**).

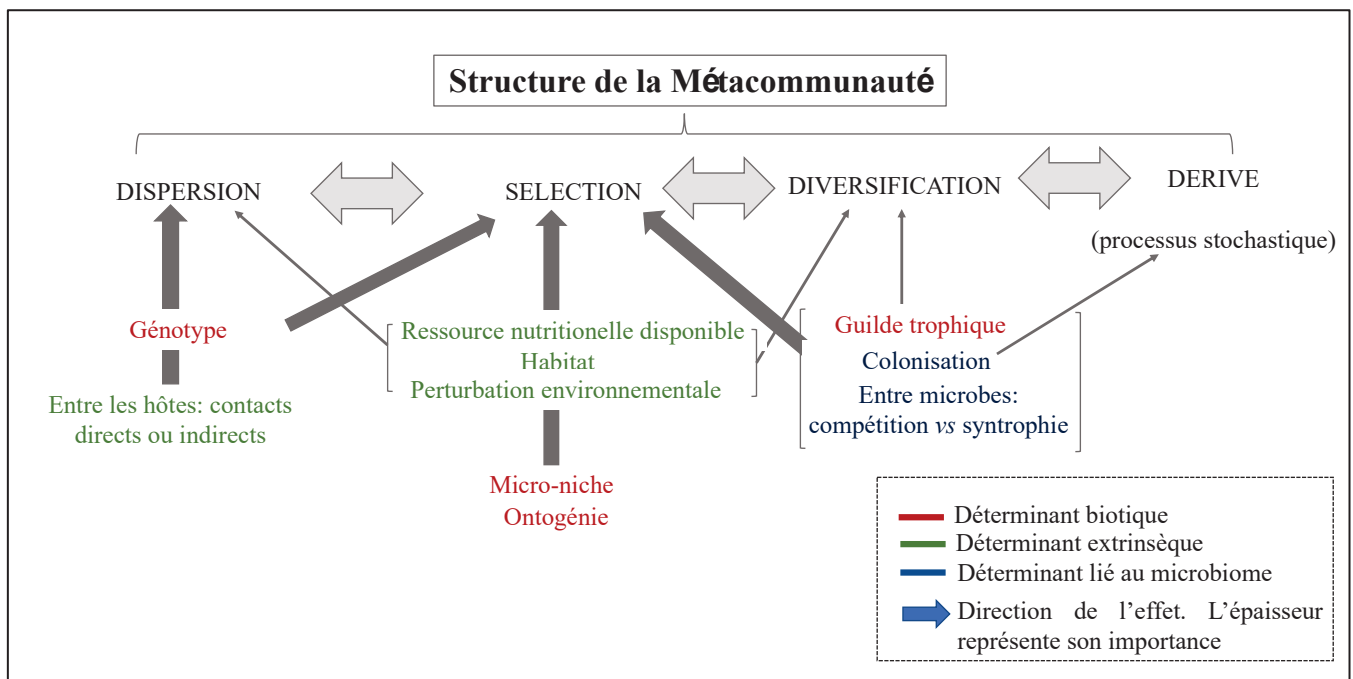


Figure 1.1.2 : Schéma des mécanismes structurant la métacommunauté. Celle-ci est expliquée par quatre processus de dispersion, sélection, diversification et dérive. Les facteurs impliqués dans ces processus peuvent être d’origine biotique (en rouge), extrinsèques à l’hôte (en vert) et liés aux microbiomes (en bleu) (adapté de Walter, 2015).

i) Dispersion

La dispersion est un déterminant important de la diversité microbienne au sein de l'hôte (Henry *et al.*, 2013). Les théories écologiques suggèrent que le développement d'un écosystème est souvent influencé par des "effets de priorité" (*priority effect*, en anglais), par lesquels l'ordre et la durée des colonisations déterminent les interactions entre les espèces. Ces différents microbiomes transmis peuvent ainsi influencer plusieurs aspects de la biologie de l'hôte (*e.g.* son comportement, son métabolisme ou sa résistance face aux pathogènes) (Ferrari and Vavre, 2011; Feldhaar, 2011; Ottman *et al.*, 2012; McLean *et al.*, 2016; Martino *et al.*, 2017). Dans la théorie des métacommunautés, l'interaction entre le microbiome et son hôte peut finalement contribuer à la distribution spatiale de ce dernier et dominer les interactions intra et/ou interspécifiques dans une communauté (Chandler *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2019), pouvant influencer *in fine* les services écosystémiques (Frago *et al.*, 2012, 2017; Hrček *et al.*, 2016).

Deux types de transmissions peuvent être différenciés. La **transmission dite verticale**, qui se fait d'une génération à une autre (hérédité) et la **transmission horizontale**, qui va ce faire par l'acquisition de microorganismes provenant de ses congénères ou de l'environnement (Sachs *et al.*, 2011).

• La transmission verticale

Les mécanismes de transmission des microorganismes à sa progéniture sont divers et dépendent fortement du mode de reproduction (Sachs *et al.*, 2004; Foster and Wenseleers, 2006). Ces transmissions sont cruciales dans la conservation et l'établissement des relations inter-microbiennes (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008; Funkhouser and Bordenstein, 2013). Ce type de transmission peut ce faire par des mécanismes internes, avec une transmission de microorganismes *via* le cytoplasme des **ovocytes**, comme c'est le cas chez certains invertébrés tels que les bivalves abyssaux (Funkhouser and Bordenstein, 2013; Ozawa *et al.*, 2017), les ascidies (Hirose *et al.*, 2009), les coraux (Bourne *et al.*, 2016) et certains insectes (Ferree *et al.*, 2005). Ils peuvent également se transmettre des ovaires au **vitellus**², comme cela a été observé chez certains vertébrés ovipares³, comme la poule domestique ou les poissons (Brown *et al.*, 1997; Brock and Bullis, 2001; Gantois *et al.*, 2009). Concernant les animaux

² Reserve énergétique utilisée par l'embryon pendant son développement dans l'œuf.

³ Se dit des métazoaires dont le développement se déroule à l'intérieur d'un œuf pondu par la mère.

placentaires tels que les mammifères, ils transmettent leur microbiome du *placenta* vers le fœtus (Aagaard *et al.*, 2014). La transmission se fait également lors de la mise-bas, au contact des microbiomes vaginaux et cutanés de la mère (Dominguez-Bello *et al.*, 2010).

La transmission peut se perpétuer *post-partum* ou après éclosion, avec des mécanismes dits externes, qui auront lieu lors du développement des juvéniles (Grönlund *et al.*, 2007). Ces mécanismes sont bien plus fréquents dans la nature et peuvent adopter différentes stratégies, notamment l’allaitement et la coprophagie. Chez les humains, les microorganismes provenant du lait maternel sont impliqués dans le développement du système immunitaire de l’enfant (Díaz-Ropero *et al.*, 2007), de la résistance aux infections (Maldonado *et al.*, 2012), et préviennent le développement d’allergies ou d’asthme dans l’enfance (Fernández *et al.*, 2013). Chez les diptères de la superfamille des *Hippoboscoidae* (*e.g.* mouche tsé-tsé), connus pour être des insectes piqueurs et hématophages, à reproduction adénotrophe⁴ vivipare, la mère “allaite” également sa progéniture grâce à des glandes transformées (Tobe and Langley, 1978). Ce liquide, similaire au lait maternel des mammifères, est riche en nutriments, lipides, protéines et microorganismes (*Sodalis* sp.) (Cmelik *et al.*, 1969; Attardo *et al.*, 2008). Ce dernier cas fait exception chez les insectes qui utilisent généralement la *coprophagie*, comme les punaises *Pentatomidae* et *Acanthosomatidae*, qui excrètent sur leurs œufs des fèces riches en charges microbiennes, de telle sorte qu’une fois éclos, les juvéniles puissent s’en alimenter et acquérir les bactéries maternelles (Prado and Zucchi, 2012). La coprophagie est également largement répandue chez les vertébrés pour la transmission des bactéries intestinales à sa progéniture. Cette stratégie permet un ensemencement du microbiome intestinal des juvéniles afin d’acquérir un microbiome mature fonctionnel. C’est le cas par exemple chez les koalas, chez qui la transmission se poursuit *via* une excrétion proctodéale produite par la mère, riche en microorganismes permettant de digérer les dures feuilles d’eucalyptus (Osawa *et al.*, 1993).

Ainsi, l’inoculum maternel peut avoir un effet significatif sur la fitness de son hôte, de son état juvénile à celui d’adulte. Tout au long de la vie de l’organisme, une diversification du microbiome va se produire où une succession d’espèces microbiennes va ainsi moduler les fonctions nécessaires au bon fonctionnement de l’organisme (*e.g.* dégradation de nouveaux aliments) (Grice *et al.*, 2009; Yatsunenko *et al.*, 2012; Bäckhed *et al.*, 2015).

⁴ Stratégie de reproduction où l’œuf (généralement unique) se développe et éclos à l’intérieur de la mère. La larve issue de l’éclosion va se nourrir de glandes à lait à l’intérieur de la mère jusqu’à ce qu’elles soient prêtes à se nymphoser.

- ***La transmission horizontale***

La transmission verticale n'est pas unique, ni obligatoire et n'est pas la plus courante façon de transmettre ses microorganismes (Nyholm and McFall-Ngai, 2004; Sachs *et al.*, 2011). Effectivement, certaines espèces animales acquièrent leurs microorganismes de façon horizontale et ne les héritent de leurs parents. Ces transferts, plus communs et plus souples ***entre les congénères***, par contact direct ou indirect (*i.e.* coprophagie, trophallaxie), ou ***par l'environnement***, garantissent une colonisation perpétuelle du microbiome.

Les transferts entre congénères sont souvent effectués entre les individus d'une même espèce, physiquement ou géographiquement proches, favorisant ainsi une homogénéisation des microbiomes. De nombreuses études ont notamment montré l'importance de ces transferts dans le déterminisme des microbiomes humains. En effet, chaque fois que nous touchons, parlons, éternuons, nous projetons un nuage de particules constitué de 37 millions de microorganismes (Qian *et al.*, 2012; Meadow *et al.*, 2015). Un projet réalisé sur le microbiome domestique ("The Home Microbiome Project") a ainsi démontré que les membres d'un même foyer partageaient plus de microorganismes en commun que des personnes de foyers distincts. Lorsque le foyer possède un chien, ce microbiome est alors diversifié par les microorganismes apportés de l'extérieur (Azad *et al.*, 2013). D'ailleurs, cette interaction serait même favorable au développement des enfants en réduisant la probabilité de développer des maladies atopiques⁵ ou de l'asthme à l'âge adulte (Fall *et al.*, 2015). En comparant les microbiomes cutanés de deux équipes de roller derby, l'équipe de Meadow a mis en évidence que les membres d'une même équipe possédaient des microbiomes cutanés similaires avant un match mais que les microbiomes des deux équipes adverses tendaient à converger pendant le match, démontrant ainsi la rapidité et l'importance des contacts physiques entre individus pour la dispersion du microbiome (Hamburger, 1947; Pittet *et al.*, 2006; Meadow *et al.*, 2013).

L'environnement joue également un rôle important dans la colonisation microbienne. Ces échanges de microorganismes entre une communauté "puits" avec des communautés extérieures "sources" peuvent varier en densité et en composition en fonction de la démographie microbienne des partenaires d'échanges (Holt, 1985; Pulliam, 1988). Ces dynamiques spatiales peuvent générer ainsi des flux de microorganismes en masse ("*mass effects*", Shmida and Wilson, 1985), d'une communauté à une autre, et peut également prévenir l'extinction de

⁵ Se dit de maladies liées à la réponse allergique du système immunitaire à des allergènes communs de l'environnement.

communautés locales grâce à l'immigration (*“rescue effect”*, Brown and Kodric-Brown, 1977). Cependant, bien que les interactions puissent être multiples, l'établissement d'une relation pérenne n'est pas systématique, voire faible (West *et al.*, 2002). En effet, l'organisme impose des conditions de sélection dans lesquelles certains microorganismes peuvent prospérer (Ley *et al.*, 2006; Spor *et al.*, 2011; Bevins and Salzman, 2011).

ii) Sélection

Les dynamismes de transmission, considérés comme neutres car ils consistent en rencontres aléatoires qui modifient la fréquence des compositions, vont de paires avec des mécanismes locaux sélectifs. Ces mécanismes sélectifs de tri d'espèces (*“species-sorting”* en anglais) se font au niveau de l'hôte, de façon active et passive, et au niveau des microorganismes.

- **Au niveau de l'hôte**, le système immunitaire exerce une ***pression sélective active*** sur le microbiome au travers de mécanismes innés et acquis comme la sécrétion de peptides antimicrobiens (Bevins and Salzman, 2011) ou d'immunoglobuline A (Peterson *et al.*, 2007), contribuant ainsi à l'homéostasie du système digestif (Round and Mazmanian, 2009). Le système immunitaire étant intimement lié à la génétique de l'hôte et à son environnement, les assemblages microbiens peuvent donc être communs dans un panel d'individus partageant les mêmes traits écologiques (*e.g.* habitat, ressource alimentaire), les mêmes traits fonctionnels (*e.g.* morphologie du tractus digestif) ou la même histoire évolutive (*e.g.* proximité phylogénétique). Les hôtes peuvent directement filtrer les microorganismes *via* leur système immunitaire et mettre en place des structures spécialisées pour accueillir les microorganismes mutualistes, distinguant ainsi les microorganismes bénéfiques des microorganismes “tricheurs” (Sachs *et al.*, 2010). C'est notamment le cas du trophosome chez le vers géant des profondeurs *Riftia pachyptila* (Bright and Sorgo, 2005; Nussbaumer *et al.*, 2006), des glandes exocrines chez les fourmis (Currie, 2006) ou bien des bactériocytes remplis de bactéries bioluminescentes *Vibrio fischeri* contenus dans des cryptes spécialisées du manteau du calmar hawaïen (Visick *et al.*, 2000; Nyholm and McFall-Ngai, 2004).

L'hôte en tant que niche environnementale va également exercer une ***pression sélective passive*** sur les microorganismes *via* des filtres environnementaux. Comprendre leur dynamisme, c'est analyser plusieurs échelles et se placer haut delà de l'individu hôte (Miller *et al.*, 2019). Les hôtes peuvent ainsi être considérés comme des écosystèmes aux multiples niches

écologiques déterminées par une multitude de combinaisons physico-chimiques alliant température, acidité, oxygène et composés organiques sélectionnant les types microbiens susceptibles de s'y développer (Faust and Raes, 2012). Finalement, nous sommes l'équivalent d'archipels pour les microorganismes qui sont distribués selon une certaine biogéographie au sein d'un même individu (Li *et al.*, 2012; The Human Microbiome Project Consortium, 2012) voire même au sein d'un organe (Segata *et al.*, 2012; Donaldson *et al.*, 2015). C'est notamment le cas au niveau du tractus intestinal, écosystème unique, privé d'oxygène, de lumière, inondé de fluides gastriques acides, très riche en nutriments et sous l'influence de cellules immunitaires. Les conditions physico-chimiques vont ainsi permettre la croissance de bactéries anaérobies comme les *Firmicutes* ou *Bacteroidetes*. A plus fine échelle, des filtres s'exercent au sein même du tractus intestinal, où les bactéries en position proximale du conduit biliaire (*Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*) ne sont pas les mêmes que les bactéries en position distale que ce soit les bactéries épithéliales (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*) ou les bactéries du lumen (*Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*) (Donaldson *et al.*, 2015) (**Figure 1.1.3**).

Les traits écologiques propres à l'hôte comme le régime alimentaire jouent également un rôle majeur en sélectionnant les espèces microbiennes, notamment celles du tractus digestif. La méta-analyse conduite par Ley et son équipe a mis en évidence que les communautés microbiennes entériques des mammifères ne se structuraient pas selon un assemblage phylosymbiotique (*i.e.* elles ne se distinguent pas en groupe dépendant de la proximité phylogénétique des hôtes), mais plutôt selon le régime alimentaire (Ley *et al.*, 2008a). Les herbivores recèlent une diversité plus grande que les omnivores ou les carnivores, et présentent des fonctions spécifiques associées à la dégradation de leurs aliments. Chez les poissons marins, des résultats similaires ont été obtenus pour la famille des *Sparidae* où la saupe, *Sarpa salpa*, seule espèce herbivore de cette famille, possède une composition microbienne originale, dominée par des bactéries anaérobies caractéristiques des herbivores (Escalas *et al.*, 2021). Cette originalité s'explique par un tractus intestinal 3.3 fois plus long que celui des autres *Sparidae* méditerranéens qui serait ainsi adapté à une fermentation des molécules complexes propres au régime herbivore. L'importance respective du régime alimentaire, de l'histoire évolutive et d'autres traits fonctionnels de l'hôte dans la structuration du microbiome intestinal reste toutefois très discutée. Par exemple, les pandas géants et les pandas roux, seules espèces au régime alimentaire herbivore dans l'ordre des grands carnivores *Carnivora* (*e.g.* ours, félins, canins), ont des compositions microbiennes similaires à leurs pairs carnivores (Guo *et al.*, 2020).

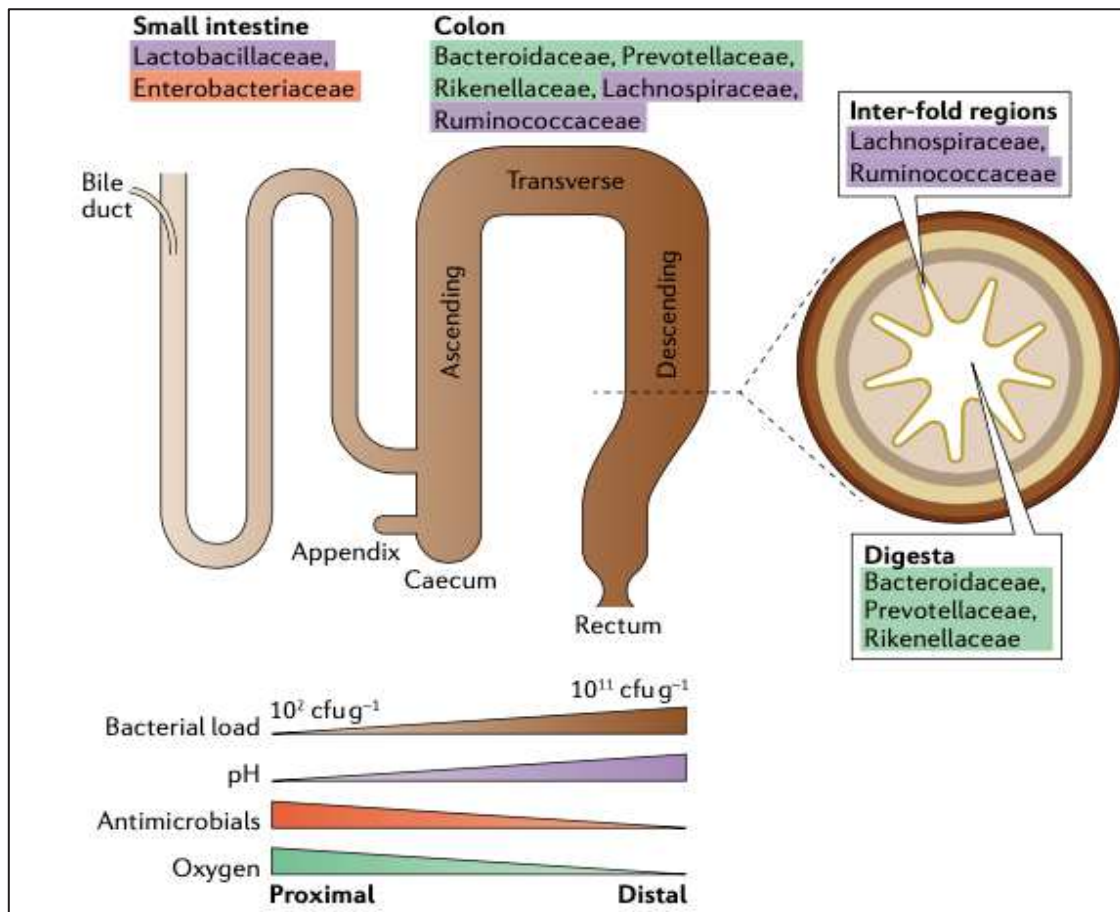


Figure 1.1.3 : Habitats microbiens dans le tractus intestinal humain. Les phyla bactériens dominants dans le tractus intestinal humain sont les *Bacteroidetes* (en vert), les *Firmicutes* (en violet), les *Proteobacteria* (en orange), les *Actinobacteria* et les *Verrucomicrobia* (non représentés ici). Les familles bactériennes dominantes dans le petit intestin et dans le colon reflètent les différences physiologiques le long du transit. Par exemple, un gradient d’oxygène, la concentration des peptides antimicrobiens (dont les acides biliaires) et le pH régulent la densité bactérienne des communautés intestinales, avec des charges importantes dans le colon. *cfu = Colony forming units. Figure reprise de Donaldson *et al.*, (2015).

- Les interactions *entre les microorganismes* sont également à prendre en compte.

Un des consortium microbien les plus répandu est la syntrophie, où plusieurs espèces microbiennes se nourrissent, digérant des aliments différents tout en créant des déchets chimiques utilisables par d’autres partenaires, assurant ainsi la stabilité de la communauté (Fischbach and Sonnenburg, 2011; Koropatkin *et al.*, 2012; Schluter and Foster, 2012). Une étude récente sur le microbiome intestinal de la drosophile *Drosophila melanogaster* a mis en évidence l’importance des échanges métaboliques entre *Acetobacter pomorum* et *Lactobacillus plantarum*, au niveau de son comportement alimentaire et reproductif. En utilisant le lactate produit par *L. plantarum*, la bactérie *A. pomorum* apporte, à celle-ci et à son hôte, un supplément

d'acides aminés essentiels à leur développement, qui va moduler le comportement alimentaire de la mouche (Henriques *et al.*, 2020).

Ces interactions ne sont cependant pas toutes positives. Une réduction de la coopération entre les espèces microbiennes peut laisser place à la compétition ou à la prédation (**Figure 1.1.4**), résultant en une productivité diminuée, comme l'incapacité à digérer certains aliments efficacement, voire créer un déséquilibre microbien (*i.e.* dysbiose) (Oliveira *et al.*, 2014). Ce type d'interaction semble cependant moins important dans la structuration des microbiomes en comparaison des filtres environnementaux (Costello *et al.*, 2012).

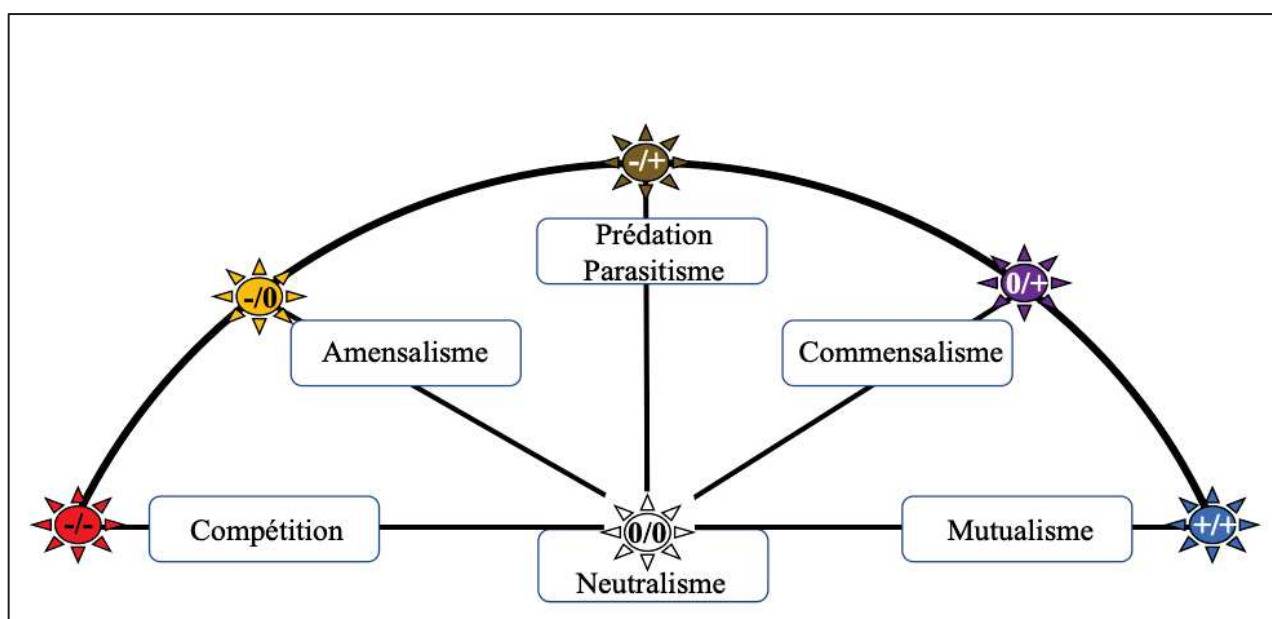


Figure 1.1.4 : Diversité des interactions microbiennes. La compétition survient entre deux espèces utilisant la même niche écologique et les mêmes ressources. La sélection naturelle va ainsi favoriser la plus adaptée et moduler les compositions microbiennes avec l'extinction de certaines espèces au profit du développement d'autres. L'amensalisme, à l'instar de la compétition, va nuire à une espèce sans favoriser l'autre. La modulation des conditions physico-chimiques de la niche par une espèce (expression d'enzyme antibactérienne et antifongique) peut ainsi limiter le développement de certaines espèces sensibles à ces produits métaboliques. Lorsque cette nuisance apporte un bénéfice à l'autre espèce, nous parlerons de prédation (dans le cas d'une relation trophique où un control top-down peut régir sur le développement des espèces microbiennes, comme c'est le cas avec les bactériophages) ou de parasitisme (notamment entre les bactéries et les champignons). Des bénéfices peuvent être attribués sans retour d'une espèce à une autre, c'est le cas du commensalisme, où la présence d'une espèce va favoriser le développement d'une autre. Lorsque ce bénéfice est mutuel entre les deux espèces, nous parlerons de mutualisme, qui va dominer de façon importante dans les réseaux microbiens. Enfin, deux espèces peuvent prospérer sans aucune interaction, c'est le neutralisme. Les espèces partageant la même niche écologique avec une ressource illimitée.

- *Filtres environnementaux*

Malgré l'apparente capacité des microorganismes à coopérer mutuellement avec leurs hôtes, ceux-ci peuvent également lui être délétères en lui causant des maladies (*i.e.* agents infectieux) ou bien indirectement en cas de dysbiose. Ce terme définit des changements dans la composition du microbiome en relation avec une diminution de l'état de santé de son hôte, sans pour autant en être la cause directe (West *et al.*, 2019). La cause principale peut souvent régir de modification des paramètres environnementaux. C'est notamment le cas chez plusieurs espèces sauvages pour lesquelles une dysbiose pourrait amplifier les impacts de perturbations environnementales. D'après la Convention pour la Diversité Biologique (CBD), plusieurs menaces pèsent sur la biodiversité des relations microbiennes associées aux animaux, notamment avec la **modification d'habitat**, la **pollution**, et le **changement climatique** (CBD secretariat, 2010) (**Table 1.1.1**).

La **modification de l'habitat**, que ce soit la captivité ou la fragmentation écologique, peut impacter les microbiomes au travers d'une modification des ressources alimentaires, en termes de quantité mais également de qualité (Loudon *et al.*, 2014; Greene *et al.*, 2018). Elle peut également influencer sur les interactions sociales des hôtes, en défavorisant ainsi les phénomènes de dispersions entre congénères, et expose les hôtes à des réservoirs microbiens différents (Nelson *et al.*, 2013b; Loudon *et al.*, 2014). Ces phénomènes sont d'autant plus impactant lorsqu'ils sont liés à des phénomènes de **pollution**. Celle-ci peut favoriser des taxa résistants à l'exposition de composés toxiques (Lapanje *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2016), ou à des maladies infectieuses, impactant directement l'association entre les microbiomes et son hôte et, de surcroît, altérer sa physiologie (McKenney *et al.*, 2017) et sa résilience (Knutie, 2018). Enfin, le **changement climatique** peut indirectement altérer les communautés microbiennes associées à l'hôte *via* les effets que ce dernier pourra subir au niveau de sa physiologie. L'exemple le plus marquant de ces dernières décennies est sans nul doute celui des coraux. Ces derniers vivent en symbiose avec des microalgues appelées zooxanthelles (*Symbiodinium* spp.) qui apportent au corail 90% de son apport énergétique par la photosynthèse (Stanley Jr., 2006). Cette relation est perturbée par le réchauffement des eaux qui, couplé avec d'importants indices UV, endommagent les photosystèmes II des zooxanthelles et provoquent leur expulsion des loges du corail, résultant en des phénomènes de blanchissement corallien dont la sévérité peut induire leur mort (Jokiel and Coles, 1990; Iglesias-Prieto *et al.*, 1992; Brown, 1997).

Table 1.1.1 : Références sur les menaces pesant sur les associations hôtes-microorganismes. La plupart des études sont basées sur des modèles terrestres et sur leurs microbiomes digestifs. Pourtant les menaces sont diverses et semblent impacter tous les compartiments microbiens associés aux animaux, y compris ceux associés aux mondes aquatique et marin.

	Menace	Impact	Microbiomes	Hôtes
Modification de l'habitat	Fragmentation	Réduction de la diversité et altération des compositions et des fonctions associées	Tractus entérique	Mammifères: Piliocolobus (Barelli <i>et al.</i> , 2015) ; Singe hurleur (Amato <i>et al.</i> , 2013) ; Lémur catta (Bennett <i>et al.</i> , 2016)
			Cutané	Amphibiens: Hyla (Becker <i>et al.</i> , 2017) ; Rainette grillon de Blanchard (Krynak <i>et al.</i> , 2016) ; Grenouille Coqui (Hughey <i>et al.</i> , 2017)
	Urbanisation		Tractus entérique	Oiseaux: Moineaux (Teyssier <i>et al.</i> , 2018) ; Bruants à couronne blanches (Berlow <i>et al.</i> , 2021) ; Ibis blanc américain (Murray <i>et al.</i> , 2020)
			Tractus entérique	Reptiles: Dragon d'eau Australien (Littleford-Colquhoun <i>et al.</i> , 2019)
	Agriculture	Changement des compositions	Tractus entérique	Amphibiens: <i>Fejervarya limnocharis</i> (Chang <i>et al.</i> , 2016)
			Tractus entérique	Insectes: Abeilles domestiques (Jones <i>et al.</i> , 2018)
	Captivité	Changement des compositions	Tractus entérique	Poissons: Morue (Dhanasiri <i>et al.</i> , 2011)
			Tractus entérique	Reptiles: Lézards (Kohl <i>et al.</i> , 2018)
			Tractus entérique	Oiseaux: Grand Tétraz (Wienemann <i>et al.</i> , 2011) ; Dindon sauvage (Scupham <i>et al.</i> , 2008) ; Perroquets (Xenoulis <i>et al.</i> , 2010)
			Tractus entérique	Mammifères: Douc à pattes rouges & singes hurleurs (Clayton <i>et al.</i> , 2016) ; Néotoma (Kohl <i>et al.</i> , 2014b) ; Cerf du père David (Wang <i>et al.</i> , 2019) ; Rhinocéros noir (Antwis <i>et al.</i> , 2019) ; Guépards (Wasimuddin <i>et al.</i> , 2017)
		Cutané	Amphibiens: Salamandre cendrée (Loudon <i>et al.</i> , 2014)	
		Cutané	Reptiles : Dragon du Komodo (Hyde <i>et al.</i> , 2016)	
		Cutané	Cétacés: Grand Dauphin (Nelson <i>et al.</i> , 2019)	
		Diminution de la diversité	Tractus entérique	Mammifères: Canidés, primates, et chevaux (McKenzie <i>et al.</i> , 2017)
Cutané	Amphibiens: Grenouilles dorées (Becker <i>et al.</i> , 2014) ; Crapaud boréal (Kueneman <i>et al.</i> , 2016)			
Pollution	Métaux lourds	Alteration des compositions	Tractus entérique	Poissons: poisson-zèbre (Xenoulis <i>et al.</i> , 2010)
	Biphenyls polychlorinés		Tractus entérique	Amphibiens: Grenouille léopard (Kohl <i>et al.</i> , 2015)
	Pesticides Herbicides	& Changement des compositions	Tractus entérique	Insectes: Abeille (Kakumanu <i>et al.</i> , 2016)
			Tractus entérique	Amphibiens: Rainette de Cuba (Knutie <i>et al.</i> , 2018)

Changement climatique	Eaux usées	Altération des compositions	Cutané	Amphibiens: Rainette grillon de Blanchard (Krynak <i>et al.</i> , 2017)
			Tissu	Coraux: Corail étoilé massif (Klaus <i>et al.</i> , 2007) ; <i>Porites compressa</i> (Thurber <i>et al.</i> , 2009) ; Corail starlette massive (Sekar <i>et al.</i> , 2008)
	Augmentation des températures	Diminution de la diversité et altération des compositions	Tractus entérique	Reptiles: Lézards (Bestion <i>et al.</i> , 2017)
			Tractus entérique	Amphibiens: Salamandre cendrée (Fontaine <i>et al.</i> , 2018) ; Grenouille léopard (Kohl and Yahn, 2016)
			Tractus entérique	Insectes: Punaise verte ponctuée (Kikuchi <i>et al.</i> , 2016) ; Termite à pattes jaunes (Arango <i>et al.</i> , 2021)
		Altération des compositions	Tissu	Eponges marines: <i>Rhopaloeides odorabile</i> (Webster <i>et al.</i> , 2008) ; <i>Cliona orientalis</i> (Ramsby <i>et al.</i> , 2018)
	Acidification		Tissu	Coraux: <i>Acropora millepora</i> (Grottoli <i>et al.</i> , 2018) ; <i>Porites compressa</i> (Thurber <i>et al.</i> , 2009)
	Parasite		Tractus entérique	Oiseaux: Oiseaux des Galápagos (Knutie, 2018)
			Tractus entérique	Mammifères: Ruminants (Kreisinger <i>et al.</i> , 2015) ; Sifaka de Coquerel (McKenney <i>et al.</i> , 2017) ; Souris (Walk <i>et al.</i> , 2010)
Maladies infectieuses		Diminution de la diversité et altération des compositions	Tractus entérique	Amphibiens: <i>Odorrana tormota</i> (Shu <i>et al.</i> , 2019)
			Tissu	Coraux: Corail corne de Cerf (Klinges <i>et al.</i> , 2020)
	Virus		Tractus entérique	Oiseaux: Canard Colvert (Ganz <i>et al.</i> , 2017)
			Cutané	Amphibiens: Grenouille rousse (Campbell <i>et al.</i> , 2018)
	Mycose		Cutané	Amphibiens: Grenouille dorée (Rebollar <i>et al.</i> , 2016)
	Pathogènes		Tissu	Coraux : (Thurber <i>et al.</i> , 2020)
			Cutané	Amphibiens: <i>Rana sierrae</i> (Jani and Briggs, 2014)

iii) Dérive

Les taux de croissance et l'abondance des microorganismes peuvent être influencés par des forces déterministes, comme la sélection vue précédemment, mais également par des processus stochastiques tels que la dérive écologique (Hubbell, 2001). L'effet de la dérive est plus conséquent sur les espèces microbiennes peu abondantes car elles auront plus de probabilités d'être stochastiquement vouées à s'éteindre. Cette théorie, dite neutre, stipule que ces processus liés à la dispersion et à la mortalité des individus, vont favoriser les espèces microbiennes à croissance égale, dans un environnement donné, expliquant ainsi que la similarité fonctionnelle des communautés microbiennes suivent la même dynamique (Leibold *et al.*, 2004). Ces processus sont nécessaires pour générer les variations des compositions microbiennes avec des taxa uniques entre les individus hôtes (Burns *et al.*, 2016). Important dans l'établissement des premières successions microbiennes, ils semblent néanmoins être remplacés par des processus déterministes à la maturité de l'hôte (*i.e.* sélection et dispersion). Cependant, ces processus ne sont pas encore bien connus, notamment parce qu'ils vont souvent de pair avec les processus déterministes de sélection, les rendant compliqués à isoler (Sprockett *et al.*, 2018).

iv) Diversification

De par leur taille de populations, taux de croissance, de mutation et taux de recombinaison, les microorganismes sont capables de rapidement se diversifier et de s'adapter lorsqu'ils sont face à des forces sélectives. Les ***patrons de co-occurrence*** entre l'hôte et son microbiome peuvent être expliqués par quatre processus évolutifs : la co-spéciation, la diversification du microbiome au sein d'une certaine espèce hôte, le transfert horizontal, ou bien l'extinction (Groussin *et al.*, 2020) (**Figure 1.1.5**). Les études s'intéressant à la co-évolution entre le microbiome et leurs hôtes ont mis en évidence deux patrons récurrents.

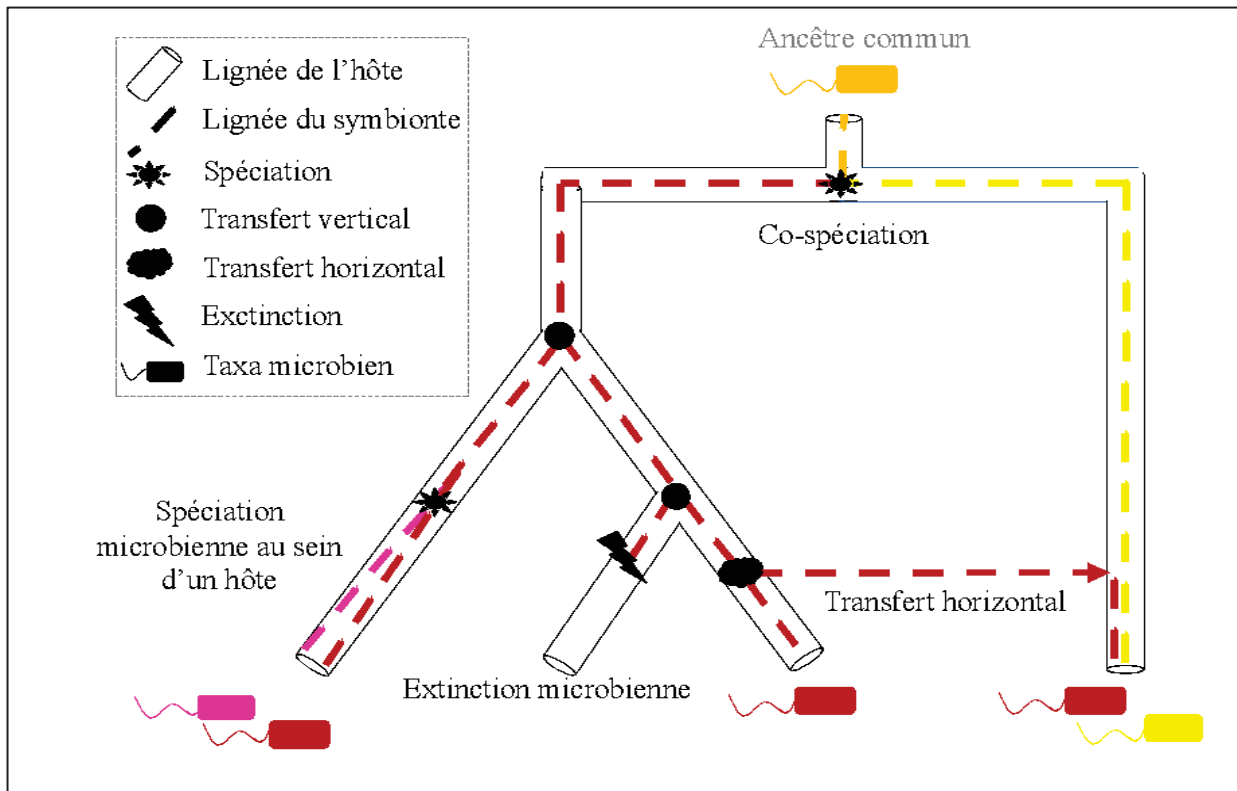


Figure 1.1.5 : Schéma expliquant les quatre processus d'évolution du système hôte-microbiome. Les phénomènes de co-occurrence dans le système hôte-microbiome peuvent être expliqués par quatre processus évolutifs. L'hôte et son microbiome peuvent se co-spécifier (trait rouge) ; le microbiome peut se diversifier au sein d'un hôte (trait rose) ; certaines espèces microbiennes peuvent passer d'une espèce hôte à une autre ; ou bien s'éteindre (adapté de Groussin *et al.*, 2020).

Le premier est lié à des histoires évolutives parallèles entre certains membres du microbiome et leurs hôtes, résultant en des phylogénies congruentes dites de *cophylogénie* (Groussin *et al.*, 2020). Ces patrons phylogénétiques de co-évolution sont des signatures d'événements anciens de co-spéciation, qui illustrent la cohésion pendant l'évolution de cette entité unique qu'est l'hôte et son microbiome. *Sensu stricto*, la co-évolution a été historiquement définie comme un changement réciproque s'opérant entre deux organismes et résultant des pressions de sélection qui se sont imposées à l'un et à l'autre, favorisant une coadaptation continue (Janzen, 1980). Cette co-évolution a été démontrée expérimentalement entre les phages et les bactéries (Koskella and Brockhurst, 2014), et avec des analyses comparatives notamment chez les insectes (Moran, 2001) et les mammifères (Youngblut *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019). Ces partenariats sont régis par des règles strictes entre l'environnement, l'hôte et le microbe, co-évoluant sur des générations comme des entités unifiées. Certains scientifiques vont jusqu'à identifier ces unités comme un tout appelé

Holobionte (du grec holo, “tout” , et bios, “vie”), terme créé en 1991 par Lynn Margulis (Margulis and Fester, 1991). Un holobionte est un super-organisme constitué de son hôte et de l'ensemble de ses microbiomes (Roughgarden *et al.*, 2018). Ils ne sont pas uniquement deux entités vivantes, ils contiennent également des gènes, fonctionnant en une seule entité soumise à la sélection naturelle, nommée hologénome (**Figure 1.1.6**). En effet, les conditions pour que la sélection naturelle opère sont qu'il y ait : des variations entre les individus, des variations transmissibles, et des variations pouvant influencer leur fitness, c'est-à-dire leur capacité à se développer et à se reproduire. Ces conditions peuvent justement s'appliquer aux microorganismes associés à un animal. Les communautés microbiennes varient d'un hôte à un autre, peuvent se transmettre à leurs progénitures de façon héréditaire et influent de façon significative la valeur sélective de leur hôte. Cette théorie reste cependant réfutable selon certains scientifiques car elle ne répond pas systématiquement aux conditions énoncées précédemment. Par exemple, la sélection par l'hôte peut être totalement effacée par l'influence de l'environnement. C'est le cas chez les oiseaux notamment, où la variation peut être plus grande intra-espèce qu'inter-espèce (Hird *et al.*, 2015). Par ailleurs, la condition d'hérédité ne s'applique pas sur toutes les espèces du microbiome, qui peuvent être résidentes comme temporaires, et qui n'influencent pas toutes la fitness de leur hôte. Le débat se justifie donc, mais une chose est sûre, l'influence du microbiome sur son hôte et son évolution ne peut être ignorée.

Un deuxième patron souvent rencontré, appelé *phylosymbiose*, se caractérise par une corrélation positive entre la similarité des microbiomes et la phylogénie de leurs hôtes (Brucker and Bordenstein, 2012). Autrement dit, des hôtes étant phylogénétiquement proches auront plus de clades microbiens en commun que des hôtes phylogénétiquement éloignés. La phylosymbiose repose sur plusieurs mécanismes : l'évolution des traits de l'hôte qui influence la sélection d'espèces microbiennes ; la distribution spatiale des hôtes qui va indirectement influencer le microbiome *via* la dispersion, entre les individus ou par l'environnement ; ou bien la co-diversification entre des hôtes et certains taxa microbiens (Pollock *et al.*, 2018).

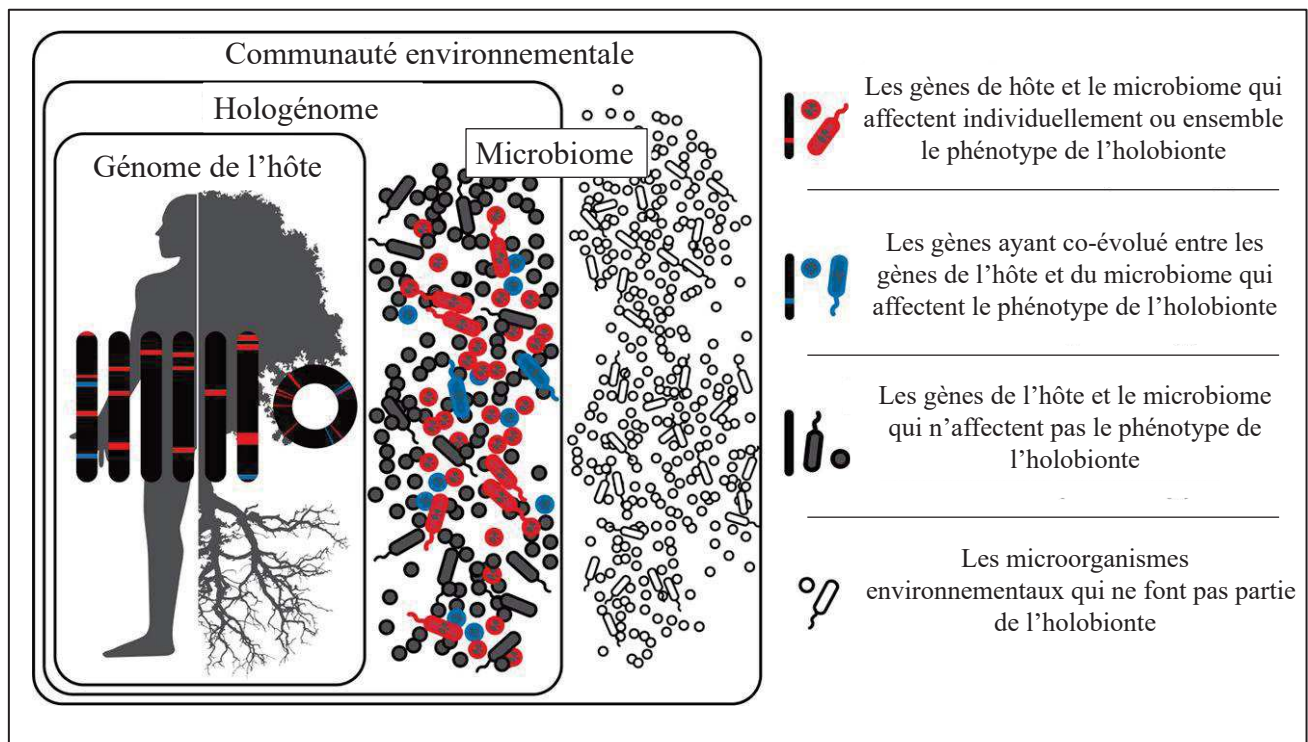


Figure 1.1.6 : Les holobiontes sont des entités comprenant l'hôte et tous ses microbiomes, incluant ceux qui affectent le phénotype de l'holobionte et qui ont co-évolué avec l'hôte (en bleu), ceux qui affectent le phénotype de l'hôte sans avoir co-évolué avec (en rouge), et ceux qui n'affectent pas le phénotype de l'hôte (en gris). Les microorganismes peuvent être transmis verticalement ou horizontalement, peuvent être acquis de l'environnement, et peuvent être transitoires ou permanents. Ainsi, les phénotypes de l'holobionte peuvent changer dans le temps et l'espace, en fonction des microorganismes transitant dans l'holobionte. Les microorganismes environnementaux ne font pas partie de l'holobionte (en blanc). Figure tirée de Theis *et al.*, 2016.

Des scénarios plus complexes peuvent également être observés. Les topologies peuvent être congruentes mais ne sont pas synchrones en termes de temps de divergence, suggérant des événements de spéciation après un passage à un autre hôte qui auraient rapidement acquis une spécialisation à ce nouvel hôte (Vienne *et al.*, 2013). Il existe aussi des cas où les topologies sont congruentes dans certaines régions de l'arbre mais incongruentes dans d'autres. La suppression de ce signal de co-phylogénie peut suggérer plusieurs choses. Soit un transfert horizontal des symbiontes pendant certaines périodes de l'évolution des hôtes, soit un phénomène d'extinction ou de spéciation des symbiontes au sein de l'hôte (**Figure 1.1.5**).

1. I. C – Rôles des microbiomes

Bien que leur rôle ait souvent été attribué aux maladies, la plupart des microbes ne sont pas pathogènes mais au contraire bénéfiques (McFall-Ngai, 2007). En effet, l'universalité d'association entre les métazoaires et leurs microbiomes implique un rôle prépondérant dans le fonctionnement de l'holobionte. Les connaissances apportées sur son rôle pour son hôte ont principalement encouragé la recherche médicale sur son implication dans le développement et dans le maintien du système immunitaire pour la compréhension de certaines maladies intestinales (Huttenhower *et al.*, 2014; Knox *et al.*, 2019) ou neurodégénératives comme Parkinson (Jackson *et al.*, 2019; Elfil *et al.*, 2020; Lubomski *et al.*, 2020). Par leur abondance mais également *via* la production de peptides antimicrobiens, le microbiome intestinal servirait de garde du corps en tant que barrière physique et en prévenant le développement de certains pathogènes. Dans nos intestins, leur abondance est telle que nous aurions autant de bactéries que de cellules humaines (Abbott, 2016; Sender *et al.*, 2016). Leur rôle crucial les place donc, pour certains auteurs, comme un organe caché formé par 39 trillions de cellules individuelles aux génomes uniques et fonctions précises. Alors que nos cellules comportent ~ 20 000 gènes, les microorganismes hébergés en contrôlèrent ~ 500 fois plus (Li *et al.*, 2014). Enfin, bien que le microbiome intestinal soit le plus étudié, les microbiomes olfactif et cutané attirent également l'attention de l'industrie agro-alimentaire et de la pharmaceutique. Le premier peut influencer les sens chez les vertébrés, notamment celui de l'olfaction (François *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2017), jouant alors un rôle majeur dans notre perception à sentir ou goûter des produits. Les microorganismes associés à notre peau connaissent également leur heure de gloire dans le domaine des cosmétiques avec des produits « microbiote friendly » permettant de prévenir les problèmes de peau liés à son déséquilibre ou bien à prévenir son vieillissement.

Bien que la majorité des études sur les rôles et déterminants des microbiomes ait été centrée sur l'humain (**Figure 1.1.1**), les références sont multiples dans la faune sauvage. Le rôle du microbiome intestinal chez les animaux a été largement démontré dans la dégradation des aliments avec la production de vitamines et de minéraux absents du régime alimentaire, mais également dans la décomposition des toxines et des substances chimiques dangereuses. Comprendre leur rôle chez les espèces animales sauvages est devenu aujourd'hui un enjeu majeur dans les problématiques de conservation, mais également dans la compréhension de leur adaptation à de nouveaux milieux. L'ère dont nous sommes les créateurs, l'Anthropocène, est bâtie sur l'influence de l'humanité dans les changements climatiques globaux et sur l'extinction

en masse d'espèces sauvages, tantôt macroscopiques (~27% des espèces décrites sont en voie d'extinction), tantôt microbiennes (IUCN, 2020). De nombreuses études ont démontré l'intérêt des microbiomes dans l'adaptation de leurs hôtes face aux changements environnementaux. C'est notamment le cas du cerf du Père David (*Elaphurus davidianus*) qui s'est adapté à une nouvelle ressource alimentaire basée sur des plantes halophytes grâce à la plasticité de son microbiome entérique (Wang *et al.*, 2019). Le microbiome peut également influencer la résilience de son hôte face à des stress comme c'est le cas des microorganismes bénéfiques pour les coraux (BMC) (Peixoto *et al.*, 2017). En favorisant leur santé, ces derniers provoquent un intérêt majeur dans la création de probiotiques⁶ en vue d'améliorer l'état général des récifs coralliens dont un tiers des espèces est voué à s'éteindre (Carpenter *et al.*, 2008; Polidoro *et al.*, 2011; Peixoto *et al.*, 2017).

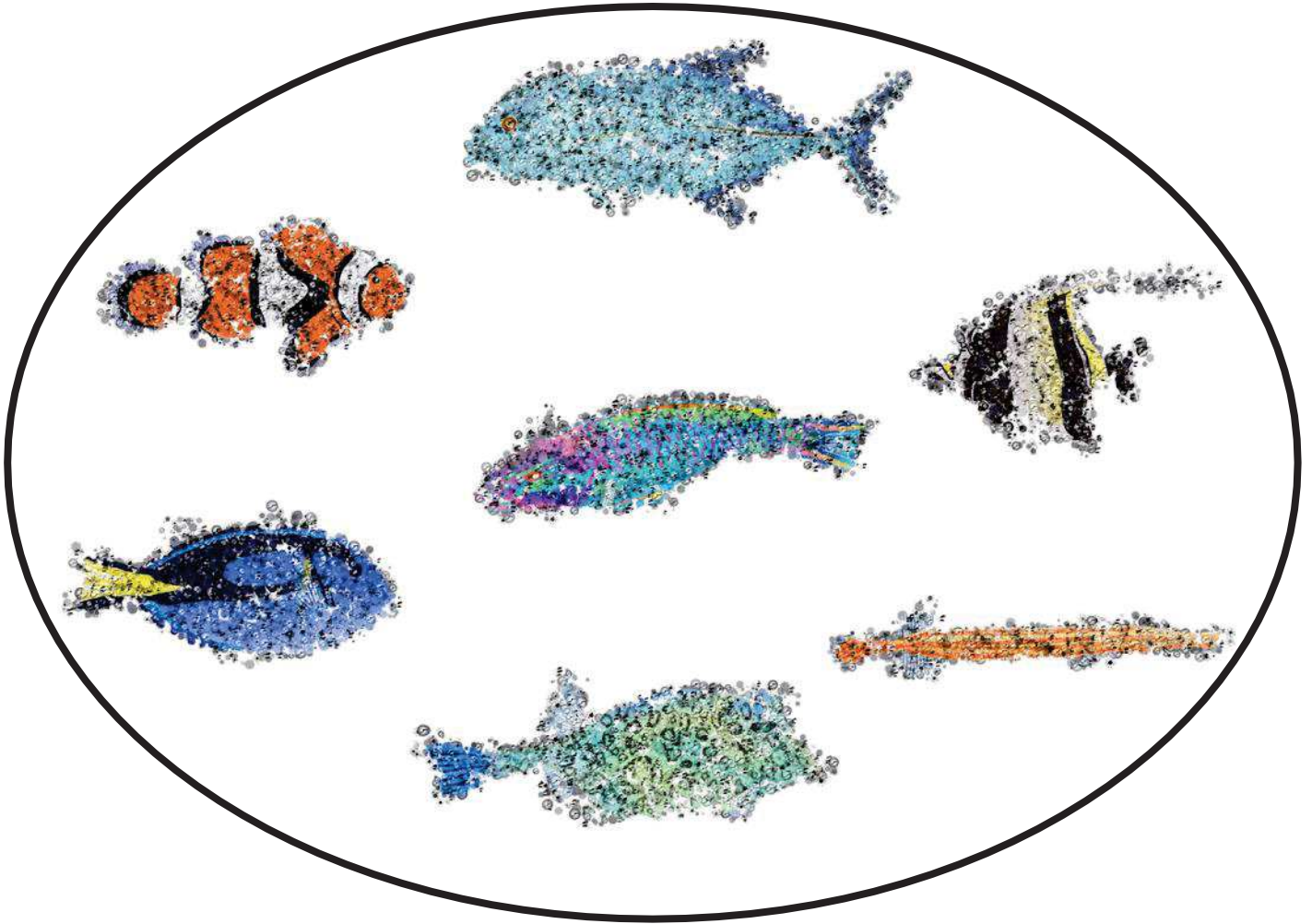
L'importance du microbiome pour son rôle est tel qu'il permet le développement et le maintien de la vie dans les écosystèmes extrêmes. A la fin des années 70, le submersible *Alvin* découvrait un écosystème caché à plus de 2 400 mètres de profondeur, au nord des îles Galápagos. Contre toute attente, cet écosystème, aux conditions extrêmes, révéla une grande diversité de richesses biotiques. Les invertébrés présents (*e.g.* les vers géants *Ryftia pachyptila*, les moules *Bathymodiolus* sp. ou les crevettes *Rimicaris exoculata*) sont en symbiose avec des bactéries chimosynthétiques utilisant les composés sulfurés environnants (notamment les sulfures d'hydrogène H₂S) pour fixer le carbone et apporter la matière organique à son hôte. Cet exemple n'est pas unique. Un grand nombre d'espèces marines utilisent ce type de métabolisme pour puiser de l'énergie (Dubilier *et al.*, 2008; Duperron *et al.*, 2013). Les premières conditions de vie sur Terre, semblables à celles des sites hydrothermaux, donnèrent ainsi le nom de Jardin d'Éden à ce site aux conditions extrêmes. Certaines hypothèses soutiendraient que ces bactéries seraient remontées à la surface et, s'associant aux animaux, permirent la colonisation par ces derniers dans les plus bas-fonds de nos écosystèmes hadaux. Ce type d'associations avec les invertébrés se retrouvent également dans les écosystèmes littoraux, sur les côtes tempérées (MacAvoy *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2017) ou dans les mangroves (Bouillon *et al.*, 2002).

Enfin, les bactéries sont capables d'agir *via* leurs gènes, mais également de les transmettre et de les introduire dans le génome d'autres bactéries associées aux animaux, leur conférant alors de nouvelles fonctions. Hehemann et ses collaborateurs (2010), constatèrent

⁶ Microorganismes vivants ajoutés au régime alimentaire pour favoriser un microbiome sain et donc une bonne santé de l'hôte.

qu'un transfert horizontal de gènes (THG) codant pour les enzymes porphyrases (capables de dégrader la porphyrine contenue dans les algues rouges *Porphyra* dites « nori ») avait eu lieu entre la bactérie marine *Zobellia galactanivorans* et la bactérie entérique humaine *Bacteroides plebeius*. Cette observation a été faite à partir du microbiome entérique des japonais, dont la gastronomie est fortement basée sur l'utilisation de ces algues (Hehemann *et al.*, 2010). Des scénarios similaires ont pu être observés chez les insectes avec de nombreux gènes de la bactérie *Wolbachia* largement présents dans le génome de nombreuses espèces (20 - 50% d'espèces insectes en porteraient la signature génétique) (Hotopp *et al.*, 2007; Dunning Hotopp, 2011). Ces THG seraient ainsi une force additive à l'évolution de ce partenariat, plaçant cet ensemble comme une entité unifiée plutôt qu'une symbiose à plusieurs acteurs.

1. II – Cas du microbiome des poissons téléostéens



1. II. A- Description du microbiome des poissons téléostéens

Contrairement aux études faites chez les mammifères terrestres ou les invertébrés marins (*i.e.* éponges et coraux), les études sur les microbiomes des vertébrés marins dont on recense aujourd'hui ~30 000 espèces, sont peu nombreuses. Cela est d'autant plus vrai pour les ~ 25 000 espèces de poissons téléostéens (**Figure 1.2.1**), qui rassemblent divers traits écologiques, présents dans tous les milieux aquatiques, que ce soit marins ou d'eaux douces. De ce fait, les téléostéens constituent le groupe de vertébrés le plus diversifié et l'un des plus anciens (370 Ma) sur Terre (Nelson *et al.*, 2016).

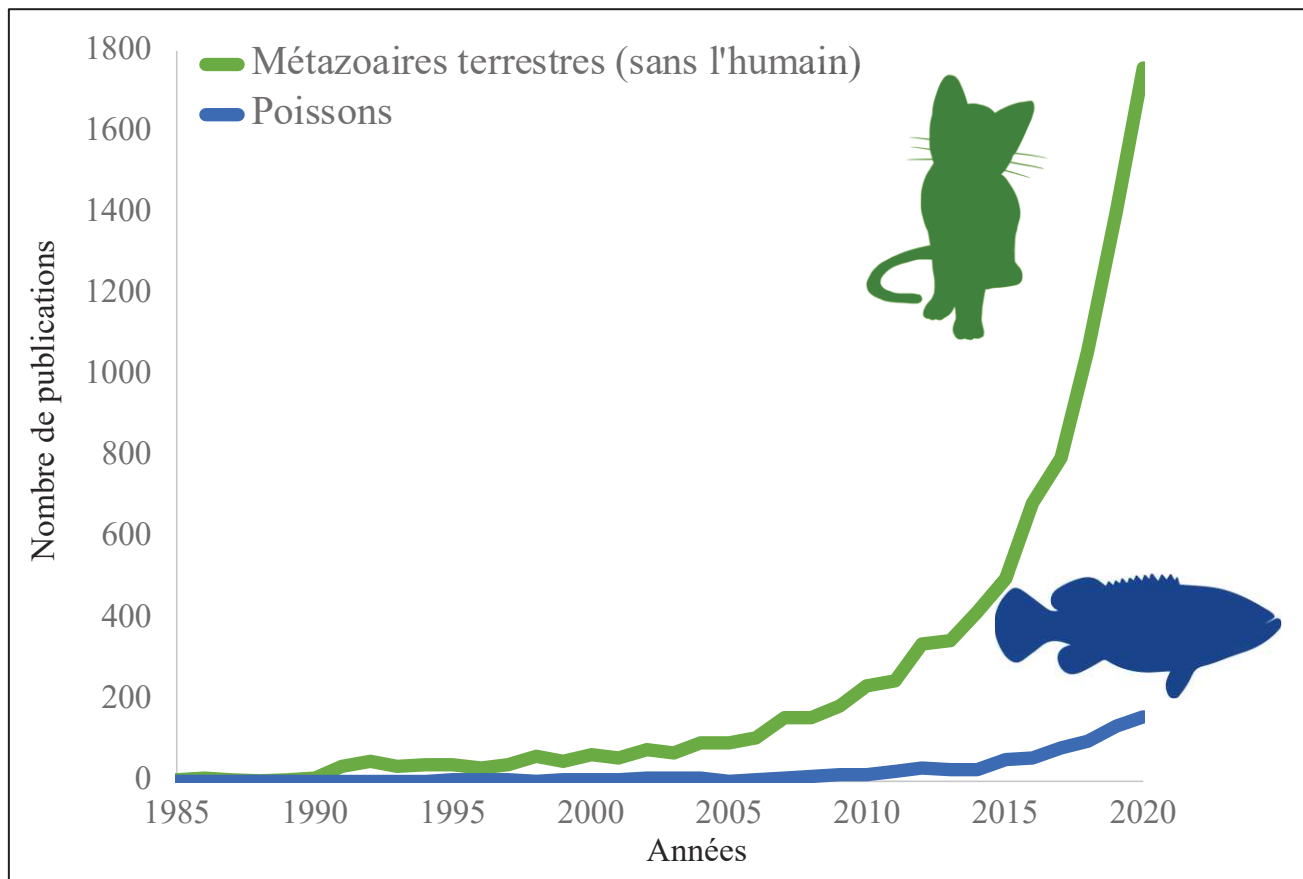


Figure 1.2.1 : Nombre d'articles publiés par an sur les études associées aux microbiomes des métazoaires terrestres sans l'humain (en vert) comparés aux poissons (en bleu) depuis 1985. La recherche a été effectuée sur Web of Science avec les mots clés : (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) NOT human* AND (animal* OR metazoa*) NOT (sea OR freshwater OR marin*) pour les métazoaires terrestres ; et (microbiome* OR microbiot* OR microflor*) AND (animal* OR metazoa*) AND (fish* OR teleost* OR actinopteryg*) pour cibler les études sur les poissons.

Littéralement baignés dans une mer riche en procaryotes divers (35 000 espèces recensées dans 245 échantillons planctoniques) (Sunagawa *et al.*, 2015), leur association avec ces derniers pourrait bien constituer une des formes holobionte les plus ancienne dans le règne animal. Représentant une des ressources nutritionnelles les plus importante pour l'humanité (~20-50% des apports de protéines) et une source économique majeure dans le domaine agro-alimentaire pour sa transformation (*e.g.* farine et huile de poisson) (Peterson and Lubchenco, 1997; FAO, 2020), l'expansion de la recherche sur les communautés microbiennes associées aux poissons a suivi l'essor du domaine de l'aquaculture. Les premières études faites à son égard datent des années 1920 (Reed and Spence, 1929; Gibbons, 1933). Cependant, les recherches appliquées aux déterminants et au rôle du microbiome ont connu un réel tremplin dans les années 1970 où des études se sont appliquées à comprendre l'effet du régime alimentaire (Sera and Ishida, 1972), de l'élevage (Gilmour *et al.*, 1976) et surtout, à comprendre l'influence du microbiome intestinal dans la résistance aux maladies (Boulanger *et al.*, 1977; Olivier *et al.*, 1981). Les premières observations faites sur le microbiome intestinal rapportaient, de façon générale, que celui-ci n'était pas très abondant et que les bactéries provenaient majoritairement de l'environnement et des proies ingérées (Ringø *et al.*, 1995). De ce fait, il est très vite apparu nécessaire de distinguer le core microbiome (autochtone) du microbiome satellite (allochtone). Le core microbiome peut adhérer et coloniser les surfaces muqueuses, ou se développer dans les tissus épithéliaux de l'hôte avec lequel il est intimement lié et évolue en fonction des pressions de sélection (Lowrey *et al.*, 2015; Ringø *et al.*, 2016; Legrand *et al.*, 2020). Dans le tractus intestinal, comme vu précédemment, le core microbiome est tolérant aux pH faibles, baigné dans les acides biliaires et dans les sucs gastriques (Nayak, 2010). Ces communautés sont fortement influencées par le génotype de l'hôte et ont probablement un rôle clé pour celui-ci (Wang *et al.*, 2010; Legrand *et al.*, 2020). Au contraire, les communautés satellites sont considérées comme transitoires et non-adhésives, généralement issues de l'environnement (Banerjee and Ray, 2017) bien qu'elles puissent s'établir de façon pérenne dans certaines conditions, notamment lors d'un stress (Ringø *et al.*, 2016).

D'abord basées sur les techniques culturales, les premières ébauches de la diversité du microbiome concernaient majoritairement la part bactérienne, appelée **bactériome**. Grâce aux nouvelles techniques de séquençage et au progrès fait dans le domaine du cultivable (Clements *et al.*, 2014), les autres domaines comme l'**archaeome**, l'**eucaryome** et le **virome**, sont aujourd'hui accessibles mais restent encore largement sous-estimés.

i) L'eucaryome

Les eucaryotes unicellulaires, également appelés Protozoaires, ont communément été décrits chez un grand nombre d'espèces de poissons, et notamment associés à leur tractus intestinal avec deux nouveaux genres *Balantidium* et *Paracichlidotherus*, spécifiques aux poissons chirurgiens (Grim and Clements, 1996; Grim, 2006; Li *et al.*, 2009; Merrifield *et al.*, 2010). Cependant, peu d'études se sont attelées à recenser leurs rôles pour l'hôte, ainsi que leur abondance dans le tractus entérique des poissons. Toutefois, une étude dénombra que les *Flegellata*, des protozoaires pourvus d'un flagelle, pouvaient atteindre le million de cellules par gramme d'intestin (Clements, 1991). Les fungi sont les autres protozoaires, communément appelés champignons, les plus connus et décrits chez les poissons (van Uden and Branco, 1963), avec deux phyla majeurs : les *Ascomyceta* dont la grande majorité est représentée par les *Saccharomycetaceae* (Gatesoupe, 2007) et les *Basidiomyceta*, dont le genre *Rhodotorula* a été détecté dans des poissons marins et d'eaux douces (Newman Jr. *et al.*, 1972; Andlid *et al.*, 1995). Plusieurs études ont démontré le potentiel métabolique que les fungi pourraient avoir comme décomposeur, dans le recyclage des nutriments et dans la biodégradation des acides gras comme les huiles (Kutty and Philip, 2008). Plusieurs composés sont produits par les fungi comme des protéines cellulaires, des vitamines, des pigments et des enzymes (Chi *et al.*, 2009). De ce fait, certaines espèces comme *Saccharomyces cerevisiae* sont aujourd'hui utilisées dans les compléments alimentaires utilisés dans le domaine de l'aquaculture (Romero *et al.*, 2014).

ii) L'archaeome

Les archées, troisième domaine du vivant découvert par Carl Woese et George Fox (Woese and Fox, 1977), sont souvent décrites comme étant associées aux microbiomes entériques des mammifères, notamment les ruminants, où les méthanogènes jouent un rôle important dans la fermentation des carbohydrates⁷ (Pimentel *et al.*, 2006; St-Pierre and Wright, 2013), et surtout dans les émissions de gaz à effet de serre (Tapio *et al.*, 2017). Les informations sur les communautés archées associées aux tractus digestifs des poissons sont cependant rares, bien qu'elles aient été détectées dans des contenus fécaux et dans des échantillons d'intestins chez le flet européen (*Platichthys flesus*) (van der Maarel *et al.*, 1998), chez le mulot cabot (*Mugil cephalus*) (van der Maarel *et al.*, 1998, 1999), la daurade royale (*Sparus aurata*)

⁷ Chaîne moléculaire composée de carbone, d'hydrogène et d'oxygène.

(Kormas *et al.*, 2014), la carpe de roseau (*Ctenopharyngodon idella*) (Ni *et al.*, 2014) et la carpe asiatique (Xia *et al.*, 2014). D'après ces études, la diversité d'archées est considérablement plus faible, variant entre >1% - 4%, par rapport à celle des bactéries (Ni *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). La composition de l'archaeome entérique des poissons est représentée majoritairement par les phyla des *Euryarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Thaumarchaeota*, et des *Korarchaeota*. Alors qu'une activité méthanogène a été détectée *in situ* chez le flet européen (Oremland, 1979), nous ne savons pas quelle pourrait être la contribution des poissons aux émissions de gaz à effet de serre. Toutefois, les archées ne sont pas toujours détectables. En effet, plusieurs études ont rapporté des résultats de PCR⁸ négatifs chez des espèces herbivores comme la perche zébrée (*Hermosilla azurea*), le poisson perroquet (*Chlorurus sordidus*) et le poisson chirurgien à joues blanches (*Acanthurus nigricans*) ou même chez le carnivore vivaneau à deux tâches (*Lutjanus bohar*) (Fidopiastis *et al.*, 2006; Smriga *et al.*, 2010).

iii) *Le virome*

Les virus, entités biologiques nécessitant un hôte pour pouvoir se répliquer, sont également peu connus dans leur contribution au microbiome des poissons. Pourtant, les virus sont abondants dans les systèmes aquatiques, où le nombre de bactériophages⁹ libres dans les eaux côtières peut excéder 10⁸ particules par mL (Bergh *et al.*, 1989). De plus, la disponibilité en bactéries dans et sur les poissons offre un environnement propice pour les bactériophages et les virus des protozoaires, déjà considérés comme une importante pression de sélection en participant à la structuration des microbiomes chez d'autres animaux (Bäckhed *et al.*, 2005). Les études ont principalement ciblé les virus pathogènes responsables de maladies infectieuses engendrant des pertes économiques considérables dans le secteur aquacole (Kibenge, 2019). Les études les plus récentes basées sur des méthodes de métagénomique nouvelles générations (mNGS), indiquent l'originalité du virome associé aux poissons, jusque-là sous-estimés (Geoghegan *et al.*, 2021; Filipa-Silva *et al.*, 2021). Appartenant majoritairement aux *Astroviridae*, *Picornaviridae*, *Arenaviridae*, *Reoviridae* et *Hepadnaviridae*, la structure du virome semble être déterminée par l'histoire évolutive de l'hôte (*i.e.* effet de la famille), ainsi que par plusieurs paramètres environnementaux (*i.e.* température de l'eau, profondeur, géographie) et biotiques (*i.e.* diversité de la communauté d'hôte, comportement) (Gadoin *et al.*,

⁸ Polymerase Chain Reaction

⁹ Virus n'affectant que des bactéries, omniprésents dans l'ensemble de la biosphère.

2021; Geoghegan *et al.*, 2021). Il semble également qu'il y ait une biogéographie de celui-ci au sein même de l'hôte (Gadoin *et al.*, 2021).

iv) Le bactériome

En termes d'abondance, les bactéries représentent les microorganismes dominants dans les microbiomes des poissons. Le bactériome des poissons est très diversifié, variable et est majoritairement constitué par des phyla comme les *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* et *Tenericutes* (Nayak, 2010; Llewellyn *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2014). Nous allons voir plus en détail les facteurs qui influencent ce compartiment, généralement appelé microbiome car il représente 98% de la diversité totale de cet ensemble, ainsi que son importance pour l'hôte (Sullam *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2014; Merrifield and Rodiles, 2015).

1. II. B - Déterminants du microbiome des poissons téléostéens

i) Facteurs abiotiques

L'**environnement** joue un rôle clé dans les premières étapes du développement du microbiome où la colonisation du tractus digestif commence dès les premiers stades de développement (Vadstein *et al.*, 2018). Dans un premier temps, la surface des œufs est rapidement colonisée par les microorganismes de l'eau environnante. A l'issue de l'éclosion, une première colonisation par ces microorganismes planctoniques se réalise sur la peau et dans le tractus gastro-intestinal au fur et à mesure de l'eau ingérée (Romero and Navarrete, 2006; McIntosh *et al.*, 2008; Giatsis *et al.*, 2015; Abdul Razak *et al.*, 2019) (**Figure 1.2.2**). A cette étape du développement, l'environnement joue un rôle majeur dans la colonisation du microbiome bien que les transmissions verticales puissent également avoir un rôle important (Long *et al.*, 2014; Sylvain and Derome, 2017), comme observé chez le syngnathe (*Syngnathus typhle*) ovovivipare où le microbiome paternel pourrait être transmis aux larves par les gonades et la poche de gestation (Beemelmans *et al.*, 2019). Par la suite, le microbiome va se développer, en parallèle à son hôte et sera sélectionné par lui, plus que par l'environnement, notamment *via* le développement de son système immunitaire, la différenciation de son tractus intestinal, l'appartenance à une guildes trophique (Llewellyn *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018b; Wilkes Walburn *et al.*, 2019). Toutefois, l'environnement aura toujours une influence sur le microbiome durant la vie de l'hôte et pourra expliquer l'importante variabilité au sein du microbiome entre les individus de même espèce (Sullam *et al.*, 2012; Miyake *et al.*, 2015; Chiarello *et al.*, 2018).

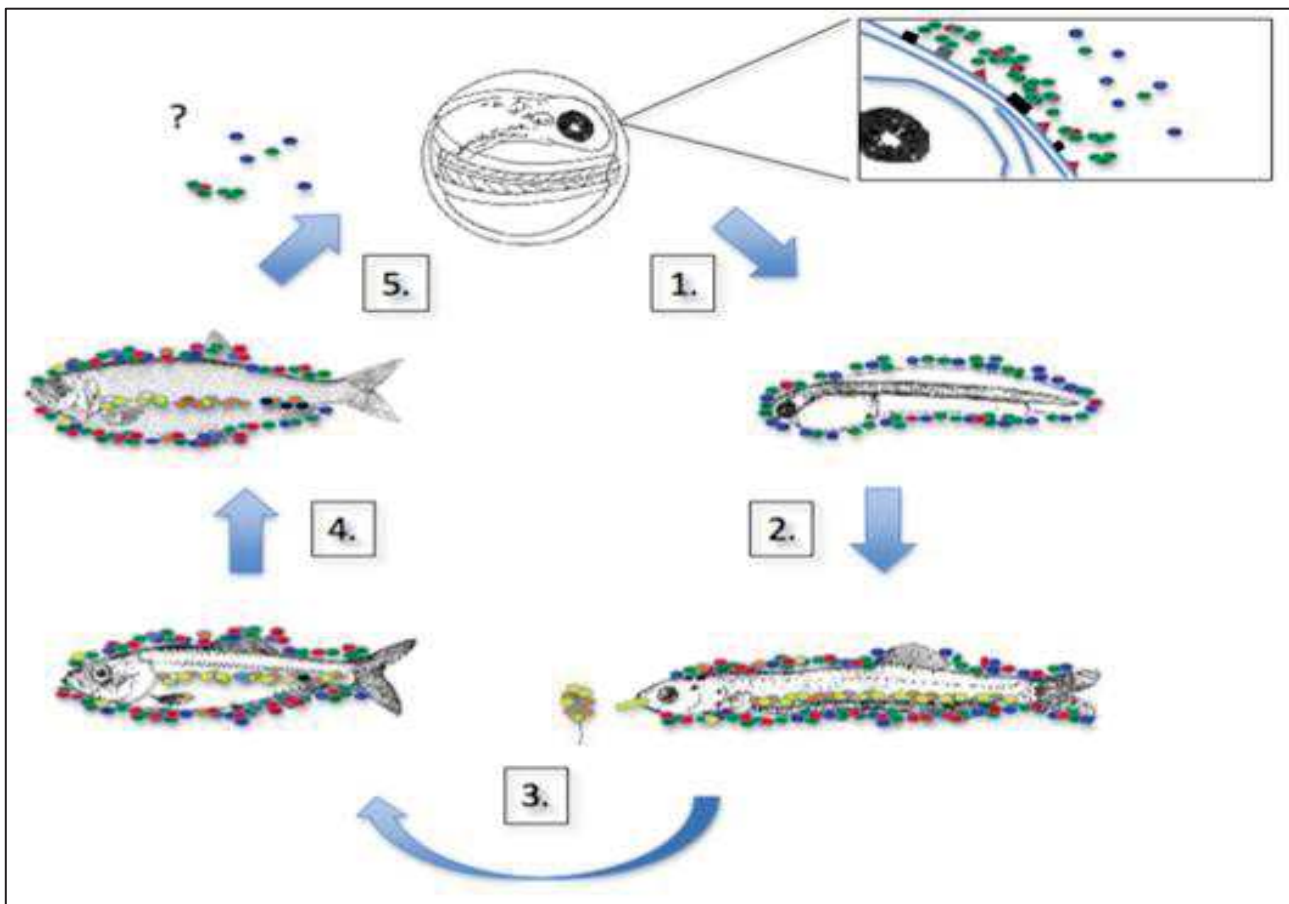


Figure 1.2.2 : Colonisation et établissement du microbiome pendant le développement. Ce schéma représente le développement d'un poisson téléostéen en association avec ses microbiomes (les couleurs représentent différents taxa). **(1)** Les microorganismes libres colonisent le chorion de l'œuf. La variabilité du microbiome en fonction des espèces de poissons suggère des interactions spécifiques très tôt dans le développement qui sont régies par les précurseurs de l'immunité innée (symbolisé par les triangles et les carrés sur la surface du chorion). **(2)** L'œuf éclot, la larve est colonisée par les microorganismes environnementaux et ceux initialement présents sur le chorion. **(3)** La première colonisation du tractus digestif débute lors des premiers repas. Les taxa microbiens ressemblent, dans un premier temps, à ceux associés aux ressources alimentaires. **(4)** Le microbiome se développe et s'enrichit **(5)** Le microbiome adulte est un assemblage divers de taxa microbiens. Des différences existent entre les communautés cutanées et intestinales, également spécialisées en fonction des différentes niches le long du tractus et sur l'ensemble du corps. De potentielles transmissions verticales ont été observées chez certaines espèces mais restent encore mal connues. Figure tirée de Llewellyn *et al.* (2014).

La disponibilité des communautés microbiennes dans l'environnement est fortement dépendante de la **chimie de l'eau**. La salinité est connue pour être un des paramètres environnementaux prépondérant dans la structuration des communautés microbiennes libres (Lozupone *et al.*, 2007; Logares *et al.*, 2009; Auguet *et al.*, 2010). Ceci se reflète également dans le microbiome entérique des poissons comme le montre une méta-analyse faite en 2012 par l'équipe de Sullam, sur 25 espèces de poissons téléostéens, où ils mirent en évidence une

abondance relative importante des OTUs (*Operational Taxonomic Units*, en anglais) des ordres *Aeromonadales* chez les poissons d'eau douce alors que les *Vibrionales* étaient plutôt associées aux poissons marins (Sullam *et al.*, 2012). La concentration en oxygène, des concentrations en ammonium élevées, des variations de pH ont également été identifiées comme déterminants des communautés microbiennes, pouvant causer des phénomènes de dysbiose allant jusqu'à impacter la santé de l'hôte (Zhang *et al.*, 2016a; Sylvain *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2017). Par exemple, chez l'omble (*Salvelinus fontinalis*), une étude a mis en évidence une corrélation entre hypoxie et une augmentation des pathogènes opportunistes au niveau du microbiome cutanée (Boutin *et al.*, 2013). La température peut également influencer le microbiome de l'hôte en fonction de sa tolérance et de sa capacité à s'adapter à ses changements (Kokou *et al.*, 2018). Chez des tilapias par exemple, les variations saisonnières de température modulent l'abondance des bactéries lactiques du microbiome intestinal (Al-Harbi and Naim Uddin, 2004).

Enfin, le type de **ressource nutritionnelle disponible** peut influencer le microbiome intestinal, notamment ses rôles dans la digestion (Carda-Diéguez *et al.*, 2014; Miyake *et al.*, 2015). Plusieurs études ont prouvé l'intérêt d'utiliser des formes peptidiques réduites hydrolysées dans la modulation du microbiome intestinal. L'utilisation de ces peptides courts peuvent favoriser une rapide absorption, augmentant ainsi la disponibilité des acides-aminés et, de surcroît, moduler le développement et la colonisation des microorganismes dans le tractus digestif (Kotzamanis *et al.*, 2007). Les lipides sont également pris en compte dans la modulation du régime alimentaire. Alors qu'ils constituent des macronutriments essentiels dans l'alimentation des poissons, leur niveau de saturation peut leur être délétère (Egerton *et al.*, 2018). Effectivement, ceux-ci peuvent altérer les communautés microbiennes liées au tractus intestinal et provoquer l'inflammation des tissus adipeux (Caesar *et al.*, 2015). Par exemple, des études ont prouvé que l'utilisation d'huile d'origine végétale était plus propice à la santé des poissons et augmenterait leur résistance face aux pathogènes (Lødemel *et al.*, 2001; Ringø *et al.*, 2002; Montero *et al.*, 2010).

Enfin, les populations hôtes environnantes peuvent également servir de **réservoirs microbiens**. C'est notamment le cas dans les récifs coralliens où la diversité microbienne associée aux organismes, poissons mais également invertébrés, représente près de 2.5% de la diversité procaryote sur Terre (Chiarello *et al.*, 2020). L'ensemble de ces holobiontes peuvent entrer en interaction et s'influencer mutuellement, de façon positive ou négative, au travers de processus de dispersions horizontales (Ezzat *et al.*, 2019, 2020). En effet, les holobiontes

marins, par leur présence, influencent les communautés microbiennes de l'eau environnante. Cette eau, ingérée ou aux contacts directs d'autres individus, permet à ces communautés microbiennes de pouvoir transiter et/ou coloniser de nouveaux hôtes (Romero and Navarrete, 2006; Wong *et al.*, 2015; Troussellier *et al.*, 2017; Burns *et al.*, 2017). Cette influence extrinsèque peut déterminer les variabilités du microbiome entre les individus d'une même espèce au niveau du tractus intestinal (Tarnecki *et al.*, 2017; Legrand *et al.*, 2020), cutané (Larsen *et al.*, 2013; Chiarello *et al.*, 2018) mais également au niveau des branchies (Pratte *et al.*, 2018). De même, plusieurs études ont pu démontrer que la proximité directe entre les individus pouvait provoquer une homogénéisation des microbiomes cutané et intestinal chez des espèces différentes de poissons. Ceci a pu être notamment observé dans le cas des gobies *Elacatinus prochilos* où les écotypes « nettoyeurs » présentaient une similarité avec les poissons clients qu'ils nettoyaient (Xavier *et al.*, 2019) (**Figure 1.2.3**).

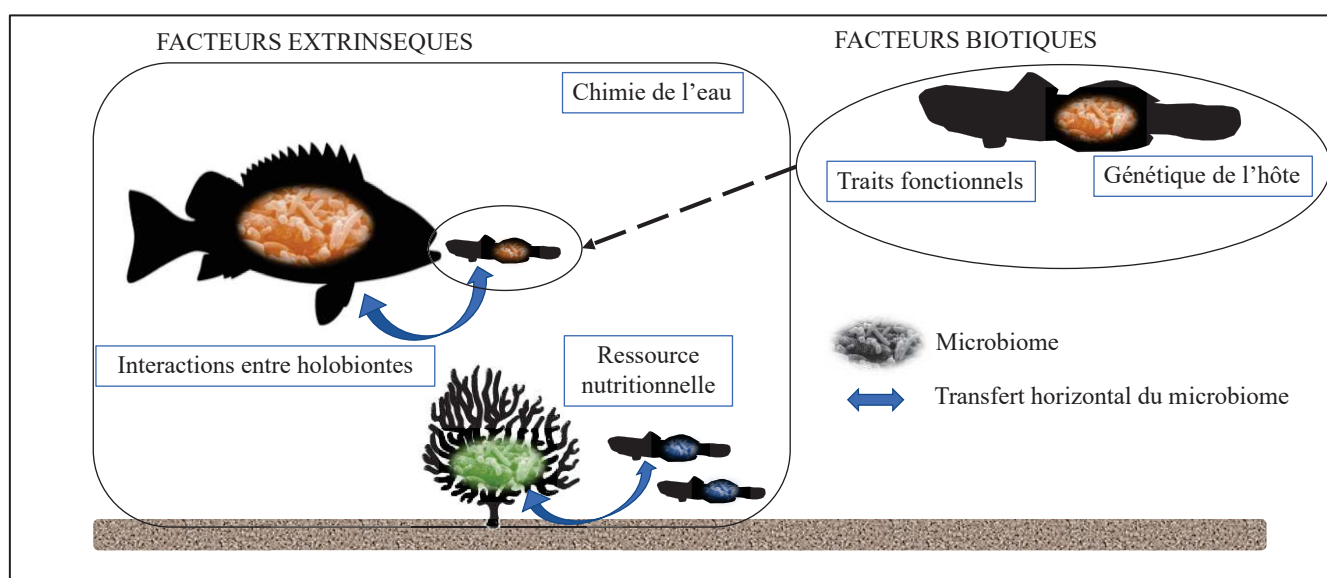


Figure 1.2.3 : Déterminants majeurs des communautés microbiennes associées aux poissons téléostéens. Les facteurs extrinsèques comme la chimie de l'eau (*i.e.* température, salinité) vont directement sélectionner les microbiomes, voire les déséquilibrer en cas de parasitisme, pollution ou de stress. Les interactions entre les hôtes ou avec un type de ressource nutritionnelle (*i.e.* nature de la proie) va également favoriser les transmissions horizontales et permettre la colonisation de certains microorganismes qui seront sélectionnés par les facteurs biotiques. Ces derniers sont directement liés aux traits fonctionnels de l'hôte (*i.e.* régime alimentaire, comportement) et à sa génétique (*i.e.* structures anatomiques, système immunitaire).

ii) Facteurs biotiques

Chez les poissons, les déterminants les plus forts influençant les microbiomes sont ceux relatifs à l'hôte (Rawls *et al.*, 2006). Comme vu précédemment, les poissons sont en contact perpétuel avec les microorganismes planctoniques. Pourtant, nous savons aujourd'hui que leur microbiome est nettement différent des microorganismes environnementaux. Cette sélection, intimement liée à la **génétique de l'hôte** et à ses **traits fonctionnels** (Figure 1.2.3), structure le microbiome dans l'espace et le temps.

Les facteurs liés à l'hôte semblent être très importants dans l'établissement du microbiome mais également dans sa structuration (Roeselers *et al.*, 2011; Bevins and Salzman, 2011). Roeselers et ses collaborateurs ont suggéré que l'hôte, tel un potier, est capable de « sculpter » son microbiome. En comparant des individus de poisson zèbre issus de différents environnements (*i.e.* différents laboratoire et provenant du milieu sauvage), ils ont en effet pu mettre en évidence que, même si des différences étaient notées entre les microbiomes digestifs des différents groupes, les taxa dominants restaient conservés chez tous les individus. Ainsi, peu importe leur provenance et les différences environnementales, les poissons zèbres possédaient un core microbiome soumis à des pressions sélectives imposées par l'écosystème digestif de l'hôte. D'autres études ont également comparé les communautés microbiennes entre différentes espèces et ont prouvé l'importance de l'effet lié à l'espèce, que ce soit pour les communautés du tractus intestinal (Sullam *et al.*, 2012; Givens *et al.*, 2015), ou les communautés cutanées (Chiarello *et al.*, 2018). Cet effet semble expliquer les structures microbiennes dès les premiers stades, à l'œuf (Bai and Hou, 2020), mais également au stade de larve (Parris *et al.*, 2016). Toutefois, bien que les microbiomes de poissons soient caractéristiques de l'espèce, ce patron ne semble pas être lié à l'histoire évolutive de l'hôte. En effet, dans la plupart des études réalisées à ce jour, les microbiomes des téléostéens ne se ressemblent pas plus entre espèces phylogénétiquement proches (Givens *et al.*, 2015; Chiarello *et al.*, 2018; Doane *et al.*, 2020; Escalas *et al.*, 2021). La phyllosymbiose ne semble donc pas être un patron observé fréquemment chez les poissons téléostéens, au contraire des Elasmobranches¹⁰ (Doane *et al.*, 2020). Il est toutefois important de noter que la plupart de ces études ont été réalisées sur de faibles effectifs (en termes de diversité d'espèces et d'échelle de temps de diversification) et essentiellement sur les microbiomes cutanées. Or chez ces derniers, le signal de phyllosymbiose est en général plus faible que sur des organes internes comme le tractus intestinal (Mazel *et al.*, 2018). Ceci dit, cet effet pourrait être simplement dû au fait qu'il

¹⁰ Sous-classe des poissons cartilagineux à laquelle appartiennent les raies et les requins.

y ait bien plus d'études analysant la phylosymbiose pour le microbiome entérique que pour le cutané (Lim and Bordenstein, 2020).

A plus fine échelle, il existe une multitude de niches écologiques à l'échelle du corps et à l'échelle des organes de l'hôte. Celles-ci sont caractérisées par des paramètres physico-chimiques ainsi qu'à une influence des tissus lymphoïdes très spécifiques ayant une forte valeur sélective sur les communautés microbiennes (Kelly and Salinas, 2017). De ce fait, les microbiomes se distinguent en termes de communauté selon différentes régions du corps entre le tractus intestinal, les organes olfactifs, le cutané et les branchies (Llewellyn *et al.*, 2014; Chiarello *et al.*, 2015; Legrand *et al.*, 2018; Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2020) (**Figure 1.2.4**). Des distinctions en termes de richesse ont également été rapportées, avec le microbiome cutané étant le plus riche, suivi des organes olfactifs, des branchies et du tractus intestinal (Wang *et al.*, 2010; Lowrey *et al.*, 2015; Sehnal *et al.*, 2021). Comme observé entre différentes zones cutanées chez les mammifères (Grice and Segre, 2012), des différences semblent également exister entre les microbiomes cutanés des différentes nageoires (Chiarello *et al.*, 2015).

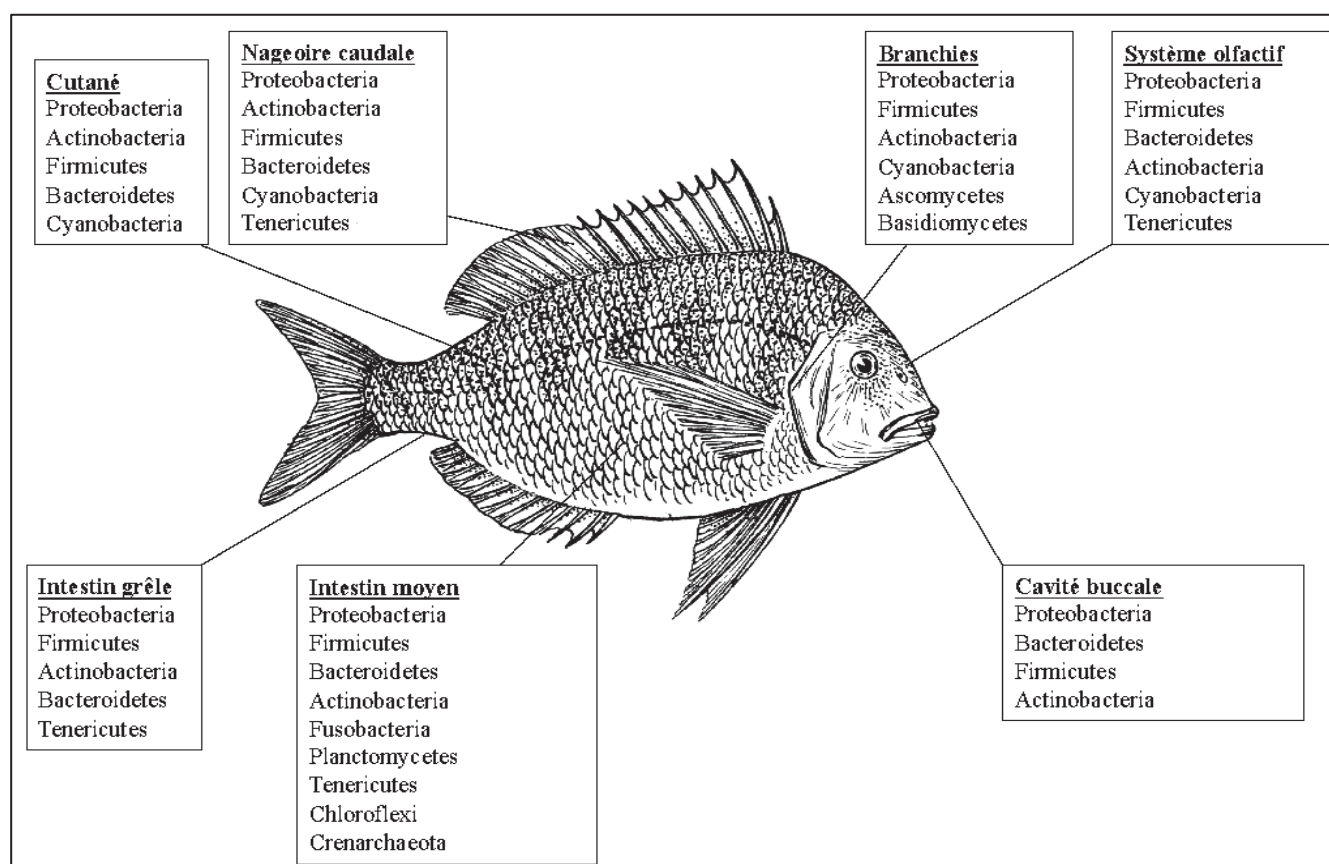


Figure 1.2.4 : Représentation schématique des compositions microbiennes au niveau du Phylum selon les observations générales trouvées dans la bibliographie. Le microbiome cutané est fortement similaire à celui des nageoires bien que des différences entre individus et entre espèces puissent survenir,

suggérant l'influence de processus stochastiques (Chiarello *et al.*, 2015; Gallet *et al.*, 2019). Le mucus présent à la fois sur la peau, les branchies, la cavité buccale et le système olfactif semble favoriser l'installation et le développement des même phyla microbiens (Lowrey *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2018; Gallet *et al.*, 2019; Rosado *et al.*, 2019; Brown *et al.*, 2019; Legrand *et al.*, 2020). Ces niches écologiques exposées à l'environnement sont pourtant constituées de microorganismes différents des communautés planctoniques. Elles se distinguent également des communautés entériques, majoritairement constituées d'espèces anaérobies (Sullam *et al.*, 2012; Llewellyn *et al.*, 2014; Egerton *et al.*, 2018) sélectionnées par les différentes micro-niches écologiques le long du transit digestif (Ringø *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2017).

Une biogéographie le long du tractus intestinal des poissons a également été décrite chez les poissons. Chez ces derniers, le tractus intestinal est composé de différentes parties aux différentes conditions physico-chimiques (Gajardo *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019), constituant un déterminant des communautés microbiennes intestinales plus fort que le régime alimentaire (Feng *et al.*, 2019). En effet, les variations de pH, d'oxygène et la disponibilité des nutriments entre la bouche, l'œsophage, l'estomac, le caecum pylorique, l'intestin haut, moyen et bas pourraient sélectionner et déterminer les compositions microbiennes (Egerton *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Ringø *et al.*, 2018). Il est intéressant de noter que la grande diversité de traits morphologiques des tractus digestifs des poissons (**Figure 1.2.5**), notamment entre carnivores et herbivores, explique également une variabilité entre les guildes trophiques dans les compositions microbiennes intestinales (Mountfort *et al.*, 2002; Sullam *et al.*, 2012; Egerton *et al.*, 2018; Escalas *et al.*, 2021). Cette variabilité est également observable intra-gilde trophique grâce à la grande diversité trophique présente chez les téléostéens.

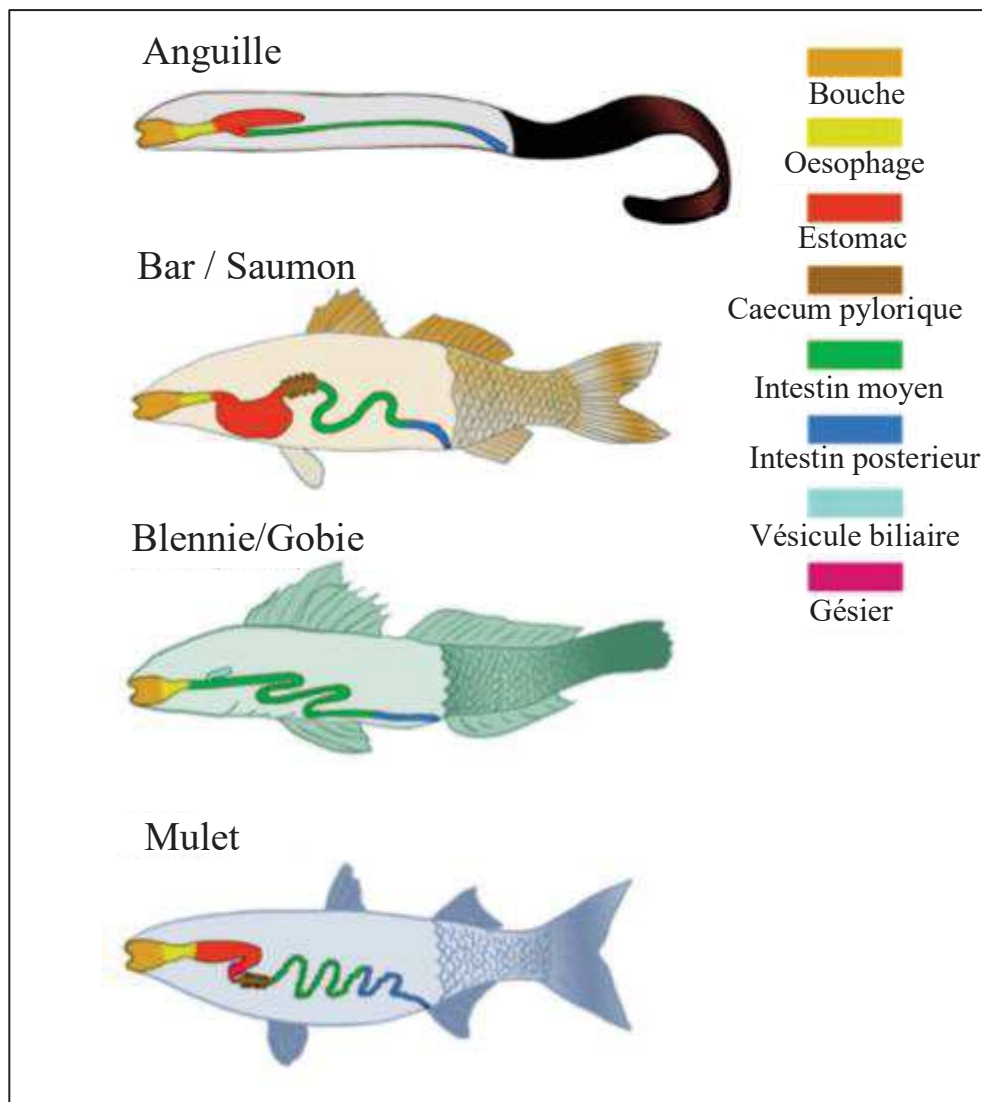


Figure 1.2.5 : Représentation des différents types d'appareils digestifs chez les téléostéens marins. Environ 20% d'espèces comme les gobies ou les blennies n'ont pas d'estomacs mais peuvent présenter d'autres structures comme un pharynx ou une vésicule biliaire. L'estomac, quand il est présent, peut également présenter différentes formes : I chez les mullets, les anchois ou les aloses, U chez les omnivores et carnivores comme le bar et les *Salmonidae*, Y avec la présence d'un caecum gastrique chez les macrophages comme les anguilles. Figure reprise de Egerton *et al.* (2018).

En effet, les **traits fonctionnels**, comme la guildes trophique, est l'un des déterminant majeur de la structure du microbiome entérique chez les poissons (Sullam *et al.*, 2012; Tarnecki *et al.*, 2017), où les espèces herbivores recèlent une plus grande diversité par rapport aux omnivores et carnivores (Sullam *et al.*, 2012). Plusieurs études ont corroboré que le microbiome entérique des herbivores était principalement constitué de *Firmicutes* (Mountfort *et al.*, 2002; Clements *et al.*, 2007), alors que celui des carnivores serait plus riche en *Proteobacteria* (Miyake *et al.*, 2015; Egerton *et al.*, 2018) avec les genres dominants *Vibrio* et *Photobacterium*

qui sont les plus communément décrits (Smriga *et al.*, 2010; Givens *et al.*, 2015; Egerton *et al.*, 2018), et qui pourraient jouer un rôle clé dans la digestion (Ray *et al.*, 2012). L'influence du régime alimentaire se note également intra guildes trophiques (Clements *et al.*, 2007; Miyake *et al.*, 2015; Urrutia-Cordero *et al.*, 2015; Egerton *et al.*, 2018). Les herbivores regroupent une large gamme de comportements alimentaires distincts avec des brouteurs de macroalgues (*e.g.* les poissons lapins, les poissons chirurgiens) où certains mangeront la fronde¹¹ et d'autres le stipe¹², des rappeurs d'algues encroûtantes (*e.g.* les poissons perroquets) ou également des détritivores (*e.g.* poissons chirurgiens). Quant aux carnivores, ils pourront être distingués en fonction de leurs proies préférentielles (*i.e.* crustacivore, piscivore, macroinvertivore, microinvertivore, corallivore).

Il est également intéressant de noter que l'interaction avec d'autres espèces peut moduler le microbiome des poissons. En effet, dans les fermes aquacoles, les infections liées au **parasitisme** par les copépodes communément appelés "poux du saumon" (*Lepeophtheirus salmonis*) ou les protozoaires ciliés (*Ichthyophthirius multifiliis*), peuvent fortement impacter le microbiome cutané et induire une dysbiose avec un développement important de bactéries pathogènes (*i.e.* *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Tenacibaculum* et *Pseudomonas*) favorisant ainsi des infections secondaires (Zhang *et al.*, 2018b). Il a été également observé chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*), que des virus de la famille des *Alphavirus* peuvent également infecter la peau et créer ce même type de déséquilibre microbien sur l'ensemble du corps (Reid *et al.*, 2017), comme des entérites intestinales observées chez la sériole (*Seriola lalandi*) (Legrand *et al.*, 2018).

Le **stress** lié à ces perturbations environnementales, qu'elles soient biotiques ou abiotiques, a également été corrélé à un déséquilibre du microbiome intestinal avec un impact sur la diversité et changement dans la composition des communautés où une diminution des bactéries lactiques a été notée chez le saumon atlantique. Ces modifications dans la structure du microbiome pourrait *in fine* favoriser l'état de stress et impacter la santé de l'hôte (Uren Webster *et al.*, 2020).

¹¹ Organe végétal jouant le rôle de feuille chez les algues.

¹² Tige soutenant la fronde souvent accrochée au substrat avec des crampons.

1. II. C - Rôles du microbiome intestinal des poissons

En utilisant des modèles gnotobiotiques¹³, plusieurs études ont permis de mettre en évidence le rôle crucial du microbiome intestinal dans l'absorption et le métabolisme des nutriments, le métabolisme xénobiotique¹⁴, l'homéostasie¹⁵, la dynamique épithéliale, l'angiogénèse¹⁶ et le développement et la maturation épithéliale du système immunitaire (Marques *et al.*, 2006; Bates *et al.*, 2006; Rawls *et al.*, 2006, 2007; Dierckens *et al.*, 2009; Nayak, 2010; Verstraete, 2015).

Comme vu chez d'autres animaux, les premières expositions et l'établissement d'un microbiome diversifié et résilient vont assurer une santé optimale pour l'hôte, notamment au travers de fonctions nutritionnelles, immunitaires et homéostatiques, qui lui seront vitales (Llewellyn *et al.*, 2014; Vadstein *et al.*, 2018; Sehnal *et al.*, 2021). Dans le cas contraire, le retard pris dans l'établissement d'un microbiome sain est irréversible et peut avoir des répercussions sur l'hôte une fois adulte (Hassenrück *et al.*, 2020). En effet, la maturation de l'épithélium intestinal est intimement dépendante de l'activité du microbiome intestinal (Rawls *et al.*, 2004; Rekecki *et al.*, 2009). Le rôle du microbiome dans le système immunitaire digestif, également appelé GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissues* en anglais) confère non seulement une protection contre les agents infectieux, mais régule également l'immunité dans le tractus digestif des poissons (Nayak, 2010). La maturation et le bon fonctionnement du GALT sont ainsi dépendants d'une interaction complexe entre le microbiome intestinal, l'épithélium intestinal et les composants immunitaires. La stimulation dans le GALT pourrait ce faire dès les premières colonisations, avec la détection d'antigènes associés aux pathogènes (*e.g. Staphylococcus aureus*), qui pourrait stimuler la prolifération des cellules B¹⁷ dans le GALT (Medzhitov and Janeway, 1997; Leadbetter *et al.*, 2002). L'exposition aux bactéries dès le début du développement, et les colonisations secondaires, sont donc très importantes pour le développement de la barrière intestinale, ce qui a amené les études à se concentrer sur les compléments alimentaires comme les probiotiques, pour favoriser le développement du microbiome des poissons d'élevage (Nayak *et al.*, 2007).

Pendant la vie du poisson, le microbiome intestinal contribue encore au métabolisme, en synthétisant notamment des vitamines, des facteurs de croissance et des enzymes métaboliques

¹³ Animaux élevés en conditions axéniques, contrôlés ou avec un microbiome connu et stable

¹⁴ Se dit d'une activité métabolique qui n'est pas produite par l'organisme, ici l'hôte mais par son microbiome.

¹⁵ Stabilisation d'une caractéristique physiologique autour d'une valeur fixe grâce à un processus de régulation.

¹⁶ Formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, notamment lors du développement embryonnaire.

¹⁷ Leucocytes de type B, composant majeur du système immunitaire à l'origine de la production d'anticorps.

essentiels et spécifiques aux régimes alimentaires carnivore (e.g. carbohydrases, phosphatases, estérases, lipases) et herbivore (e.g. peptidases, cellulases, lipases, protéases) (Bairagi *et al.*, 2002; Ramirez and Dixon, 2003; Izvekova and Lapteva, 2004). Par exemple, les bactéries anaérobies comme les *Clostridiales* (Ley *et al.*, 2008a), dont les *Lachnospiraceae* et *Clostridiaceae*, ou les *Bacteroidales* avec les *Rikenellaceae*, jouent un rôle important dans la digestion et l'absorption des nutriments (Miyake *et al.*, 2015; Ngugi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018a; Jones *et al.*, 2018), et pour fabriquer des acides gras volatiles (Clements and Choat, 1997) issus de la fermentation (Smith *et al.*, 1996). Leurs abondances sont également corrélées positivement aux concentrations en vitamine B12 (Sugita *et al.*, 1990), vitamine impliquée comme cofacteur¹⁸ dans la synthèse et la régulation de l'ADN et des acides gras¹⁹ chez l'hôte.

Aujourd'hui, nous savons que le microbiome intestinal des téléostéens est très caractéristique à cet organe et qu'il y joue un rôle crucial, tant bien dans le développement du système immunitaire et cellulaire, qu'au niveau du métabolisme de digestion. De multiples facteurs expliquent sa structure et sa variabilité mais peu d'études se sont concentrées sur son évolution à l'échelle d'une grande diversité d'espèce hôte aux traits fonctionnels divers ou sur l'effet d'une modification de leur habitat naturel. De ce fait, les poissons coralliens sont de parfaits candidats pour étudier ces derniers points encore inexplorés et seront les modèles principaux de mes travaux de thèse.

¹⁸ Composé chimique non protéique nécessaire à l'activité biologique d'une protéine.

¹⁹ Molécule formée d'une chaîne carbonée liée à des hydrogènes et terminée par un groupement acide.

1. II. D - Cas du microbiome des poissons coralliens

i) Les récifs coralliens

Les récifs coralliens sont particulièrement vulnérables face au changement climatique. Depuis les années 1970, les épisodes récurrents de blanchissement de masse ont déjà causé le déclin de la couverture corallienne globale sur Terre (Hughes, 2003; Wilkinson, 2004) et menacent d'extinction un tiers des espèces coralliennes (Carpenter *et al.*, 2008; Polidoro *et al.*, 2011). Le dernier rapport en date du GIEC pointe une potentielle accentuation de ces phénomènes liés à une augmentation des températures de +5°C à l'horizon 2050 (IPCC, 2021). L'augmentation des températures de surface s'accompagnent également d'une forte acidification des océans, menaçant ainsi la construction des barrières de coraux scléactiniaires²⁰ (Feely, 2004; Kleypas *et al.*, 2005) et pourrait entraîner le déclin de certains récifs à la fin du siècle (Guinotte *et al.*, 2003; Munday *et al.*, 2008). Ceci, associé à la surexploitation des poissons herbivores et à la pollution issue du lessivage continental, participent à la réduction de la couverture corallienne et favorisent le développement de macroalgues (Mumby, 2006; Graham *et al.*, 2015). Le développement de ces macroalgues n'est pas sans conséquence sur la structure trophique du système. Ces algues, non consommées, vont être une source de matière organique dissoute (MOD) enrichie en sucre labiles, favorisant le développement microbien. Ce phénomène de microbialisation a été rapporté dans Haas *et al.*, 2016 et fonctionne sur le principe de la boucle DDAM (*DOC, Disease, Algae, Microorganism* en anglais). La MOD labile est rapidement utilisée par les microorganismes copiotrophes²¹ (Haas *et al.*, 2010, 2016; Wild *et al.*, 2010; Haas and Wild, 2010). Nombre de ces bactéries sont des pathogènes opportunistes ayant le potentiel de reminéraliser, à un taux élevé, les nutriments organiques disponibles (Nelson *et al.*, 2013a; Haas *et al.*, 2013). Ces dernières peuvent ainsi impacter la santé des coraux en créant des zones hypoxiques et agir en tant que pathogènes (Kuntz *et al.*, 2005; Kline *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2013a). Les coraux, en mourant, laissent ainsi plus d'espace en faveur des algues, alimentant ainsi la boucle DDAM (Dinsdale *et al.*, 2008; Barott and Rohwer, 2012). Les phénomènes de microbialisation semblent impacter l'ensemble des récifs coralliens (Haas *et al.*, 2016) et sont d'autant plus forts lorsqu'ils sont couplés aux impacts humains (Halpern *et al.*, 2008; McDole *et al.*, 2012). L'ensemble de ces perturbations est donc non seulement dramatique pour la survie des coraux,

²⁰ Coraux durs, souvent en forme de sphère ou de buisson, comprenant environ 800 espèces

²¹ Organismes à croissance rapide dans un environnement riche en nutriment, notamment en carbone organique.

mais également pour tous les réseaux trophiques (Dinsdale *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2012) et les services écosystémiques²² associés. Ces services comprennent notamment l'apport en protéines apportées aux populations littorales, les revenus liés aux activités halieutiques et au tourisme, mais également la protection des communautés littorales face aux cyclones et tsunامي (Haas *et al.*, 2010, 2011; Wild *et al.*, 2010; Cardinale *et al.*, 2012). Ces écosystèmes sont riches d'une grande diversité d'espèces et de fonctions, et se définissent donc comme un hot-spot²³ de diversité animale (Bellwood *et al.*, 2012). La contribution des poissons coralliens, en termes de biomasse et de diversité d'espèces et de traits fonctionnels, font d'eux une composante majeure pour ces écosystèmes.

ii) Les poissons coralliens et leur rôle pour les services écosystémiques

La diversification des poissons coralliens est l'une des plus fructueuse de l'évolution avec > 6 000 espèces de poissons aujourd'hui décrites (Kulbicki *et al.*, 2013). Les processus historiques et écologiques ont influencé de façon globale les distributions de poissons coralliens, notamment lors du Miocène (23 – 5.3 Ma), où la configuration des récifs a été l'un des déterminant majeur de leur cladogénèse²⁴ (Bellwood *et al.*, 2017). Cette époque a notamment été bouleversée par des changements géomorphologiques majeurs qui ont remanié la biogéographie marine avec la formation de l'archipel Indo-Australien, considéré comme un hot-spot de biodiversité marine (Renema *et al.*, 2008). Le Miocène est également une période d'innovations évolutives avec de nouvelles niches trophiques, accompagné d'adaptations morphologiques pour des régimes très spécialisés de détritivorie ou corallivorie (*e.g.* les dents des poissons perroquets) (Bellwood *et al.*, 2014a;b). Ces processus d'innovations morphologiques et trophiques ont également été corrélés à l'augmentation des lignées chez certains groupes de poissons récifaux (Price *et al.*, 2010; Lobato *et al.*, 2014; Clements *et al.*, 2017). Une étude récente a démontré que l'évolution trophique était un déterminant majeur dans la diversification récente des poissons. Cette observation est d'autant plus vraie chez les guildes spécialistes des bas niveaux trophiques comme chez les herbivores/détritivores (*e.g.* poissons chirurgiens *Acanthuridae*), les invertivores sessiles (*e.g.* poissons papillons *Chaetodontidae*) et les planctivores (*e.g.* les demoiselles *Pomacentridae*). Chez les herbivores, les taux de diversification importants sont également fortement corrélés aux espèces les plus grandes (Siqueira *et al.*, 2020) (**Figure 1.2.6**).

²² Services écologiques procurés par les écosystèmes considérés comme bien commun ou bien public.

²³ Zone critique de biodiversité qui abrite une grande richesse biologique à la fragilité importante.

²⁴ Processus évolutif aboutissant à la scission d'une lignée ancestrale en au moins deux lignées descendantes.

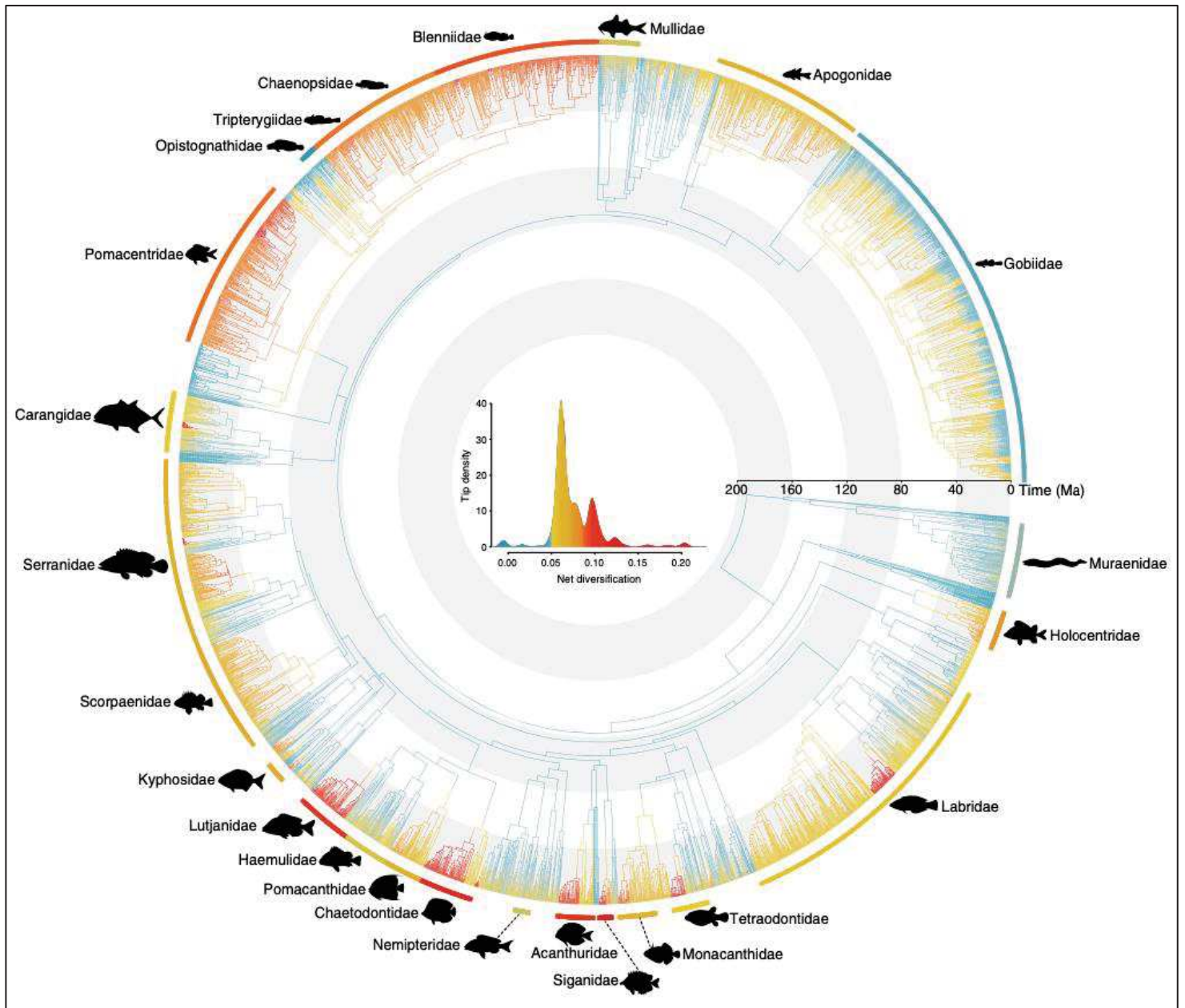


Figure 1.2.6 : Arbre phylogénétique des poissons coralliens et leur taux de diversification. Les branches bleues représentent des taux de diversification faibles, le jaune des taux intermédiaires et le rouge, des valeurs de forte diversification. Les arcs extérieurs représentent le taux de diversification médian pour chaque famille représentée par leur silhouette respective, issues du package R *fishualize* (Schiettekatte *et al.*, 2020). Figure reprise de Siqueira *et al.*, 2020.

Aujourd'hui, cette grande diversité taxonomique et fonctionnelle favorise la résilience²⁵ des systèmes coralliens, qui subissent des menaces croissantes due à la mauvaise qualité de l'eau (*i.e.* pollution, acidification, réchauffement des températures de surface), dégradation de l'habitat et surexploitation (Hughes, 1994; Roberts, 1995; Edinger *et al.*, 1998; Lefcheck *et al.*, 2019). Ces perturbations sont les principales causes de changement de structure dans les récifs (Mumby *et al.*, 2006), de productivité réduite (Worm *et al.*, 2006), et d'une résilience affaiblie (Bellwood *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2007). Les poissons sont une force majeure dans la structuration des récifs, contrôlant la distribution et l'abondance de nombreux taxa récifaux, notamment benthique (Ceccarelli *et al.*, 2001), *via* les contrôles de prédation « top/down ». Pourtant, certaines espèces sont sujettes à la surexploitation, résultant en une diminution de la diversité fonctionnelle et des services systémiques apportés (Micheli *et al.*, 2005; Mumby, 2006). Les herbivores favorisent le développement, la survie et la reproduction des coraux en consommant les algues, évitant ainsi leur développement et la colonisation des récifs par celles-ci (Hughes *et al.*, 2010). La surexploitation de ces espèces herbivores, notamment aux Caraïbes, a ainsi conduit à de nombreux changements benthiques dans les récifs, tels que la couverture corallienne a diminué de 80-90% en une cinquantaine d'années, laissant place à des récifs colonisés par les macroalgues (Côté *et al.*, 2005; Bruno *et al.*, 2009; Hughes *et al.*, 2010).

Les poissons coralliens, de par leur diversité de traits alimentaires et comportementaux, jouent un rôle essentiel en régulant les populations des récifs. C'est notamment le cas des poissons demoiselles (*Pomacentridae*) du genre *Stegastes* au comportement très territorial, qui dessinent leur environnement tels des jardiniers, en cultivant certaines espèces d'algues dont ils se nourrissent, n'hésitant pas à repousser certains visiteurs opportuns, que ce soit des petits invertébrés ou des plus grosses espèces comme l'humain lors de ses plongées (Ceccarelli *et al.*, 2001). Les poissons coralliens sont donc bénéfiques dans le contrôle des espèces, et notamment les espèces invasives, comme les étoiles de mers pourpres *Acanthurus solaris* qui menacent la santé des coraux en les prédatant (Cowan *et al.*, 2020). Par ailleurs, les carnivores sont importants pour les transferts d'énergie vers les niveaux trophiques supérieurs, étant ainsi une source de provision de nourriture et de ressources économiques (Hixon, 1991; Sadovy, 2005). C'est notamment le cas des piscivores qui constituent une part importante pour les pêcheries artisanales (*i.e.* les mérous, les empereurs, les carangues) et peuvent atteindre une biomasse > 200 kg/ha dans certains récifs (Kulbicki *et al.*, 2009). Les carnivores étant fortement associés à des récifs coralliens sains, les futures prédictions annoncées sur ces derniers pourraient bien

²⁵ Aptitude à retrouver un état initial après une perturbation.

affecter les populations littorales strictement dépendantes de cette ressource (Coker *et al.*, 2014).

La diversité fonctionnelle des poissons coralliens a été largement étudiée ces dernières années, notamment chez les herbivores. Aujourd'hui, de par leur diversité de traits écologiques et de leur importance pour les récifs, les poissons coralliens représentent un grand potentiel pour des études complémentaires (Burkepile and Hay, 2008, 2011; Rasher *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2020), notamment dans le domaine de la microbiologie.

iii) Les microbiomes associés aux poissons coralliens

Les microbiomes des poissons coralliens ont été très peu étudiés malgré leur importance pour l'écosystème (une trentaine d'études ont pu être trouvées dans la bibliographie)(**Table 1.2.1**). A l'exception de deux études particulièrement notables qui ont analysé une grande diversité d'espèces et de familles de poissons coralliens (Chiarello *et al.*, 2018; Pratte *et al.*, 2018), la plupart des études ont ciblé préférentiellement des familles de poissons herbivores comme les poissons chirurgiens (*Acanthuridae*) ou les poissons lapins (*Siganidae*), ainsi que les corallivores comme les poissons-perroquets (*Scarinae*). Toutefois, alors que les études sur les microbiomes portent généralement plus sur le tractus digestif ou les contenus fécaux, ce n'est pas vraiment le cas chez les poissons coralliens où d'autres organes tels que la peau et les branchies ont pu être tout autant étudiés (**Table 1.2.1**).

Dans leur étude de 2018, Chiarello *et al.* démontrent que la grande diversité de traits taxonomiques et fonctionnels des poissons coralliens est à l'origine d'une diversité exceptionnelle de microbiomes ayant une composition originale comparée aux communautés microbiennes planctoniques (Chiarello *et al.*, 2018, 2020). Les poissons coralliens seraient donc un hot-spot de diversité microbienne. Nous l'avons vu dans la partie précédente, l'hôte via ses traits fonctionnels (*e.g.* type de ressource nutritionnelle) et l'environnement peuvent influencer la structure des microbiomes par la sélection, via les paramètres physico-chimiques de l'eau mais également par des processus de dispersion entre les différents réservoirs microbiens. Bien que les communautés microbiennes soient différentes de l'eau de mer, de nombreuses études ont mis en évidence la connectivité microbienne des poissons coralliens avec les autres organismes (*e.g.* coraux (Ezzat *et al.*, 2019, 2020), macroalgues (León-Zayas *et al.*, 2020), autres poissons (Xavier *et al.*, 2019)) ainsi qu'avec l'environnement (*e.g.* sédiment (León-Zayas *et al.*, 2020)).

De ce fait, ces holobiontes sont menacés par les perturbations environnementales et la pression anthropique que subissent les espèces coralliennes, dont la perte des plus vulnérables pourrait induire une érosion de la diversité procaryote ainsi que leur fonctions associées (Chiarello *et al.*, 2020). De plus, l'adaptation du microbiome à un changement de conditions environnementales n'est pas systématique et peut avoir de graves conséquences sur son hôte. Par exemple, l'exposition de larves des poissons-clown *Amphiprion percula* à des eaux chargées en sédiment peut induire une dysbiose avec une charge de pathogène importante au niveau du microbiome des branchies (Hess *et al.*, 2015). Chez une autre espèce de poisson-clown, *Premnas biaculeatus*, un jeûne alimentaire suivi d'une alimentation rapide peut provoquer une altération du microbiome entérique (Parris *et al.*, 2019). Également, des sites pollués peuvent induire une homogénéisation du microbiome entérique chez les carnivores de la famille des *Serranidae*, impactant *in fine* les fonctions vitales de celui-ci pour son hôte (Hennersdorf *et al.*, 2016). Ainsi, ces études préliminaires peuvent d'ores et déjà offrir un premier aperçu de l'impact des perturbations environnementales et de la diminution des ressources alimentaires liées au changement climatique actuel sur les microbiomes des poissons coralliens. Il reste néanmoins encore un grand champ d'application quant aux espèces à étudier et aux différents déterminants qui pourraient structurer leur microbiomes.

Table 1.2.1 : État de l'art des 35 publications faites sur les poissons coralliens et leurs microbiomes associés. Les microbiomes associés au tractus digestif, à la peau et aux branchies représentent la majorité des études et se concentrent principalement sur les modèles herbivores ou corallivores (*i.e. Acanthuridae, Scaridae, Chaetodontidae*) et les poissons à intérêt aquariophiles (*i.e. Pomacentridae, Labridae*). Au total, 101 espèces ont été étudiées pour leur microbiome entérique, 61 espèces pour le microbiome cutané, 46 espèces pour le microbiome branchiale, 3 espèces pour le microbiome buccale, 2 pour le microbiome des œufs et une seule pour le microbiome du sang. Le nombre d'espèces étudiées par type de microbiome est représenté dans la colonne N.

Famille	N	Gilde	Microbiome	Résultats
Acanthuridae	n = 33	Herbivore, Corallivore, Omnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce et au type de ressources alimentaire (1:6) ; <i>Epulopiscium</i> est un symbionte majoritaire (2,3,7:9); Absence d'archée (10) ; Bactéries spécifiques aux fonctions de digestion herbivores (4,6,8) ; Bactéries opportunistes potentiellement pathogènes pour les coraux (11,12) ; Influence de l'ontogénie (13,14)
	n = 10		Cutané	
	n = 11		Branchie	
Balistidae	n = 2	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (14,15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (14,15) ; Influence de l'ontogénie (14)
	n = 2		Cutané	
Blenniidae	n = 2	Herbivore	Branchie	
	n = 2		Tractus digestif	
Chaetodontidae	n = 14	Omnivore, Corallivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (14,15, 18) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (14,15, 18) ; Influence de l'ontogénie (14) ; Activité anti-parasite (19)
	n = 6		Branchie	
	n = 6		Tractus digestif	
Caesionidae	n = 2	Carnivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (14,15, 18) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (14,15, 18) ; Influence de l'ontogénie (14)
Apogonidae	n = 2	Planctonivore	Tractus digestif	Influence de l'ontogénie (16)
Carangidae	n = 1	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce et à la guildes trophique (17)
	n = 1	Carnivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15)

Cirrithidae	n = 2	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce (14,20) ; Influence de l'ontogénie (14) ; Biogéographie le long du transit (20)
	n = 2		Branchie	Spécifique à l'espèce (14,20) ; Influence de l'ontogénie (14)
Diodontidae	n = 1	Carnivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15)
	n = 1		Tractus digestif	Spécifique à l'espèce et à la guildes trophique (17)
Ephippidae	n = 2	Carnivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15)
Gobiidae	n = 1	Carnivore	Cutané	Influence de l'écotype entre les gobies nettoyeurs, portant une forte charge pathogène et les non-nettoyeurs (21)
	n = 1		Tractus digestif	
Holocentridae	n = 2	Carnivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (14,15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (14,15) ; Influence de l'ontogénie (14) ; Pas d'activité antimicrobienne (22)
	n = 2		Branchie	Spécifique à l'espèce (14) ; Organe spécifique (14) ; Influence de l'ontogénie (14)
	n = 2		Tractus digestif	
Kyphosidae	n = 1	Herbivore	Tractus digestif	Influence de l'ontogénie (23) ; Activité de fermentation (23)
	n = 1		Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15)
	n = 5 n = 3		Tractus digestif Branchie	Spécifique à l'espèce et au régime alimentaire (14,24,25) ; Organe spécifique (14) ; Influence de l'ontogénie (14) ; Bactéries fermentative (25)
Labridae	n = 3	Carnivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15)
	n = 1		Œufs	Spécifique à l'espèce avec une forte charge en pathogène et bactéries chemo-hétérotrophiques impliquées dans le cycle de l'azote (26)
Lethrinidae	n = 1	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (14,15,24) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (14,15,24) ; Influence de l'ontogénie (14)
	n = 1		Branchie	
	n = 1		Cutané	

Lutjanidae	n = 4	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce (14) ; Influence de l'ontogénie (14) et de la ressource alimentaire (24) ; Rich en <i>Vibrionaceae</i> (10,6,27)
	n = 2		Branchie	Spécifique à l'espèce avec une grande variabilité intra-spécifique (14,27,28) ; Dominé par les <i>Gammaproteobacteria</i> (27)
	n = 1		Cutané	
	n = 1		Cavité buccale	
	n = 1		Sang	
Monacanthidae	n = 1	Carnivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15)
Pinguipedidae	n = 1	Carnivore	Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15)
Mullidae	n = 2	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (14,15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (14,15) ; Influence de l'ontogénie (14)
	n = 2		Branchie	
	n = 2		Cutané	
Pomacanthidae	n = 1	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce (14,16) ; Influence de l'ontogénie (14,16) et de l'effet du jeûne (28)
	n = 1		Branchie	
	n = 2		Cutané	
Pomacentridae	n = 14	Omnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce (14) ; Influence de l'ontogénie (14) et impact du taux de sédiment sur la charge de bactéries bénéfiques en faveur de pathogènes (29) Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15 ; 30) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15) ; Influence de l'environnement et de l'ontogénie (30)
	n = 6		Branchie	
	n = 5		Cutané	
Scaridae	n = 8	Herbivore, Corallivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce (1,4,14,8) ; Très différents des communautés planctoniques mais en connectivité avec le sédiment et les algues (8) ; Riche en <i>Symbiodinium</i> et pourrait servir de réservoir pour les coraux (31) ; Riche en <i>Vibrionaceae</i> et en bactérie à activité enzymatique hydrolytique mais pas d'archée (10)
	n = 2		Branchie	Spécifique à l'espèce (14) ; Influence de l'ontogénie (14)

	n = 3		Cutané	Spécifique à l'espèce avec une très grande variabilité intra-spécifique (15) ; Organe spécifique, très différents des communautés planctoniques (15)
Scianidae	n = 1	Omnivore	Cutané	Organe spécifique et espèce spécifique (28)
	n = 1		Cavité buccale	
	n = 1		Branchie	
Scombridae	n = 1	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce et influence de la ressource alimentaire (17)
Scorpaenidae	n = 2	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce (14) ; Influence de l'ontogénie (14)
	n = 2		Branchie	
	n = 2		Cutané	
Serranidae	n = 7	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce et influencé par la ressource alimentaire (14,24) ; Influence de l'ontogénie (14) ; La pollution homogénéise le microbiome (32)
	n = 2		Branchie	
	n = 2		Cutané	
Siganidae	n = 2	Herbivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce (1) avec une grande variabilité intra-spécifique (34) ; Influencé par la ressource alimentaire (1) et capable d'être flexible à de nouvelles ressources pour coloniser de nouvelles niches (33) ; Biogéographie le long du tractus digestif (34)
Sparidae	n = 1	Carnivore	Œufs	Spécifique à l'espèce avec une forte charge en pathogène et bactéries chemohétérotrophiques impliquées dans le cycle de l'azote (26)
Sphyraenidae	n = 1	Carnivore	Tractus digestif	Spécifique à l'espèce (17,28,15) influencé par le régime alimentaire (17) ; Organe spécifique (28) fortement différent des communautés planctoniques (15)
	n = 1		Branchie	
	n = 1		Cutané	
	n = 1		Cavité buccale	

***Références :** (1) Miyake *et al.*, 2015 ; (2) Miyake *et al.*, 2016 ; (3) Ngugi *et al.*, 2017 ; (4) Scott *et al.*, 2020 ; (5) Flint *et al.*, 2005 ; (6) Sutton and Clements, 1988 ; (7) Angert *et al.*, 1993 ; (8) León-Zayas *et al.*, 2020 ; (9) Clements *et al.*, 1989 ; (10) Smriga *et al.*, 2010 ; (11) Ezzat *et al.*, 2020 ; (12) Ezzat *et al.*, 2019 ; (13) Parata *et al.*, 2019 ; (14) Pratte *et al.*, 2018 ; (15) Chiarello *et al.*, 2018 ; (16) Parris *et al.*, 2016 ; (17) Givens *et al.*, 2015 ; (18) Reverter *et al.*, 2017 ; (19) Reverter *et al.*, 2020 ; (20) French *et al.*, 2020 ; (21) Xavier *et al.*, 2019 ; (22) Stevens *et al.*, 2016 ; (23) Rimmer, 1986 ; (24) Gao *et al.*, 2020 ; (25) Clements, 1991 ; (26) Bai and Hou, 2020 ; (27) Tarnecki *et al.*, 2016 ; (28) Akinyemi and Buoro, 2011 ; (29) Parris *et al.*, 2019 ; (30) Hess *et al.*, 2015 ; (31) Xavier *et al.*, 2020 ; (32) Hennersdorf *et al.*, 2016 ; (33) Castro-Sanguino and Sánchez, 2012 ; (34) Jones *et al.*, 2018 ; (35) Nielsen *et al.*, 2017

1. III – Objectifs de la thèse

Nous avons vu précédemment que les microorganismes constituent les plus anciennes et abondantes formes de vie sur la planète, pouvant être associées aux animaux et leur apporter une nouvelle gamme de fonctions essentielles. Bien que les poissons représentent le groupe de vertébrés le plus diversifié et le plus ancien, **notre compréhension de leurs microbiomes intestinaux et des fonctions qu'ils assurent n'est que très partielle** en comparaison de celle des vertébrés terrestres. Cela est d'autant plus vrai concernant les poissons récifaux. De plus, ces études ne se basent de façon générale que sur le bactériome **laissant complètement de côté les autres domaines du vivant**. Pourtant, nous l'avons vu précédemment, les *Archaea* ont aussi un rôle important à jouer avec les processus de méthanogenèse (Gaci *et al.*, 2014; Raymann *et al.*, 2017; Tapio *et al.*, 2017). La capacité du microbiome des poissons à produire du méthane, gaz à effet de serre (GES) 28-34 fois plus important que le CO₂ (Allen, 2016), est aujourd'hui totalement inconnue chez les poissons marins. Pourtant de nombreuses espèces herbivores et/ou détritivores possèdent un tractus digestif hébergeant des processus de fermentation similaires à celui des ruminants terrestres, dont la méthanogenèse qui a déjà été détecté chez deux espèces marines (Oremland, 1979). Sachant que sur les récifs coralliens, les poissons herbivores et détritivores sont très abondants ($> 100 \text{ g/m}^2$), la contribution des poissons aux flux de méthane pourrait ne pas être négligeable.

Aujourd'hui, il apparaît donc nécessaire d'approcher l'inventaire microbien associé aux tractus digestif des poissons coralliens de manière plus holistique, en augmentant l'éventail des branches du vivant étudiées, tant au niveau du microbiome qu'au niveau de leurs hôtes et de leur géographie. Ceci permettrait de faire émerger des patrons structuraux et des interactions microbiennes en relation avec les paramètres de l'hôte (*e.g.* régime alimentaire, phylogénie) et de l'environnement. La compréhension de ces processus est fondamentale, car leur action différentielle peut produire des changements dans la composition du microbiome qui pourraient avoir un impact sur leur hôte mais également sur le fonctionnement de l'écosystème. Nous avons vu précédemment que les communautés microbiennes intestinales pouvaient être considérées comme des métacommunautés, définies comme de multiples communautés locales reliées par la dispersion d'espèces en interaction (Leibold *et al.*, 2004). Parmi les différents scénarios décrits dans le **Chapitre 1.I.B** (*i.e.* dispersion, sélection, dérive écologique et diversification), j'ai principalement étudié les processus de sélection qui peuvent être regroupés en deux groupes de facteurs: internes et externes à l'hôte.

De ce fait, cette thèse vise plus précisément à

- i) *caractériser les facettes phylogénétiques et fonctionnelles des bactéries et archées composant le microbiome intestinal des poissons récifaux.*
- ii) *comprendre les déterminants relatifs à l'hôte sur les assemblages entériques microbiens des poissons récifaux.*
- iii) *comprendre les déterminants relatifs au changement environnemental sur les assemblages entériques microbiens des poissons récifaux (Figure 1.3.1).*

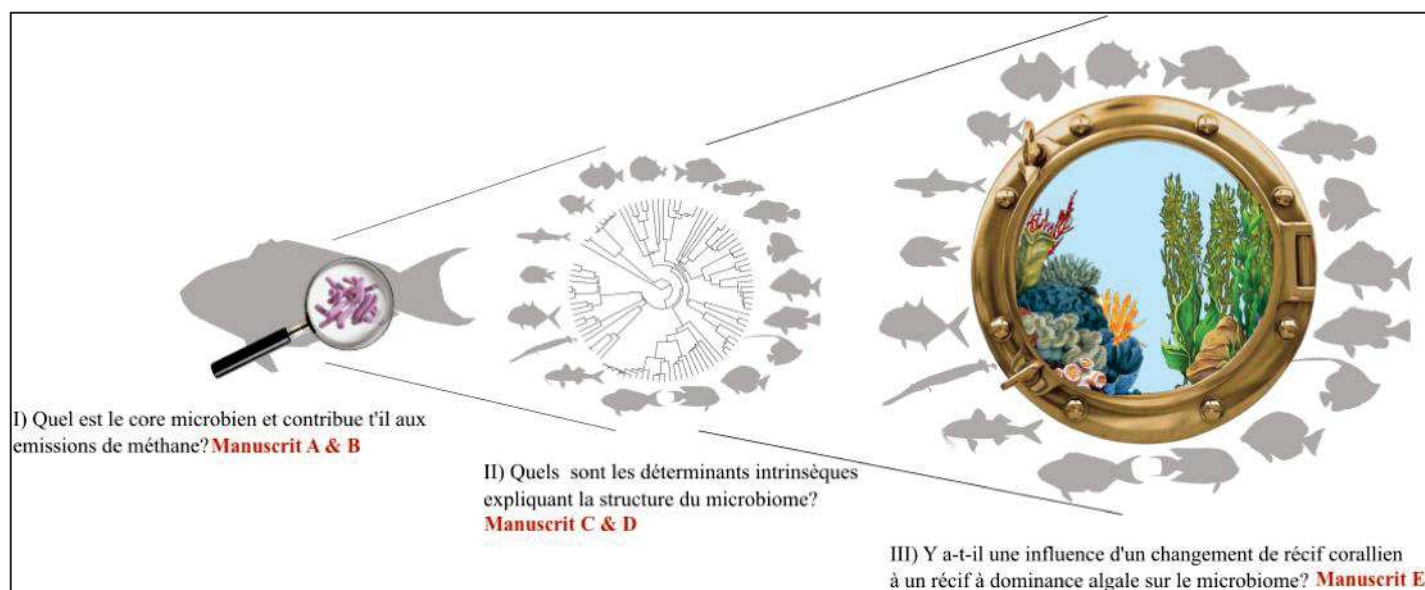


Figure 1.3.1 : Schéma représentant le plan de thèse en trois objectifs. Les manuscrits répondant aux différentes problématiques posées sont écrits en rouge.

Objectif I (chapitres 3)

Alors que les déterminants structuraux et le rôle du microbiome entérique a été largement étudié chez les espèces de téléostéens tempérées, *peu d'espèces coralliennes ont été étudiées*. Ceci est d'autant plus vrai qu'*aucune étude ne se soit vraiment intéressée à la part archéenne associée au tractus intestinal des poissons coralliens, ni à sa contribution potentielle aux émissions de méthane*. De ce fait, j'ai donc inventorié dans un premier temps **i) quel est le core microbien entérique, d'un point de vue bactérien et archéen ?** et dans un second temps, j'ai cherché à savoir **ii) quelle est sa contribution aux émissions de méthane ?**

Pour ce faire, j'ai réalisé l'inventaire microbien en utilisant des méthodes de metabarcoding du gène de l'ARNr 16S, avec des amorces universelles et des amorces spécifiques aux archées, chez une centaine d'espèces de poissons récifales issues de la mer des Caraïbes (Martinique) et de l'Océan Indien (Europa, Juan de Nova et les Seychelles). La contribution des archées

méthanogènes dans les émissions de méthane est mesurée par qPCR sur ces mêmes échantillons et par mesure de gaz *in vivo*. Je discute également du rôle de l'abondance des bactéries sulfato-réductrices, également mesurées par qPCR, dans la compétition avec les archées méthanogènes.

Objectif II (chapitre 4)

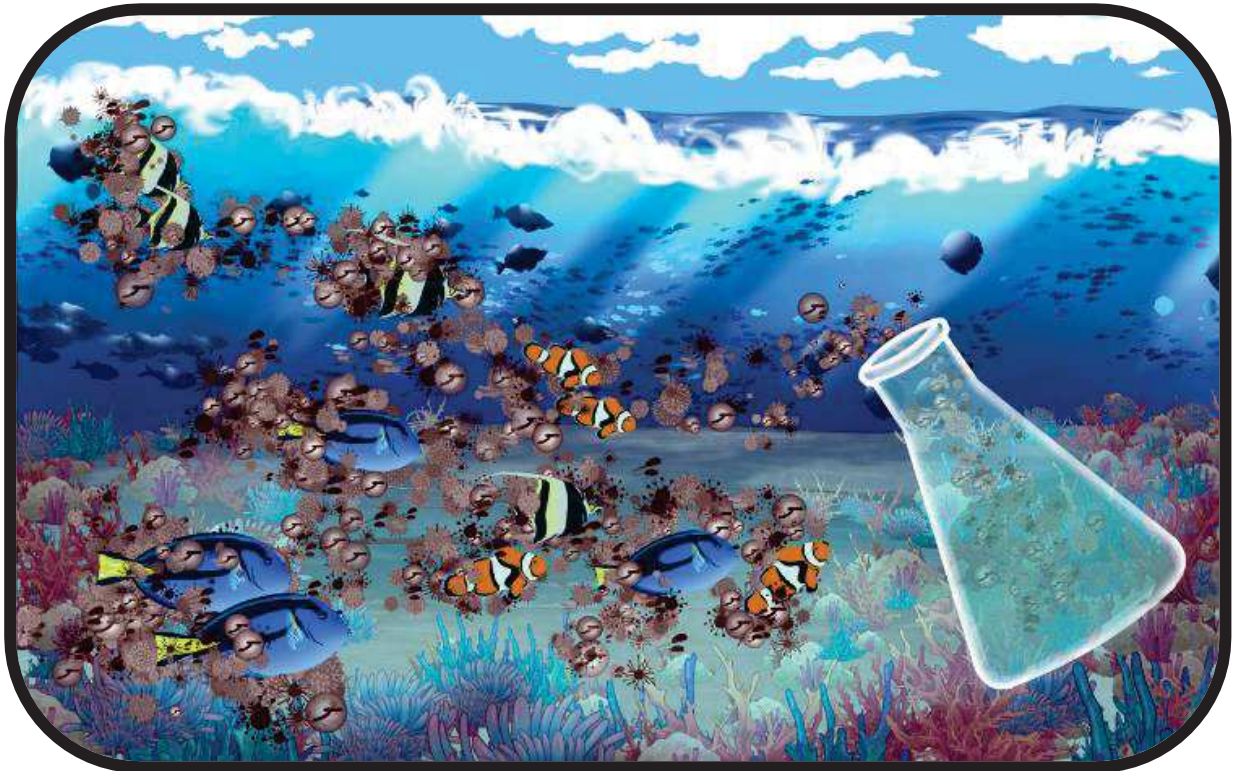
Les études réalisées sur les microbiomes entériques des poissons indiquent que la phylogénie et le régime alimentaire seraient deux des plus importants déterminants de la variabilité des communautés microbiennes (Sullam *et al.*, 2012). L'histoire évolutive de l'hôte apparaît comme un autre facteur affectant la composition du microbiome intestinal chez de nombreux vertébrés *mais cela n'a jamais été réellement étudié chez les poissons*. Son rôle pour l'hôte a également été largement démontré dans les processus de métabolisme et de nutrition. Ceci-dit, *les études ne prennent en compte que peu d'espèces, et essentiellement herbivores ou corallivores*. Pourtant, nous savons aujourd'hui que les poissons coralliens carnivores constituent une part importante de la diversité des récifs et se distinguent par une grande diversité de classes alimentaires. Ils pourraient ainsi donc constituer un *réservoir microbien de diversité taxonomique, mais également fonctionnelle, qui n'a pas encore été décrit à ce jour*.

Dans ce chapitre, j'ai donc analysé les déterminants intrinsèques qui expliquent la structure microbienne en regardant dans un premier temps **i) quel est l'effet de la phylogénie sur les patrons structuraux du microbiome entérique** et ensuite **ii) quel est l'effet du régime alimentaire sur la structure taxonomique et fonctionnelle du microbiome entérique** ? Pour répondre à ces questions, j'ai comparé les microbiomes entériques en fonction des distances phylogénétiques de leurs hôtes et intégré la prédiction de leurs gènes fonctionnels, en fonction de leurs classes alimentaires.

Objectif III (chapitre 5)

Les récifs coralliens sont fortement menacés par le changement climatique. Les eaux de surface se réchauffent de façon drastique et provoquent des phénomènes globaux de blanchissement des coraux pouvant causer des mortalités massives. C'est notamment le cas des récifs de l'archipel des Seychelles qui subissent périodiquement des épisodes de blanchissements depuis 1980 (Faure *et al.*, 1984), favorisant la prolifération des macroalgues (Graham *et al.*, 2015). Ces transitions d'une couverture corallienne à macroalgale sont de plus en plus récurrentes et annoncent être le futur des récifs coralliens (Graham *et al.*, 2015). Les conséquences de ce « shift corail-macroalgue » sont dramatiques pour les communautés récifales et les structures trophiques. Pourtant, *nous ne connaissons pas l'impact des colonisations de macroalgues sur le microbiome entérique des poissons récifaux*. J'ai donc testé si l'augmentation de la **dominance algale avait une influence sur le microbiome entérique ?** Pour répondre à cette dernière question, j'ai mené une analyse comparative sur la structure des microbiomes entériques entre des poissons vivants dans des récifs à couverture corallienne et des récifs envahis de macroalgues.

2. Méthode d'analyse du microbiome entérique des poissons récifaux



2. I – Collecte des échantillons

2. I. A– Campagnes de prélèvements

La collecte des individus ayant servi à l'élaboration de cette thèse ont été prélevés dans la mer Caraïbes et dans l'Océan Indien. Aux Caraïbes, la collecte des échantillons a eu lieu en Martinique, en décembre 2017. Dans l'Océan Indien, plusieurs campagnes ont eu lieu : une a été réalisée par l'Université de Lancaster aux îles Seychelles en janvier 2019 et une deuxième, à laquelle j'ai participé, a été réalisée sur les îles Éparses, à Juan de Nova et Europa, en avril 2019 (**Figure 2.1.1**).

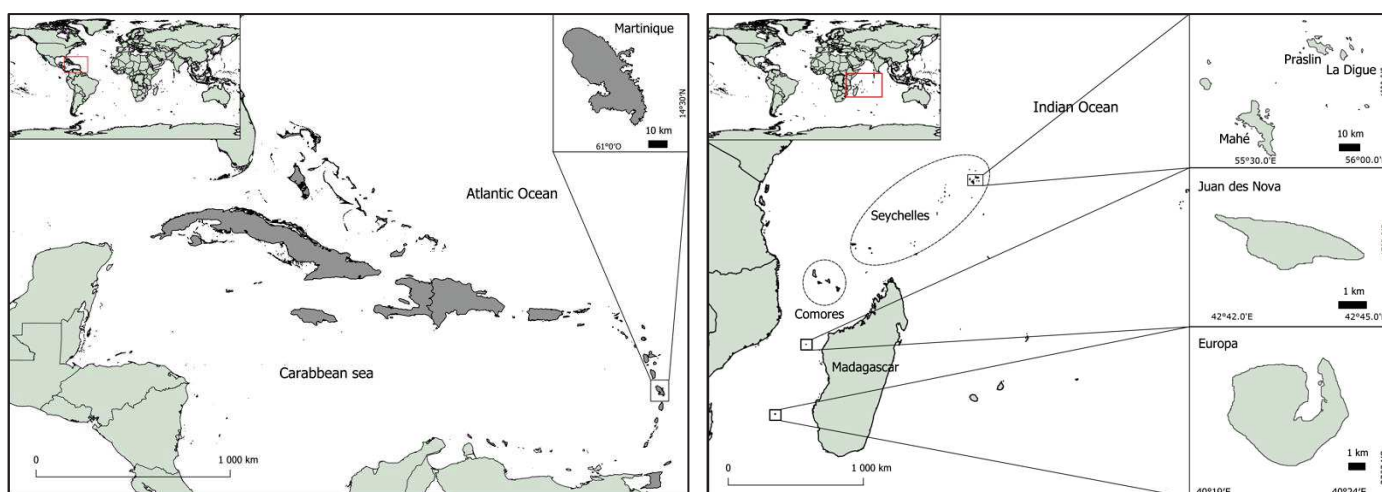


Figure 2.1.1 : Carte d'échantillonnage dans la zone Caraïbienne avec la Martinique (à gauche) et de l'océan Indien (à droite) avec les îles Éparses (Europa et Juan de Nova) et les îles Seychelles.

Les objectifs des campagnes en Martinique et aux îles Éparses se rassemblaient sous un projet commun : le projet *Megafauna*, piloté par David Mouillot de l'UMR Marbec, et en étroite collaboration avec les Explorations de Monaco (<https://www.monacoexplorations.org/>) (**Annexe 8.III**). Les poissons pêchés ont donc servi à un ensemble d'analyse dont celle du microbiome intestinal. Dans cette même stratégie, nous avons reçu des échantillons de tractus digestifs de la part de l'équipe de Nick Graham, de l'Université de Lancaster, qui mènent des investigations sur les valeurs nutritionnelles des poissons récifaux des îles Seychelles. Enfin, pour répondre à un des chapitres de cette thèse visant à mesurer les émissions de méthane produites par les poissons, nous avons réalisé un prélèvement à Palavas-les-Flots pour effectuer une mesure des gaz *in vivo*.

Afin de préserver une homogénéité méthodologique, le même protocole a été effectué lors de chaque mission. Celui-ci peut-être décrit en trois étapes : *la pêche, la collecte de données biométriques et la dissection.*

i) La pêche

Tous les poissons pêchés ont fait l'objet d'une autorisation de prélèvement, que ce soit par le Comité des pêches des Seychelles (numéro FST18132), les gestionnaires des Terres Antarctiques et Australes Françaises (arrêté 2019-45 du 1^{er} avril 2019) et la Martinique (décision n°122). La collecte a été faite stratégiquement, seulement sur des individus adultes avec un effectif d'individu par espèce suffisant mais raisonnée ($10 \leq n \leq 15$). Différents moyens ont été utilisés pour la pêche. Les prélèvements ont été réalisés entre 7 et 10 mètres de profondeurs. L'utilisation des filets maillants, posés en plongée sous-marine, a été l'une des techniques les plus utilisées, notamment pour les missions du projet *Megafauna* (**Figure 2.1.2**).



Figure 2.1.2 : Mise en place d'un filet maillant dans le récif pour le projet *Megafauna*. Placés entre ou autour des amas coralliens, ils nous permettaient de récolter un grand nombre d'espèces et d'individus de petites tailles, qui n'auraient pu être pêchés au harpon. Par ailleurs, cette technique est plus appréciée que la pêche au harpon qui peut perforer le tractus intestinal ou abîmer l'individu et ainsi induire une contamination lors du prélèvement du contenu intestinal, ou biaiser les études morphométriques.

Concernant la mission réalisée aux Seychelles par l'Université de Lancaster, les poissons ont été attirés dans des cages avec différents appâts (*i.e.* du maquereau, de l'huile de thon, des macroalgues ou de la noix de coco) ou pêchés à la ligne. Des échantillons d'eau, de sédiments et d'algues ont également été prélevés respectivement dans des bouteilles de 500 mL, des tubes Falcon ® de 20 mL et dans des sachets plastiques à zip de contenance 1L. Ces échantillons sont collectés en triplicat sur chaque site afin d'avoir la composante microbienne du compartiment environnant. Une fois collectés, les individus sont tués par dislocation cervicale, selon le protocole de la directive Européenne 2010/63/UE. Ces derniers, avec les échantillons environnementaux, sont immédiatement conservés dans des glacières jusqu'à l'étape de dissection ou de filtration au laboratoire.

ii) *La collecte des données biométriques*

Avant chaque dissection, une photo de chaque individu est prise afin de réaliser ultérieurement la taxonomie de l'individu, dans le cas où un doute pourrait persister lors de l'identification au laboratoire. Une balance de précision et un peson digital ont été utilisés pour peser respectivement au dixième de gramme et au gramme près les poids des petits et gros individus. La longueur standard (*i.e.* de l'échancrure de la nageoire caudale à la bouche) a également été mesurée. Les données environnementales sont également renseignées sur chaque site de collecte, notamment les coordonnées GPS, la profondeur et la géomorphologie du récif sont annotés. A posteriori, la phylogénie de chaque espèce est obtenue grâce à l'arbre de Rabosky *et al.*, 2018 et leur régime alimentaire grâce à la base de référence FishBase (Froese and Pauly, 2021). Ce dernier est renseigné au niveau de plusieurs niveaux trophiques en utilisant les groupes fonctionnels de Mouillot *et al.*, 2014 et de Parravicini *et al.*, 2020. Les carnivores sont divisés :

- **Invertivores**, avec la distinction entre les *corallivores*, qui se nourrissent majoritairement de coraux et de méduses; les *invertivores sessiles*, qui se nourrissent d'invertébrés comme les étoiles de mer, les bryozoaires, les cirripèdes, les holothuries, les éponges ou les tuniciers ; les *microinvertivores* se nourrissant d'arachnides, de pycnogonides, de petits crustacés (*e.g.* *Peracarida*) et de vers (*e.g.* annélides, hémichordés, nématodes, némertes et siponcles) ; les *macroinvertivores* se nourrissant d'invertébrés plus gros comme les mollusques (*e.g.* bivalves, gastropodes, polyplacophores et scaphopodes) et, enfin, les *crustacivores* qui se nourrissent de crustacés plus gros (*e.g.* décapodes et stomatopodes).

- **Piscivores**, qui se nourrissent d'autres poissons et de céphalopodes.

Les omnivores et herbivores sont divisés également en :

- **Planctivores**, qui se nourrissent de zooplancton (*e.g.* copépodes, ostracodes, les branchiopodes, les euphausiacés) et de cyanobactéries.
- **Les Herbivores, microvores et détritivores**, qui se nourrissent d'organismes autotrophes, de détritus, de matière inorganique, de foraminifère et de phytoplancton.

iii) Dissection

Chaque cryotube de polypropylène (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, MO, US) de 2 mL, est préalablement annoté avec un numéro unique correspondant à l'individu, sa nature (*i.e.* tractus digestif, eau, sédiment ou macroalgue), et la mission dont il provient. Pour éviter des contaminations entre les échantillons, la table de dissection et tout le matériel (*i.e.* bistouri, ciseaux, gants) sont nettoyés avec de l'éthanol 70° avant dissection de chaque individu. Avec les ciseaux, le poisson est ouvert de l'anus vers l'œsophage, en prenant soin de ne pas abîmer les organes internes. À l'aide de pinces, la cavité abdominale est écartée, afin de sortir et de dérouler le tractus intestinal (**Figure 2.1.3**). Ensuite, nous retirons délicatement, à l'aide d'une micropipette en verre stérile de 1 mL (*i.e.* changée entre chaque individu), le contenu de la partie de l'intestin distale en prenant soin de ne pas abîmer la paroi intestinale. Nous l'avons vu précédemment, les communautés microbiennes sont fortement déterminées par les micro-niches disponibles dans le tractus digestif. Les communautés présentes dans la paroi sont donc différentes de celles présentes dans le lumen, et il en est de même des communautés présentes dans la partie distale de celles de la partie antérieure (Ringø *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2017). Également, la morphologie peut varier drastiquement entre les espèces et notamment entre herbivore et carnivore (Mountfort *et al.*, 2002; Egerton *et al.*, 2018). J'ai donc décidé de me concentrer sur le lumen de la partie distale de l'intestin postérieur (section IV et V selon Mountfort *et al.*, 2002). Cette section joue un rôle important dans les processus de fermentation où les concentrations en acides gras à chaînes courtes (SCFAs pour *short chain fatty acids*, en anglais) tels que l'acétate, le propionate et le butyrate, y sont les plus élevées (Rimmer, 1986; Clements and Choat, 1995) (**Figure 2.1.3**). De ce fait, ces régions sont susceptibles de comporter, d'une part, des communautés microbiennes riches en diversités taxonomique et fonctionnelle, et d'autre part, de constituer un potentiel siège pour les activités méthanogènes.

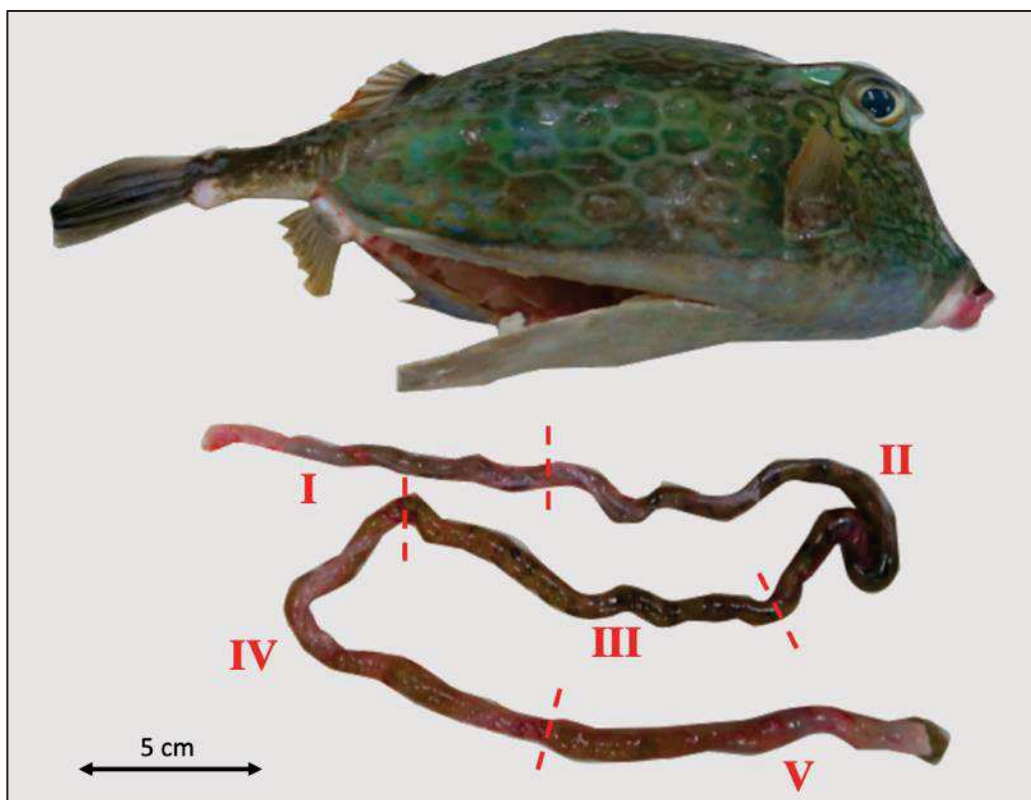


Figure 2.1.3 : Photo illustrant la dissection du tractus intestinal d'un poisson coffre à cornes (*Acanthostracion polygonius*) des Caraïbes. Les sections IV et V correspondantes à l'intestin terminal sont celles utilisées pour l'étude du microbiome durant cette thèse.

Le contenu est par la suite reçu sur un morceau de Parafilm® (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, MO, US) afin d'être recueilli dans le cryotube préalablement étiqueté avec le numéro d'identification de l'individu.

Pour les échantillons environnementaux, le sédiment est directement versé dans le cryotube identifié à l'aide d'une spatule cuillère. Chaque prélèvement d'eau de mer (500 mL) est placé dans une bouteille Nalgene™ (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, US) et filtré au travers d'un filtre Whatman® Nuclepore™ (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, MO, US) de maille 0.20 µm. Chaque filtre est plié soigneusement avec des pinces nettoyées et placé dans un cryotube identifié. La bouteille de filtration est nettoyée à l'éthanol 70° puis rincée à l'eau distillée entre chaque filtration. Les algues prélevées sont rincées à l'eau distillée, de telle sorte à collecter uniquement le microbiome propre à la fronde sans les microorganismes planctoniques. Chaque fronde est ensuite grattée par un écouvillon stérile, initialement à usage nasopharyngeal (CliniSciences®, Nanterre, France), et placé dans un cryotube identifié.

L'ensemble des tubes collectés sont rangés au fur et à mesure dans des cryoboîtes Fisher Scientific™ (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, US) préalablement identifiées pour

chaque type d'échantillon (*i.e.* tractus digestif ou environnement) et pour chaque mission. Celles-ci sont conservées à -80°C, y compris lors du transport vers Montpellier, jusqu'à l'étape d'extraction des acides nucléiques.

2. I. B – Extraction des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques et l'amplification ont été faites à l'aide de Clémence Marconnet, une stagiaire en 3ème année de Licence de Biologie. Pour éviter toute contamination, le plan de travail est nettoyé à l'éthanol 70°. Le matériel consommable est stérilisé à l'autoclave et/ou passés sous la hotte à UV pendant 20mn, notamment l'eau moléculaire, le matériel de pipetage et les supports de plaques.

L'étape d'extraction des acides nucléiques s'est faite à partir de 200 mg de contenu intestinal homogénéisé ou de sédiment, d'un demi-filtre pour l'eau et d'un demi-écouvillon pour les algues. Une communauté de souches pures de microorganismes (ZymoBIOMICS® Microbial Community DNA Standards II, Zymo Research, Irvine, CA, USA) ainsi que l'eau biomoléculaire sont utilisées, en triplicat, respectivement comme témoins positifs et négatifs de l'extraction. Les extractions ont été faites selon le protocole du kit d'extraction d'ADN MagAttract PowerSoil® (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA). Afin d'éviter les biais et contaminations entre les échantillons, l'étape d'extraction a été automatisée avec le système robotisé KingFisher Flex™ (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, US) (**Annexe 8.I.A**). Les acides nucléiques ont été élués avec de l'eau moléculaire (Merck Millipore™, Burlington, MA, USA), et quantifiés par spectrophotomètre au NanoDrop 8000™ (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, US). Afin de les normaliser à la même concentration, j'ai réalisé plusieurs aliquots à 1ng/μL, 10ng/μL et à la concentration initiale. A l'issue de l'étape d'extraction et de normalisation, les acides nucléiques sont congelés au -18°C jusqu'à l'étape d'amplification.

2. II – Mesure de la diversité taxonomique

2. II. A– Le bactériome

A partir des acides nucléiques extraits, j'ai inventorié la diversité taxonomique par méthode de metabarcoding. Pour ce faire, j'ai procédé en plusieurs étapes : l'***amplification par PCR*** ; le ***traitement bioinformatique des séquences*** ; le ***calcul du core microbiome***.

i) *Amplification par PCR*

L'amplification par PCR des régions hypervariables V4-V5 de l'ARNr 16S a été réalisée à l'aide du couple d'amorces 515F-Y (5'- GTGYCAGCMGCCGCGGTAA- 3') et 926R (5'- CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (Parada *et al.*, 2016), avec l'ajout à chaque amorce d'une queue de nucléotide spécifique à la plateforme de séquençage. A l'instar des amorces 515F et 806R ou 806 Rb couramment utilisés dans les études sur les microbiomes (Caporaso *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2015), amplifiant des fragments de ~250 pb²⁶, ce couple permet d'amplifier un fragment ~ 400 pb. De ce fait, il peut différencier des taxa microbiens non identifiables avec des fragments plus courts. Par ailleurs, considéré comme un couple d'amorce « universel », il permet d'amplifier, en plus de l'ARNr 16S des procaryotes (*i.e. Bacteria et Archaea*), l'ARNr 18S des Eucaryotes. Un essai réalisé sur un standard de communautés pures semble révéler que ce couple approche de façon plus réelle la diversité taxonomique des communautés, au contraire des autres couples précédemment cités (Parada *et al.*, 2016). Enfin, ce couple d'amorces a été choisi pour référence dans le *Projet Microbiome Terre* (<https://earthmicrobiome.org/>). Les utiliser permettra ainsi à d'autres études de les comparer à différents hôtes ou compartiments microbiens.

Comme pour l'étape d'extraction, le matériel consommable est stérilisé à l'autoclave et, avec l'eau moléculaire, les pipettes et support de plaques, passés sous la hotte à UV pendant 20mn. Le reste de la manipulation se fait sous hotte aspirante. Avec C. Marconnet, nous avons réalisé l'étape d'amplification sur plaque de 96 puits, à la pipette multicanaux, afin d'éviter les biais d'expérimentations entre échantillon. L'eau moléculaire et des extraits d'ADN de sédiment sont utilisés comme témoins négatif et positif de l'amplification, respectivement. Les

²⁶ Paire de base

négatifs et positifs d'extraction ont également été amplifiés afin de vérifier, d'une part, qu'aucune contamination n'ait eu lieu pour les négatifs, et d'autre part, que l'extraction ait bien fonctionné pour les communautés de souches pures.

Chaque réaction de PCR (25µL) a été préparée avec 12.5µL de mix Taq Polymérase Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (Thermo Scientific Fisher®, Waltham, MA, US), 0.5µL d'amorce sens (10µM), 0.5µL d'amorce anti-sens (10µM), 1µL d'ADN normalisé à 1ng/µL, 0.75µL de DMSO (*i.e.* dimethylsulfoxyde, il permet de faciliter la dénaturation de l'ADN double brin) et 9.75µL d'eau moléculaire. Une fois la préparation des échantillons faite, la plaque est immédiatement déposée dans un thermocycler avec le programme suivant : une étape de dénaturation initiale (30s ; 98°C) suivie de 35 cycles d'amplification avec une dénaturation de 10s à 98°C, une hybridation d'1min à 60°C et une extension de 1.5min à 72°C. A l'issue de ces cycles, une extension finale de 10min est programmée à 72°C. L'amplification et la spécificité des amorces ont été vérifiées par électrophorèse, sur un gel d'agarose 1.5%, pour la confirmation d'un amplicon de taille ~450pb. Tous les échantillons ont été amplifiés en triplicat, puis regroupés pour former un produit final de 50µL. Ces produits finaux sont envoyés à la plateforme GeT-PlaGE de l'INRA du Génom (Toulouse, France) (<https://get.genotoul.fr/>), pour un séquençage en Illumina MiSeq de 2x250pb. A l'issue du séquençage, 378 échantillons de contenu intestinal, 29 échantillons de sédiments, 33 échantillons d'algues et 60 échantillons d'eau ont pu être analysés pour cette thèse.

ii) Traitement bioinformatique des séquences

Les progrès dans le domaine de la bioinformatique ont suivi l'essor des techniques des NGS afin de mettre en place des serveurs et des pipelines informatiques performants capables de stocker et d'analyser d'énormes jeu de données. Parmi ces outils, j'ai décidé de travailler avec le pipeline DADA2 (v1.12.1), un package utilisé sur le logiciel R version 3.6.2 (R Core Team, 2020), qui permet de modéliser et de corriger des erreurs de séquençage (Callahan *et al.*, 2016). DADA2 permet d'inférer des variants de séquences d'amplicons (ASV pour *Amplicon Sequence Variants*) (Callahan *et al.*, 2017). Il permet ainsi la distinction entre les séquences au nucléotide près, à la différence des unités taxonomiques opérationnelles (OTU pour *Operational Taxon Units*) qui vont regrouper des séquences entre elles par rapport à un seuil de similarité, en prenant une séquence de référence pour l'assignement taxonomique. En utilisant les ASVs, j'ai cherché à identifier les séquences biologiques exactes tout en prenant

compte des erreurs de séquençage pour éviter des faux positifs. Comme il n'y a pas d'utilisation de séquence de référence pour un groupe de séquence similaire, cette technique permet également de comparer des ASVs entre plusieurs études sans avoir à relancer le pipeline à chaque fois (Callahan *et al.*, 2017). Ce détail m'a été fortement utile puisque j'ai dû intégrer plusieurs missions et jeux de données au fur et à mesure de la thèse.

Après avoir vérifié la qualité des brins, j'ai retiré les séquences amorces et couper les parties terminales à l'aide de la fonction `filterAndTrim()` pour conserver une bonne qualité de séquence. Un premier nettoyage est réalisé pour conserver les séquences uniques d'origine biologique et supprimer les séquences artefacts issues d'erreur de séquençage. Les brins de lecture sont ensuite fusionnés et un deuxième nettoyage est effectué pour supprimer les ASVs chimères. J'ai effectué l'assignation taxonomique, à partir de la base de données de référence Silva v.138 (Quast *et al.*, 2013), grâce à la fonction `assignTaxonomy()`, qui utilise une méthode de classification Bayésienne naïve du *Ribosomal Database Project* (RDP) (Wang *et al.*, 2007). A l'issue, j'ai organisé les ASVs, leur table d'abondance, leur taxonomie et la table environnementale sous forme d'un objet `phyloseq`, grâce au package `phyloseq` (v1.28.0) (McMurdie and Holmes, 2013). Ce package est un outil puissant pour l'analyse de données du microbiome qui fournit une multitude de fonctions de traitements de données et d'analyses. Pour finir le traitement de séquences, j'ai filtré les genres considérés comme contaminants pouvant provenir des kits d'extraction (Salter *et al.*, 2014) et que nous suggérons susceptibles de biaiser nos données. Tous les codes que j'ai écrits et utilisés pour ma thèse sont disponibles sur <https://github.com/mccheutin/mccheutin>.

iii) Calcul du core microbien

Nous l'avons vu précédemment, les poissons sont baignés dans un environnement très riche en microbes. Chez les animaux marins, les ASVs peuvent transiter sur ou dans l'organisme *via* l'eau de mer, le sédiment ou la nourriture, provoquant alors un signal parasite (Cariveau *et al.*, 2014; Chiarello *et al.*, 2018). J'ai donc examiné la distribution d'abondance des espèces et déterminé quels étaient les ASVs permanents (« core »), dont la distribution n'est pas aléatoire et quels sont les ASVs transitoires (« satellite »), à la distribution aléatoire (Magurran and Henderson, 2003).

Pour ce faire, j'ai calculé dans un premier temps l'indice de dispersion *ID* (Fillol *et al.*, 2016) pour chaque ASV où :

$$ID(ASV) = \frac{Variance(ASV)}{\bar{X}(Abondance(ASV))} * Occurence(ASV)$$

Cet indice est utilisé pour modéliser quels sont les ASVs respectant significativement la distribution de Poisson (*i.e.* distribution stochastique), en étant compris dans l'intervalle de confiance de la distribution de χ^2 entre 2.5% et 97.5% (Krebs, 1999). Un indice inférieur à 1 signifie que l'ASV n'est pas distribué de façon aléatoire comparé à une distribution de Poisson, et qu'il est donc distribué de façon uniforme dans les échantillons. Celui-ci peut donc être considéré comme un « core ASV ». Au contraire, un indice supérieur à 1 indique qu'il est distribué de façon stochastique et est donc considéré comme un « ASV satellite » (Figure 2.2.1).

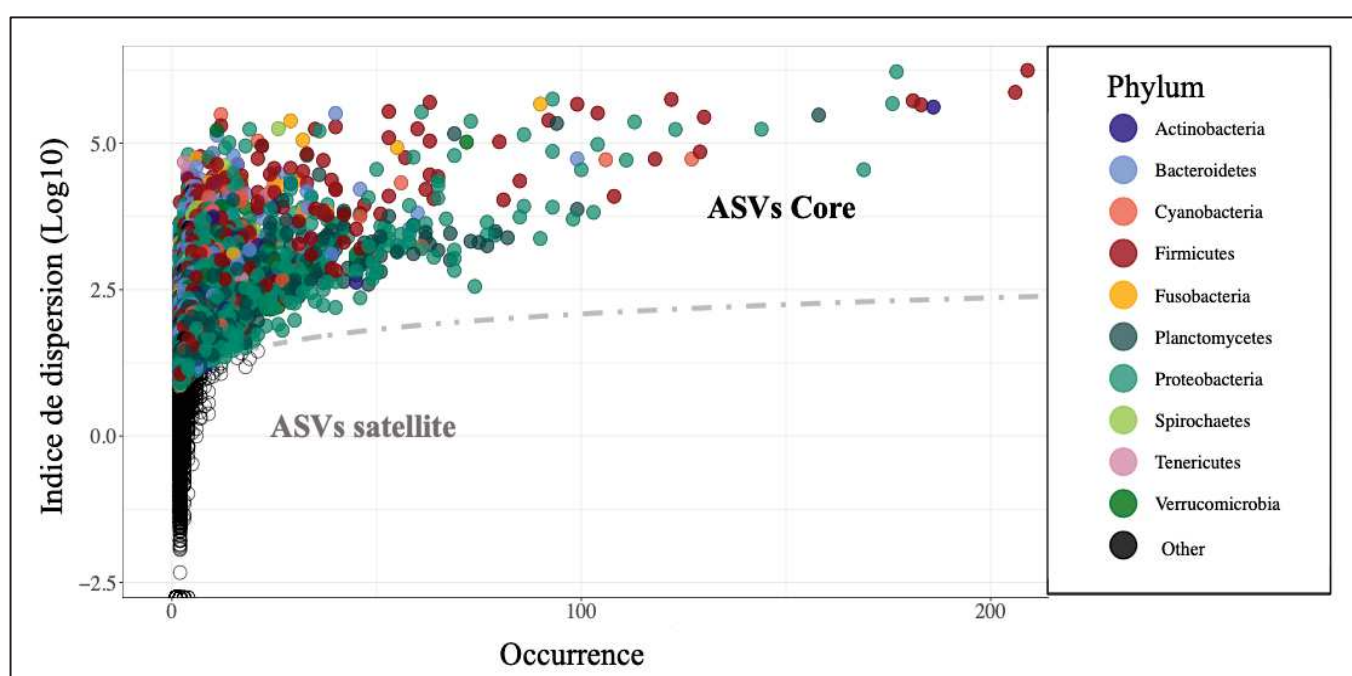


Figure 2.2.1 : Distribution d'abondance d'ASVs. L'occurrence de chaque ASV est représentée en fonction de son indice de dispersion. La ligne en pointillée représente la limite de l'intervalle de confiance de la distribution de χ^2 à 2.5%. Les ASVs présents sous cette ligne représentent les ASVs aléatoirement distribués et sont donc considérés comme ASVs satellites.

J'ai réalisé l'ensemble des chapitres, allant de l'inventaire jusqu'à l'investigation des variables biotiques et abiotiques, à partir de ce core microbiome.

2. II. B – L’archaeome

Comme vu précédemment, j’ai également réalisé du metabarcoding avec l’utilisation de couples d’amorces spécifiques à l’ADNr 16S archéen. Au vu de la difficulté à acquérir des amplifications positives, j’ai dû effectuer de multiples tests avec plusieurs combinaisons d’amorces (**Figure 2.2.2**).

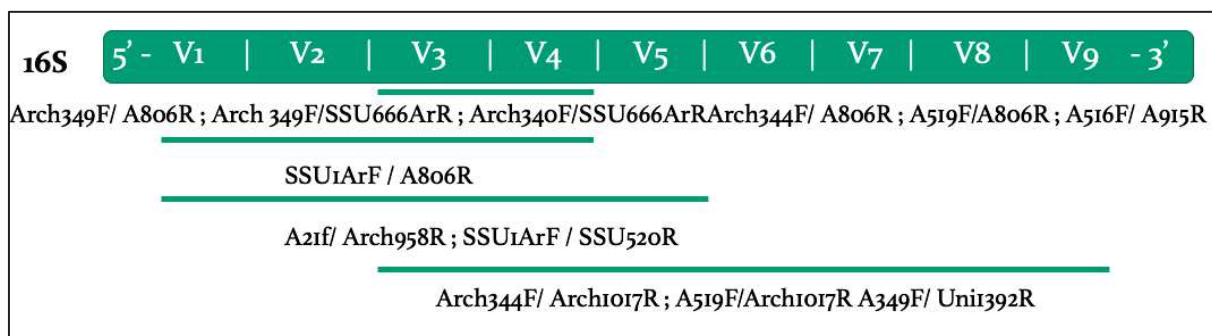


Figure 2.2.2 : Schéma récapitulatif des différents couples d’amorces de l’ARNr 16S testés. Le gène 16S s’étend de la région hypervariable V1 à V9, pour lequel plusieurs couples ont été testés sur différentes région (trait au de dessus des couples). Les couples sont séparés par ; et sont présentés sous la forme amorce sens / amorce anti-sens.

Dans un deuxième temps, j’ai réalisé des PCR quantitatives (qPCR) à l’aide d’une stagiaire de 3ème année de Licence en Biologie, Julie Baland, afin de vérifier l’absence, ou en tout cas la rareté des archées dans mes échantillons. La gamme d’étalonnage s’est faite de 10^2 à 10^9 copies/ μ L de l’ARNr 16S de *Methanocorpusculum aggregans* inséré dans un plasmide cloné chez *Escherichia coli*. Nous avons effectué la préparation des plaques qPCR à l’aide du robot LabCyte Echo® 525 (Beckman Coulter®, Brea, CA, US) de la plateforme qPCR de l’Université de Montpellier, en utilisant le mix qPCR contenant le SYBR safe nécessaire à la détection de l’amplification. Cette dernière s’est faite à partir du couple d’amorces spécifiques aux archées A-934b-F (5’-GATTGGCGGGGGAGCA-3’) (Großkopf *et al.*, 1998) et l’amorce anti-sens A-1000R (5’-GGCCATGCACYWCYTCTC-3’) (Gantner *et al.*, 2011). Le protocole de PCR débutait par une étape de dénaturation initiale (5min ; 95°C) suivie de 45 cycles d’amplification avec une dénaturation de 30s à 95°C, une hybridation de 20s à 60°C et une extension de 30s à 72°C. A l’issue de ces cycles, une extension finale de 5min est programmée à 72°C. Nous avons obtenus les résultats à partir du logiciel LightCycler480® (Roche) que nous avons ensuite traités sur R.

2. III – Mesure de la diversité fonctionnelle

2. III. A – Par amplification (q)PCR

J’ai ciblé deux groupes fonctionnels: les archées méthanogènes et les bactéries sulfato-réductrices (BSR). Dans un premier temps, j’ai utilisé les *données issues du metabarcoding* avec le couple d’amorces universelles 515F-Y/926R (Parada *et al.*, 2016) pour analyser leur distribution au sein des échantillons. Pour ce faire, j’ai ciblé les taxa microbiens concernées et les prédictions des gènes codant pour ces fonctions dans le jeu de données. Dans un deuxième temps, j’ai effectué de multiples essais d’amplification par *PCR et qPCR de gènes fonctionnels* associés aux fonctions de méthanogenèse et de sulfato-réduction.

i) *Données du metabarcoding de l’ARNr 16S*

Cette étape préliminaire m’a permis de distinguer des patrons de distribution des taxa microbiens méthanogènes ou BSR au sein des différentes familles et guildes trophiques. En utilisant la fonction `subset_taxa()` du package `phyloseq`, j’ai pu cibler des échantillons susceptibles d’être de bon candidats pour les tests (q)PCR à venir. A partir des séquences obtenues, j’ai également pu prédire les gènes codant pour les fonctions de méthanogenèse et de sulfato-réduction. Pour ce faire, j’ai utilisé l’algorithme Tax4Fun2 (Wemheuer *et al.*, 2020) sur R, pour la prédiction de gènes fonctionnels à partir de l’ARNr 16S des communautés procaryotes. Ces dernières années, plusieurs outils prédictifs ont été développés à ce but comme PICRUST (Langille *et al.*, 2013), Tax4Fun (Aßhauer *et al.*, 2015), Piphillin (Iwai *et al.*, 2016), Faprotax (Louca *et al.*, 2016) ou paprica (Bowman and Ducklow, 2015). Bien qu’ils ne peuvent remplacer l’assignement fonctionnel comme le ferait la metagénomique, ces derniers ont néanmoins démontré des prédictions fonctionnelles issues de l’ARNr 16S des communautés procaryotes dans divers habitats comme le sol (Polónia *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2018), l’environnement marin (Bowman and Ducklow, 2015; Louca *et al.*, 2016; Galand *et al.*, 2018), le rumen (Wilkinson *et al.*, 2018; Biscarini *et al.*, 2018) ou l’endosphère des plantes (Wemheuer *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Pour cette thèse, j’ai choisi Tax4Fun2 car il présente plus d’exactitude, est facile d’utilisation sur R (*i.e.* ne dépend pas d’une plateforme bioinformatique), et utilise relativement peu de mémoire de stockage (Wemheuer *et al.*, 2020). Ces outils utilisent l’information fonctionnelle obtenue à partir des génomes disponibles dans

les bases de références publiques (*i.e.* RefSeq de NCBI). Cependant, les génomes disponibles ne sont pas nécessairement représentatifs de la diversité fonctionnelle présente dans l'écosystème d'étude (Louca *et al.*, 2016; Wilkinson *et al.*, 2018). Pour contrer ce biais, Tax4Fun2 incorpore la spécificité de l'habitat et les données du cas d'étude. Deux jeux de données de références utilisés pendant l'assemblage des séquences ARNr 16S sont inclus dans le package. Ayant un jeu de données important, j'ai préconisé l'utilisation de la Ref99NR (*i.e.* seuil de similarité de 99%) qui est plus rapide à générer (~ 3 jours pour l'ensemble du jeu de données). Dans un premier temps, les ASVs sont comparés à la base de référence Ref99NR par un BLAST en utilisant la fonction runRefBlast(). Ensuite, les prédictions fonctionnelles sont calculées en utilisant la fonction makeFunctionalPrediction(). Pendant cette étape, la matrice d'abondance d'ASVs par échantillons et les BLASTs précédemment obtenus sont utilisés pour créer une matrice de profils fonctionnels associés à chaque échantillon. Afin que tous les ASVs soient pris en compte dans l'analyse, j'ai choisi le seuil de similarité comme étant l'identité minimale issue du BLAST. J'ai ensuite assigné les profils obtenus en KeggOrthologs (KOs) selon la base de données des « KEGG pathways ». Certains KOs étaient assignés à plusieurs voies enzymatiques (E.C.), étaient hypothétiques ou même inconnus. Ces KOs ne sont donc pas considérés comme indicateurs de fonctions particulières et peuvent générer une source de redondance fonctionnelle. Pour éviter ce biais, j'ai donc retiré ces KOs de l'analyse. A partir de cette nouvelle table de KOs, j'ai pu cibler les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les processus de méthanogenèse et de sulfato-réduction. J'ai utilisé ce même outil et cette même stratégie d'analyse prédictive de gènes codants pour les fonctions associées aux processus digestifs dans le Chapitre IV et aux poissons herbivores dans le Chapitre V.

ii) PCR et qPCR de gènes fonctionnels

Dans le but de vérifier la présence de BSR et d'archées méthanogènes, j'ai utilisé des couples d'amorces spécifiques pour ces deux gènes impliqués dans les voies métaboliques de la sulfato-réduction et de la méthanogenèse. Avec l'aide de Emilie Roso, une stagiaire en 1^{ère} année d'IUT, nous avons effectué plusieurs essais d'amplification à l'aide de combinaisons d'amorces et de paramètres PCR différents. Pour permettre une meilleure détection, nous avons effectué également ces tests en qPCR en utilisant comme gamme étalon des plasmides du gène

de la *dsrB*²⁷ ainsi que des plasmides du gène de la *mcrA*²⁸, respectivement. Pour l'amplification du gène de la *dsrB* et de la *mcrA*, nous avons utilisé les couples d'amorces dsrbp2060F (5'-CAACATCGTYCAYACCCAGG - 3') ; dsr4R(5'- GTGTAGCAGTTACCGCA-3') (Geets *et al.*, 2006) et mlas (5'- CGTTCATBGCGTAGTTVGGRTAGT -3') ; mcrAR (5'-GGTGGTGTM GGDttCACMCARTA -3') (Steinberg and Regan, 2008), respectivement. Le protocole PCR était le même : une étape de dénaturation initiale (5min ; 95°C) suivie de 45 cycles d'amplification avec une dénaturation de 30s à 95°C, une hybridation de 40s à 60°C et une extension de 1min à 72°C. A l'issue de ces cycles, une extension finale de 10min est programmée à 72°C. Emilie a réalisé un premier comptage des amplifications positives par PCR pour chaque manipulation, et nous avons ensuite traité les résultats issus de la qPCR comme dans la partie précédente.

²⁷ Sous-unité B de la Dissimilatory sulfite reductase

²⁸ Sous-unité A de la Methyl Coenzyme M Reductase

2. III. B – Par chromatographie sur phase gazeuse

i) Extraction des gaz

Pour répondre à la problématique sur la contribution des poissons aux émissions de méthane, j'ai ciblé des espèces aux forts taux de fermentation liés à un régime alimentaire herbivore : la saupe (*Sarpa salpa*) dont les juvéniles se nourrissent de macrophytes et la sardine (*Sardina pilchardus*) dont les juvéniles se nourrissent principalement de phytoplancton. A l'aide de mes collègues et de Martin Dessard, un stagiaire de Master en 1ère année d'écologie, nous avons pêché 57 poissons à l'aide d'une senne de plage en Méditerranée, à Palavas-les-Flots.

Le stress provoqué lors de la capture pouvant biaiser la production de gaz, nous avons immédiatement incubé les poissons dans un bac noir rempli d'eau de mer pendant 25 mn. Ensuite, nous avons distribué les individus dans 3 poches hermétiques de 8L, remplies préalablement avec 3L d'eau de mer filtrée, pendant 1h. Deux poches contenant seulement de l'eau de mer filtrée ont servi de témoins négatifs. A l'issue du temps d'incubation, nous avons effectué, en duplicat, des prélèvements de la partie aqueuse et de la partie gazeuse, à l'aide de seringues dans des tubes d'analyses secs (*i.e.* sans additif) Vacutainer™ (Becton Dickinson and Co, Franklin Lakes, NJ) de 9mL. Du NaCl 43% (connu pour stopper toute réaction biologique) et une surpression sont ajoutés dans trois tubes sur 15 pour les échantillons d'eau et d'air, respectivement (**Annexe 8.I.B**).

ii) Chromatographie sur phase gazeuse

Par la suite, nous avons procédé à une détection via chromatographie sur phase gazeuse (CPG). Cette technique, très répandue depuis plus d'un demi-siècle, est le moyen le plus efficace pour doser des molécules d'intérêts dans les domaines de la toxicologie, de l'environnement ou de la chimie (*e.g.* pesticides, méthane, huiles essentielles). Le chromatographe est constitué de trois chambres : l'injecteur, la colonne couplée à son détecteur et un four thermostaté, permettant de porter la colonne à une température élevée pour permettre la volatilité des constituants. La phase mobile, qui entraîne l'échantillon dans la colonne, est un gaz neutre, dit gaz vecteur. Il s'agit généralement d'hélium (He) ou de dihydrogène (H₂). La substance injectée (gaz ou liquide) est portée à l'état de vapeur pour traverser la colonne

(i.e. tube enroulé sur lui-même allant de 1 à 100m de longueur) et passer devant un détecteur avant de sortir à l'air libre (**Figure 2.3.1**).

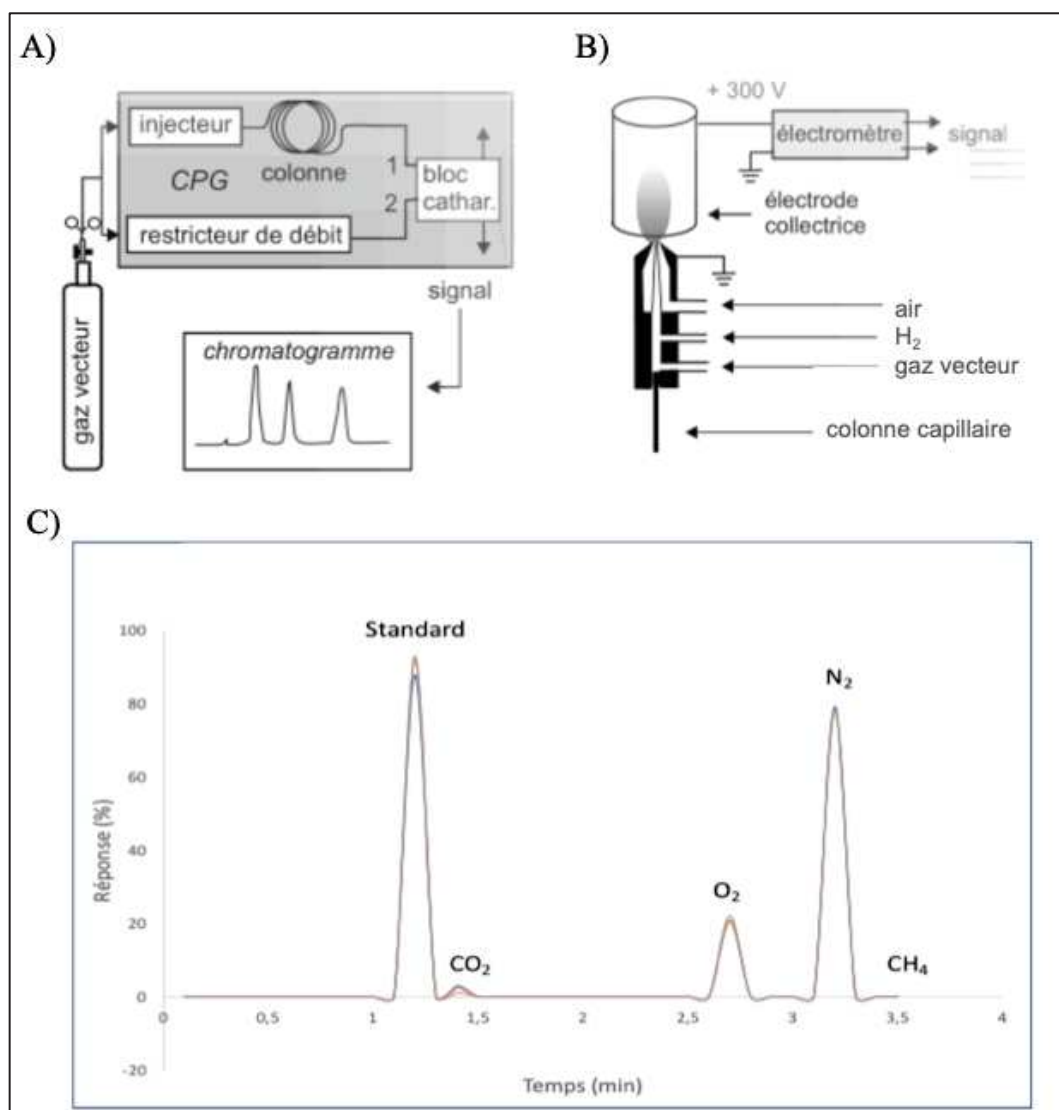


Figure 2.3.1 : Schéma illustratif du fonctionnement d'un CPG. La substance est introduite par l'injecteur et va passer au travers d'une colonne capillaire pour la rendre volatile. Cette colonne se termine sur un détecteur de conductibilité thermique (TCD) sous la forme d'un bloc catharomètre (**A**) ou bien par un détecteur à ionisation de flamme (FID) où le courant gazeux issu de la colonne va pénétrer dans la flamme d'un brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées qui vont alors former un courant ionique dans l'électrode collectrice (**B**). Le courant produit émet un signal générant un chromatogramme dont l'aire présente sous le pic est proportionnelle à la masse de soluté présent dans le mélange injecté (ici l'air). Chaque soluté est caractérisé par un temps de rétention (**C**).

Nous avons réalisé une première détection au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, au site de Quatourze, à Narbonne, sur un CPG Zeiss Clarus™ 500 fonctionnant sur colonne capillaire (Zeiss™, Oberkochen, Allemagne) et couplé à un détecteur de conductibilité thermique (CPG-TCD). La détection est faite *via* des catharomètres et est basée sur la conductibilité thermique des gaz. Bien que la réponse soit proportionnelle à la concentration en substance insérée, ces détecteurs sont peu sensibles (*i.e.* l'ordre de grandeur pour une quantité minimale est de 1 à 10ng) (**Figure 2.3.1A**). N'étant donc pas adapté à mes échantillons, j'ai dû me rediriger vers une détection plus fine. Pour cela, j'ai fait appel au Laboratoire de Cycles Géochimiques et ressources de l'Ifremer de Brest doté d'un CPG couplé à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID), avec une sensibilité plus efficace pour les traces de méthane (*i.e.* ordre de grandeur de 20 à 100 pg). Les substances introduites sont brûlées dans une flamme air-hydrogène. Une électrode collecte ensuite les ions formés qui va générer un courant d'ionisation. Une fois l'amplification de courant faite, un signal proportionnel au débit-masse du soluté est analysé (**Figure 2.3.1B-C**). Le méthane CH₄ est celui ayant le temps de rétention le plus long (~ 3.5 min), en comparaison du standard utilisé, du CO₂, de l'O₂ et du N₂, qui sont détectés avant (**Figure 2.3.1C**).

3. Inventaire du core microbien

3. I – Inventaire du bacteriome : Manuscrit A

L'avancé des NGS aura permis l'essor des études sur le microbiome entérique associé aux espèces sauvages et aura permis sa reconnaissance comme un organe à part entière (Stappenbeck *et al.*, 2002; Backhed *et al.*, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2006). Chez les poissons, groupe le plus diversifié et ancien des vertébrés sur Terre, nous connaissons son rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie, le développement ou la formation du système immunitaire entre autres (Bates *et al.*, 2006; Rawls *et al.*, 2006; Nayak, 2010; Verstraete, 2015). Son rôle est tel que la plupart des études ont contribué à la modulation de celui-ci chez les espèces aquacoles à des fins de rentabilité économique, en augmentant notamment la production et le bien-être des élevages (Llewellyn *et al.*, 2014).

A notre connaissance, seules deux études ont pris en compte une grande diversité d'espèces dans la description du microbiome cutané (Chiarello *et al.*, 2018) et associé aux branchies des poissons coralliens (Pratte *et al.*, 2018). Ces études s'accordent pour démontrer qu'il existe une spécificité du microbiome pour les poissons avec une grande variabilité microbienne entre les individus, suggérant que les poissons peuvent être un réservoir important de communautés microbiennes spécifiques dans les systèmes récifaux (**Figure 3.1.1**).

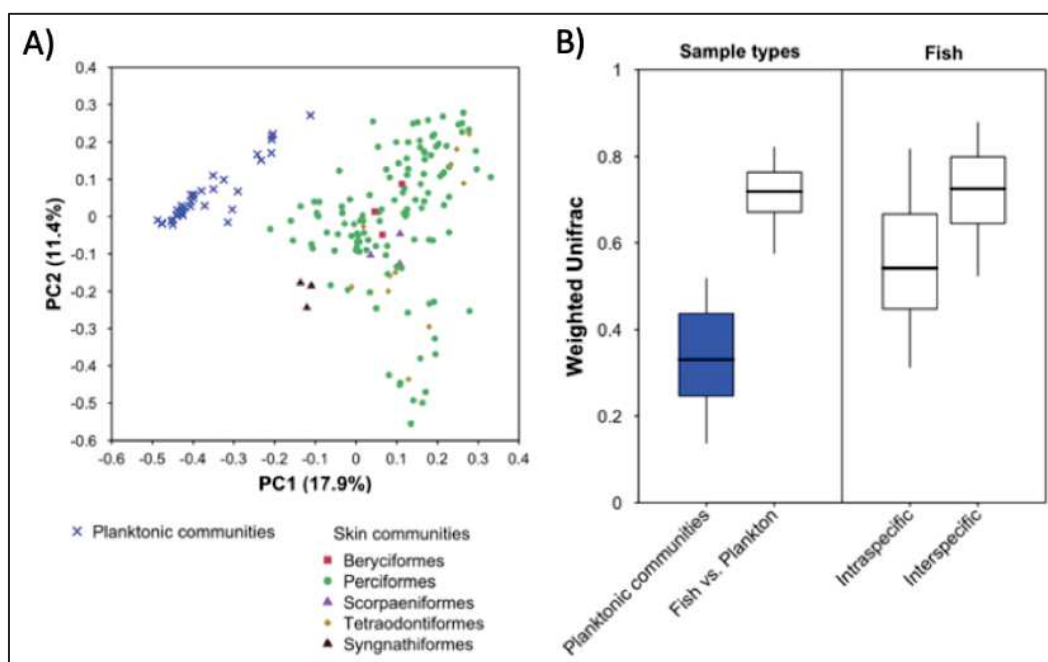


Figure 3.1.1 : Dissimilarité entre les communautés planctoniques et les communautés microbiennes cutanées associées aux poissons récifaux de Mayotte. (A) Visualisation par

PCoA des microbiomes cutanés et planctoniques basée sur la distance pondérée Unifrac (« Weighted Unifrac »). Chaque point représente une communauté (*i.e.* échantillon d'eau de mer ou un poisson). Ces communautés sont significativement différentes (PERMANOVA : $R^2 = 0.14$; $p = 0.001$). La forme et la couleur des points indiquent le type de communauté et l'ordre taxonomique du poisson. L'effet espèce est l'un des plus important dans la composition des microbiomes (PERMANOVA : $R^2 = 0.44$; $p = 0.001$). **(B)** Les valeurs de dispersion avec l'indice pondéré Unifrac sont toutes significativement différentes entre les communautés planctoniques ($n = 35$ échantillons), les communautés cutanées et planctoniques ($n = 173$), entre les individus d'une même espèce ($n = 34$ espèces avec plus d'un individu) et les individus de différentes espèces ($n = 44$ espèces). Figure et résultats tirés de Chiarello *et al.*, (2018).

Concernant les études portant sur les microbiomes entériques des poissons récifaux, elles restent peu nombreuses en comparaison de leur diversité avec $> 6\,000$ espèces de poissons coralliens décrites (Kulbicki *et al.*, 2013). La grande majorité des études porte sur des espèces corallivores et herbivores appartenant aux familles des *Acanthuridae*, *Scarinae*, *Chaetodontidae* et *Pomacentridae*. Pourtant, les espèces carnivores constitue une force majeure dans la structuration des récifs, en contrôlant la distribution et l'abondance de nombreuses espèces récifales (Ceccarelli *et al.*, 2001). Par ailleurs, ces derniers sont plus à même de migrer sur de nombreux kilomètres, permettant ainsi la dispersion d'espèces microbiennes. Ces espèces peuvent avoir un rôle majeur pour leur hôte mais également pour l'écosystème (Troussellier *et al.*, 2017). Les poissons, en tant qu'hôte en mouvement, peuvent avoir un rôle essentiel pour la dispersion des microorganismes bénéfiques, mais également néfastes dans le système corallien (Ezzat *et al.*, 2019; Grupstra *et al.*, 2021). La place des poissons coralliens dans les systèmes récifaux est donc tout aussi importante d'un point de vue de l'hôte, mais également d'un point de vue microbien. Il est donc nécessaire aujourd'hui de considérer cette unité comme un holobionte et de comprendre le rôle de cette interaction dans le fonctionnement des écosystèmes coralliens.

L'utilisation d'amorces universelles sous-estime les domaines archéen et eucaryote dont la présence est bien moins abondante ($\sim 2\%$) (Sullam *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2014; Merrifield and Rodiles, 2015). Bien que certaines séquences archéennes et eucaryotes aient pu être recensées avec les amorces universelles, nous parlerons plutôt de « bactériome » que de « microbiome » dans cette thèse.

3. II – Inventaire de l'archaeome : Manuscrit B

Afin de pouvoir inventorier la diversité procaryote dans son intégralité, nous avons également procédé au metabarcoding du gène de l'ARNr 16S des archées à l'aide d'amorces spécifiques. La plupart des études décrivent le microbiome avec des amorces universelles, sous-estimant la part des Archées, au rôle tout autant bénéfique pour son hôte (Borrel *et al.*, 2020). Son influence s'étend même au-delà de l'hôte, et peut avoir des conséquences sur l'environnement, avec la production de méthane émise dans l'atmosphère. Le potentiel de réchauffement du méthane est 28-34 fois supérieur à celui du CO₂, ce qui le place alors comme un des gaz à effet de serre les plus contributeurs des changements globaux (Allen, 2016). Au vu de la demande croissante de l'industrie aquacole et de la tropicalisation des mers favorisant les espèces exotiques herbivores comme les Siganidae, il est aujourd'hui essentiel d'envisager et de mesurer la contribution des poissons marins aux émissions de méthane.

Objectifs du chapitre et principaux résultats

Les objectifs de ce chapitre visent à **caractériser les facettes phylogénétiques et fonctionnelles des bactéries et archées composant le microbiome intestinal des poissons récifaux.**

De ce fait, je me suis questionnée dans un premier temps :

i) Quel est le core microbien entérique d'un point de vue bactérien et archéen ?

Et dans un second temps, j'ai cherché à savoir :

ii) Quelle est sa contribution aux émissions de méthane ?

Pour ce faire, j'ai utilisé le couple d'amorces universelles 515F-Y et 915R (Parada *et al.*, 2016), connu pour acquérir les trois domaines du vivant, à savoir Bactéries, Archées et Eucaryotes. Ceci-dit, les bactéries étant majoritaires dans le microbiome entérique des poissons (Sullam *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2014), les amorces universelles ne permettent pas de décrire la diversité microbienne procaryote de façon holistique. Pour contrer ce biais, j'ai utilisé des amorces spécifiques aux archées et ai estimé leur abondance par PCR quantitative.

Afin de mesurer leur contribution aux émissions de méthane, j'ai utilisé des marqueurs génétiques des fonctions associées à la méthanogenèse, le gène de la *mcrA*. Dans un deuxième

temps, j'ai cherché à mesurer directement les émissions de méthane produites par des poissons herbivores méditerranéens, en réalisant une expérience *in vivo*.

Les résultats principaux de ce chapitre reposent sur la présence quasi-exclusive de bactéries, spécifiques des niches entériques et majoritairement conservées dans les systèmes récifaux. Les poissons récifaux renferment une grande quantité de taxa rares et uniques. Parmi ces taxa, certains sont également retrouvés dans l'environnement, suggérant une certaine connectivité entre ces compartiments, où les poissons pourraient servir de pont de transmission pour certains microorganismes.

Les amplifications négatives obtenues par PCR et qPCR en utilisant des amorces spécifiques ciblant les archées démontrent l'absence quasi-totale de ce domaine (nous retrouvons tout de même 0.05% de séquences archéennes avec les amorces universelles) dans le tractus digestif des poissons coralliens. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études qui n'ont pu réussir à amplifier avec succès ce domaine chez les poissons marins (Fidopiastis *et al.*, 2006; Smriga *et al.*, 2010; Kormas *et al.*, 2014). Une explication de cette absence pourrait résider sur la compétition des archées méthanogènes pour le dihydrogène avec les bactéries sulfato-réductrices qui représentent 3.12% de l'abondance totale du microbiome. La richesse des sulfates dans le domaine marin pourrait donc favoriser la voie métabolique de la sulfato-réduction à l'instar de la méthanogenèse, réconfortant alors la représentation des poissons marins comme une source de protéine non émettrice de méthane.

Manuscrit A

Finding Dory & Co. : insights into the enteric core microbiome of coral reef fish

Authors : Marie-Charlotte Cheutin¹, Sébastien Villéger¹, Christina C. Hicks², James P. W. Robinson², Nicholas A. J. Graham², Clémence Marconnet¹, Claudia Ximena Ortiz Restrepo¹, Jean-Baptiste Juhel¹, Eva Maire², Elliott Sucré³, Virginie Marques¹, Cassandra Benkwitt², Rachel L. Gunn², Eilish Richards⁴, Camille Albouy⁵, Marc Trousselier¹, Giulia Donati⁴, Loic Pelissier⁴, Thierry Bouvier¹, Jean-Christophe Auguet¹

¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

³ Centre Universitaire de Mayotte, Route Nationale 3, BP53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

⁴ ETH, Universität Zürich, 8092 Zürich, Switzerland

⁵ IFREMER, Unité Ecologie et Modèles pour l'Halieutique, EMH, Nantes Cedex 3, France

Keywords: Microbiome, gut, coral reef fish, metabarcoding, BLASTn.

En préparation

Des informations supplémentaires complètent ce manuscrit en Annexe 8.III.A

Les fichiers supplémentaires sont disponibles sur ce [lien](#)

Abstract

Coral reef fish are the older and most diverse group of vertebrates. The knowledge concerning their gut associated microbes is documented for few herbivorous families but is still scarce concerning a broad range of species. Our study aims to describe the core gut microbiome associated to 101 reef fish species belonging to 25 families from Caribbean Sea and Western Indian ocean. We found that the core gut microbiome differs significantly from the surrounding environment (PERMANOVA: $R^2 = 0.10$; $p = 0.001$) with a lower taxonomic observed richness (KW = 117 ; $p = 0.001$) and Shannon entropy (KW = 98 ; $p = 0.001$). The BLASTn analysis revealed that the core sequences from the gut of reef fish is very specific to gut systems with 50% of ASVs retrieved to animal microbiomes with a predominance of fermenters clades such as *Clostridiales* and *Bacteroidales*. An important part of the gut core is thus generalist for animals but 34% are very specific to marine biome with sequences belonging to *Vibrionales* and *Desulfovibrionales* closely related to marine animals of which 15% associated to reef fish.

Introduction

Fish harbor a high diversity of microbes (*i.e.* Bacteria, Archaea, Eukarya and Virus) inside and on their surface, commonly named the microbiome. The microbiome is incontestably considered to be a major component of the host system similar to an organ, establishing a holobiont unit (Theis *et al.*, 2016; Carthey *et al.*, 2019). The role of the gut microbiome has been largely demonstrated through a broad range of animals by their involvement in vital functions such as host nutrition metabolism (Clements *et al.*, 2009; Flint *et al.*, 2012; Miyake *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018), development (Martin *et al.*, 2010; Sampson and Mazmanian, 2015; Burns *et al.*, 2016), reproduction (Williams *et al.*, 2019; Antwis *et al.*, 2019), pathogen defense (Cho and Blaser, 2012) or regulator of behavior (Sampson and Mazmanian, 2015; Reber *et al.*, 2016). This is particularly true concerning fish where the rise of the aquaculture enhanced the studies concerning the comprehension for the microbiome of economic species such as sea bass, salmon or trout (Nayak, 2010; Sullam *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2014). Thanks to the development of next generation sequencing techniques, investigations on the microbiome of fish have extended their model to coral reef fish but only one notable study has really taken into account a large range of species (Chiarello *et al.*, 2018). Indeed, the majority of studies have focused on the most abundant herbivorous or omnivorous fish families as *Siganidae*, *Acanthuridae*, *Scarinae* and *Pomacentridae*. Yet, coral reef fishes play a considerable role for ecosystem functioning with more than 6 000 species described (Bellwood *et al.*, 2004) distributed in all tropical seas (Cowman and Bellwood, 2013), carrying a high diversity of biological traits (*e.g.* diet, behaviour, morphology) (Mouillot *et al.*, 2014). In that way, they may be considered as a hotspot for microbial diversity (Chiarello *et al.*, 2020).

40 Hence, we aim to establish the inventory of the gut microbiome with metabarcoding of
41 the 16S rRNA gene on 101 coral reef fish species belonging to 25 families sampled in the
42 Caribbean Sea and in the Western Indian Ocean.
43

Material and methods

1) Sampling collection

Sampling collection was performed between 2017 and 2019, in three regions located in the Western Indian Ocean (WIO) with Europa (- 22° 20' S , 40° 22' E), Juan de Nova (- 17° 03' S, 42° 43' E) and the archipelago of Seychelles (- 4°41' S , 55° 26' E) ; and one located in Caribbean Sea, the Martinique island (14° 38' N , - 61° 01' W). Adult fishes were collected using hand lines, traps, underwater nets and were fished by harpoon. Immediately after capture, fishes were killed by cervical dislocation (following the European directive 2010/63/UE). They were then conserved on ice in coolers for dissection in the laboratory later on the same day. At the laboratory, fishes were placed in trails washed with 70% ethanol and the whole intestinal tract of each fish was extracted using sterile dissection tools following the protocol of Clements et al., (2007) and Miyake et al., (2015). Environmental samples (*i.e.* sediment and seawater) were also collected in each station. Sediment was directly sampled and conserved and the seawater samples consisted in the filtration of 500 mL through a 0.2 µm Whatman® Nuclepore™ filter (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, MO, US) placed in a Nalgene™ (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, US) bottle. All samples were immediately stored at -80°C until DNA extractions. Fish diet was assessed thanks to the Fishbase references (Froese and Pauly, 2021) according to the diet categories in Mouillot et al., (2014). The phylogeny of fish was inferred following the fish tree of life (<https://fishtreeoflife.org/>) (Rabosky *et al.*, 2018).

2) DNA extraction and 16S rDNA gene amplification

Total genomic DNA from 200 mg of homogenized intestinal contents was extracted using the MagAttract PowerSoil® DNA kit according to the manufacturer instructions (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) with automated processing and liquid handling system (Thermo Scientific KingFisher Flex™). Nucleic acids were eluted in molecular water (Merck Millipore™) and quantified on a Thermo Scientific NanoDrop 8000™ spectrophotometer. The V4-V5 region of the 16S rDNA gene was targeted with the universal primers 515F-Y(5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (Parada et al., 2016) coupled with platform specific Illumina adaptor sequences on the 5' ends. Each 25µL PCR reaction was prepared with 12.5µL Taq Polymerase (Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer), 0.5µL forward primer (10µM), 0.5µL reverse primer (10µM), 1µL template DNA, 0.75µL DMSO, and 9.75µL molecular water. PCR amplifications involved the following protocol: an initial 98°C denaturing step for 30 sec following by 35 cycles amplification (10 sec denaturation at 98°C; 1 min at 60°C annealing; 1.5 min extension at 72°C), and a final extension of 10 min at 72°C. Amplification and primer specificity were verified by electrophoresis on a 2.0% agarose gel for confirmation of ~450 bp amplicon size. All samples were amplified in triplicate and equally pooled for a final product of 50 µL. Each amplicon pool was sequenced using the 2x250bp Miseq chemistry on an Illumina MiSeq sequencing platform at the INRA GeT-PlaGE platform (Toulouse, France). A total of 378 fishes belonging to 101 species covering 25 families, 33 samples of sediment, and 60 filters of seawater were successfully sequenced (**Figure 1 ; Supplemental Table 1**).

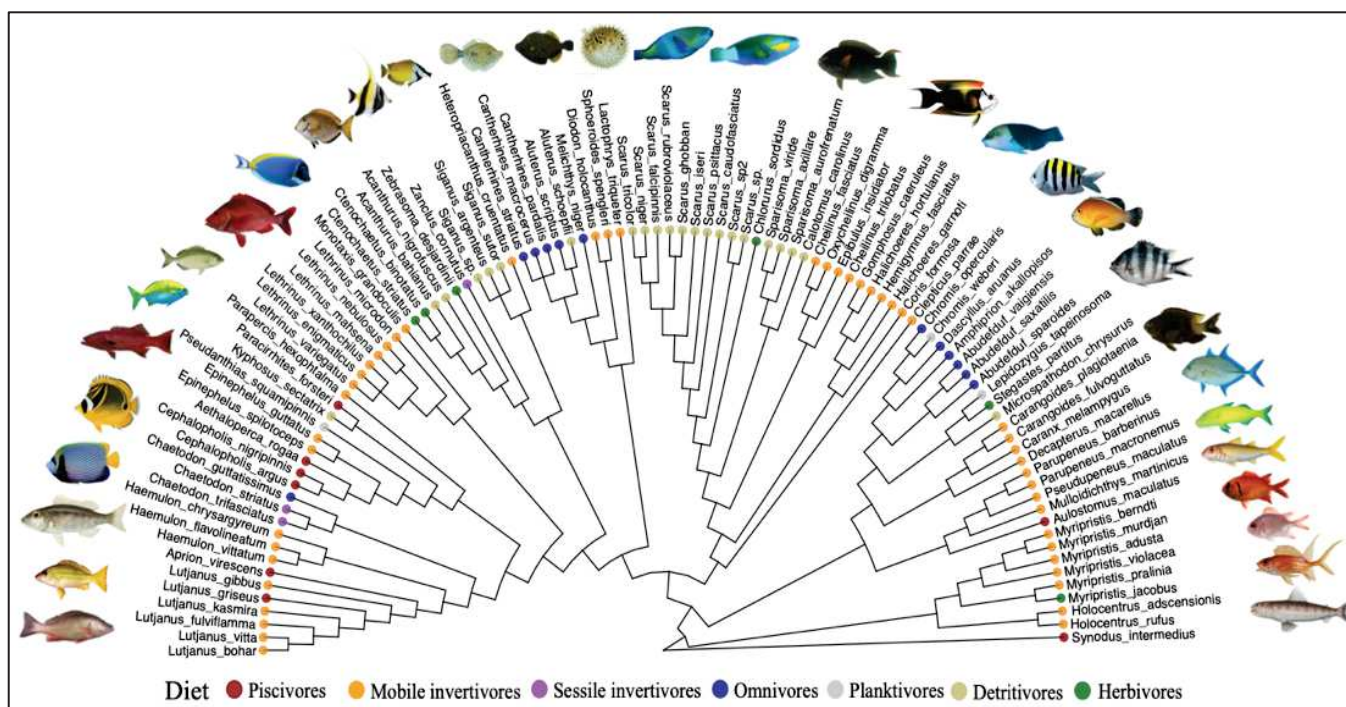


Figure 1 : Phylogenetic tree of the 101 coral reef fish species sampled. Each color node corresponds to the diet of the species according to Mouillot et al., (2014). The phylogeny of fish was inferred following the fish tree of life (<https://fishtreeoflife.org/>) (Rabosky et al., 2018).

3) Sequence processing

All analyses were carried out with R software 4.0.2 (R Core Team, 2020) and are available on GitHub: <https://github.com/mccheutin/Bacteriome>.

Sequence reads were processed using the DADA2 pipeline (v1.12.1) in R (Callahan et al., 2016). Briefly, sequences were trimmed and filtered based on reads quality profiles (maxN = 0 ; maxEE = (2 , 2) ; truncQ = 2 ; and truncLen = (240 , 240)), error correct, dereplicated and Amplicon Sequence Variants (ASVs) were inferred (Glassman and Martiny, 2018). Forward and reverse ASVs were merged and pooled in a count table where chimera were identified and removed. Taxonomy assignment was performed using the SILVA reference database (release 132) (Quast et al., 2013). The ASV's count table, their taxonomy and their sequences were organized in a phyloseq object using the phyloseq package (version 1.28.0) (McMurdie and Holmes, 2013). After removing the organites and the eukarya sequences from the phyloseq

object, we obtained a final dataset constituted by 5 614 276 sequences (15 246 ASVs) ranging from 478 to 38 540 sequences by sample.

4) Establishing the inventory of the enteric core microbiome of coral fish

In order to consider the taxa which may have evolved in close association with their hosts for a long time period (Berg, 1996; Martinson *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2013), we distinguished the permanent versus transient bacterial inhabitants by examining the species abundance distribution (SAD) patterns of each ASV and by partitioning the SAD into core and satellite ASVs (Magurran and Henderson, 2003). For this purpose, the index of dispersion for each ASV was calculated as the ratio of the variance to the mean abundance (VMR) multiplied by the occurrence. The ASVs were considered as ‘core’ if their indices followed a Poisson distribution (*i.e.* stochastic distribution), falling between the 2.5 and 97.5% confidence interval of the χ^2 distribution (Krebs, 1999). The same method was used to calculate the core microbiome of the sediment and the seawater. We then used a BLASTn approach on the nr/nt database and the habitat-associated metadata to the closest ASV match to infer the habitat preference of the ASVs constituting the enteric core microbiome of reef fishes (Scott *et al.*, 2020). For each ASV, the blast with the highest identity and sequence coverage was kept. Information concerning the isolation source contained in the GenBank fields “isolation source”, “host”, and “title” of each closest blast were extracted using a dedicated python script and parsed into “Animal”, “Environment” (*i.e.* free living bacteria associated with sediment, soil, water or photosynthetic organisms), and “Other” habitat categories. For ASVs associated with animals, we further categorized the isolation sources into specific hosts (*i.e.* fish, marine invertebrates, terrestrial vertebrates, and the rest as other) and organ (*i.e.* gut, external tissue, and the rest as other) categories (**Supplementary File 1**). In order to associate these habitat

preferences to the phylogenetic affiliation of each ASV, the core ASVs were aligned against the silva.nr_v132 reference database using mothur v.1.35.1 (Schloss *et al.*, 2009) before being imported into the ARB software (Ludwig, 2004) and loaded with the SILVA (v.138) reference database (Quast *et al.*, 2013). A base frequency filter was applied to exclude highly variable positions before adding sequences to the maximum parsimony backbone tree using the parsimony quick add marked tool implemented in ARB. The tree and the associated categories were drawn and visualized using the interactive Tree of Life (iTOL) web server (Letunic and Bork, 2016).

5) *Comparison between the enteric core microbiome and the environment*

The gut and environmental (*i.e.* sediment and seawater) core microbiomes were compared in richness and in composition by measuring the alpha and beta-diversity. In order to correct for the uneven sequencing depth among samples, 2 053 sequences were randomly sub-sampled within each sample using the “rarefy_even_depth” function from the phyloseq R-package v.1.28 (McMurdie and Holmes, 2013). Good’s coverage estimator (Chao *et al.*, 1988) was 99.9 ± 0.1 indicating that the coverage was still excellent after rarefaction. Taxonomic diversity of each compartment (*i.e.* gut, sediment and seawater) was measured using the richness (number of ASV) and the entropy with the Shannon’s index H, later exponentially transformed to express it as the effective number of species (ENS) (Jost, 2006). Taxonomic dissimilarities between pairs of microbiome samples were assessed using the Bray-Curtis dissimilarity computed on relative abundances of ASVs. Comparison of the alpha diversity (richness and entropy) between compartment was achieved using a Kruskal-Wallis (KW) test (999 permutations) in the vegan R-package followed by a post-hoc Dunn test (999 perm, *p*-value corrected by Bonferroni’s method) in order to identify which group means differed. To

155 determine beta-diversity changes, significant sources of variation in microbiome Bray-Curtis
156 dissimilarity matrices were assessed using permutational analysis of variance (PERMANOVA)
157 with the `adonis` function from the `vegan` package and with the Local Contribution to Beta
158 Diversity (LCBD) calculated with the `beta_div()` function from the `adespatial` package (version
159 0.3.15) (Dray *et al.*, 2012). The comparison for the LCBD was achieved as the alpha-diversity.
160

Results and discussion

Gut microbiome differs from the environment

A total of 2 080 microbial ASVs representing 86.1 % of the total reads constituted the core microbiome of the 378 gut samples belonging to 101 coral reef fish species. Among these ASVs, only 3, representing 0.03% of the relative abundance, were affiliated to Archaea, indicating that universal primers targeting the 16S rRNA gene reach overall the bacteriome. Similar observations have been made on terrestrial vertebrates and in other fish (Ni *et al.*, 2014; Youngblut *et al.*, 2019). We thus suggest to use another sampling strategy with specific archaean primers, for further investigations on the description of the Archaeome.

The core microbiome of coral reef fish was mainly constituted by anaerobic bacterial taxa such as the Phyla of *Proteobacteria* (mainly *Vibrionales*) and *Firmicutes* (mainly *Clostridiales*) which jointly represented 65% of the core. Other less abundant phyla such as *Planctomycetes* (11%), *Bacteroidetes* (6%), *Cyanobacteria* (4%), *Fusobacteria* (4%), *Tenericutes* (3%), *Verrucomicrobia* (2%), *Actinobacteria* (2%) and minor phyla constituted the rest of the core microbiome (**Figure 2.A**). The gut core microbiome is markedly different from the environment with a significant lower taxonomic diversity for both observed richness (KW = 117 ; $p = 0.001$) and entropy (KW = 98 ; $p = 0.001$) (**Figure 3.A**). The observed richness averages 66 sequences and the entropy 26 sequences, which is ~ 25% of the average taxonomic diversity of sediment-associated microbes (**Figure 3.A**). In addition, gut microbiomes exhibit a markedly different composition from the environment with the type of sample explaining 10% of the variability (PERMANOVA: $R^2 = 0.10$; $p = 0.001$) (**Figure 3.B**). While the alpha-diversity was lower in the gut, the local contribution to beta diversity for gut is as high as seawater (KW = 0.73 ; $p = 0.70$), meaning that gut microbial diversity might be poorer than environment but exhibit a high originality and variability between samples (**Figure 3.B**). The

186 great variation exhibited between fish has already been recorded in several studies on the fish
187 gut (Sullam *et al.*, 2012) and skin (Chiarello *et al.*, 2018) but no study has actually investigated
188 the forces that drive this variability in coral fish gut and how has it changed overtime.

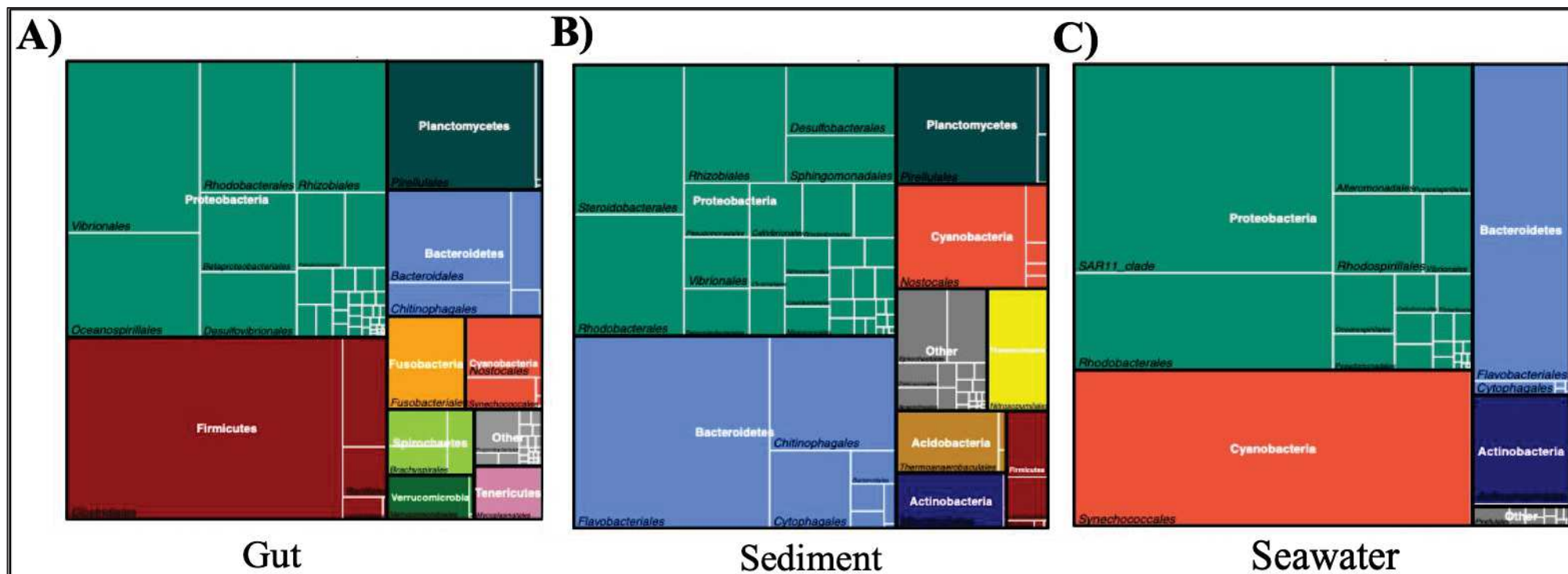


Figure 2 : Treemaps of the core microbiomes associated with reef fish gut (A), sediment (B) and seawater (C)

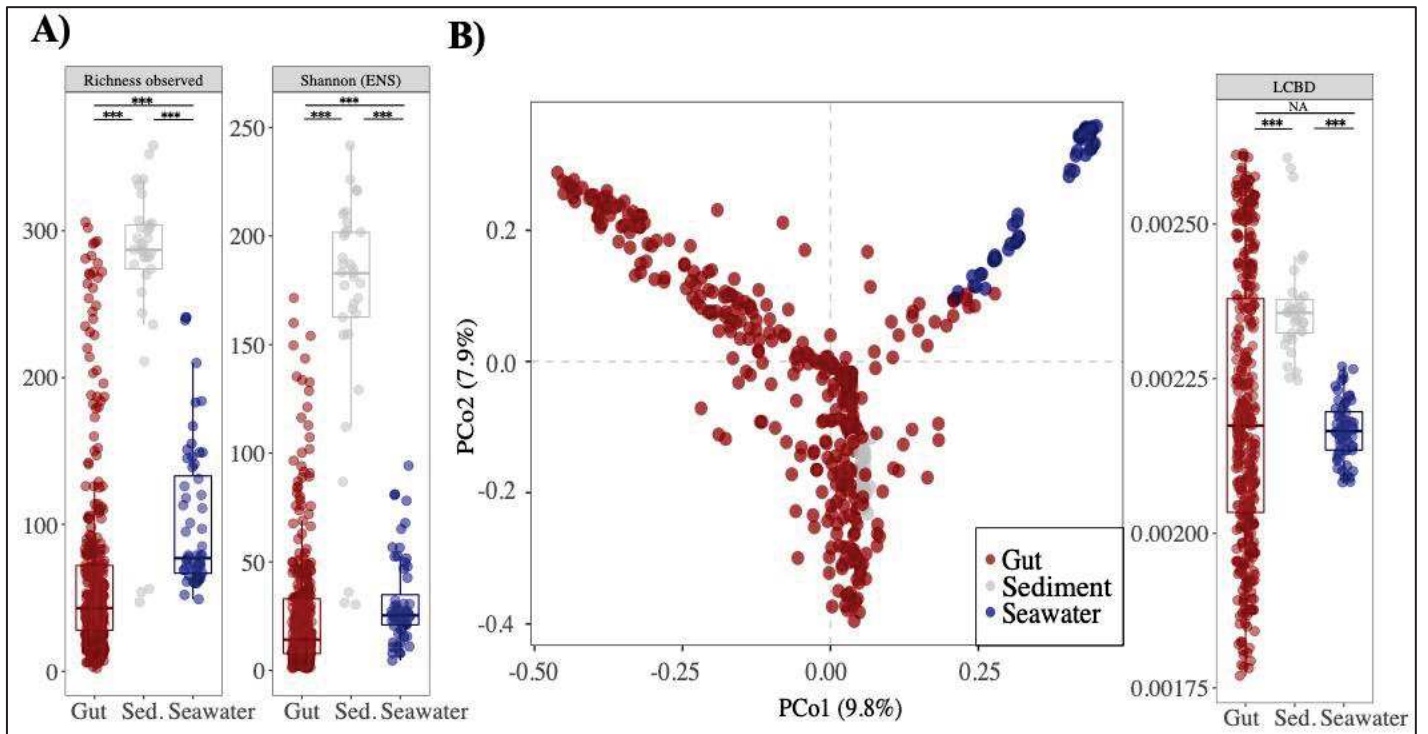


Figure 3 : Diversity comparisons between core microbiomes of reef fish gut (red), sediment (Sed. ; gray) and seawater (blue). Alpha diversity is represented by the richness observed and the Shannon index transformed in effective number of species (ENS) (A). The beta-diversity is calculated with the Bray-Curtis index between pairs of samples and visualized with a Principal Coordinates Analysis and the Local contribution to Beta diversity (LCBD) (B). Significant codes for p-value : *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not (NS.).

190 Sediment is constituted by both aerobic phyla such as *Flavobacteriales* (9%) or
 191 anaerobic Archaea with *Thaumarchaeota* (3%) (Figure 2.B) while seawater is rich in aerobic
 192 phyla such as *Cyanobacteria* (27%) (Figure 2.C) demonstrating that each core microbiome is
 193 specific to its compartment. However, 12% (259) were shared between gut core microbiome
 194 and the cores of environmental samples (Figure 4) suggesting that a relevant part of the
 195 microbiome, mainly belonging to *Pirellulales*, *Rhodobacterales* and *Flavobacteriales*, is
 196 connected between the compartments. A study showed the connectivity of a shared microbiome
 197 between seagrass, fish and sediments (León-Zayas *et al.*, 2020). Such finding are important to
 198 understand the microbial dynamic in reefs. Further studies might explore the reservoir of
 199 benefic taxa for reef fish. For instance, we found 2 core ASVs related to the giant bacteria
 200 *Epulopiscum*, known to be an intimate symbiont of surgeonfish (Clements *et al.*, 1989; Miyake

et al., 2016; Ngugi *et al.*, 2017), in the sediment which represented 0.05% of the total relative abundance, and a unique core ASV in the seawater, which was in common with one of the sediment. Such a result is in accordance with previous studies which identified sediment as a potential reservoir of *Epulopiscium* (Flint *et al.*, 2005; Grim *et al.*, 2013; León-Zayas *et al.*, 2020).

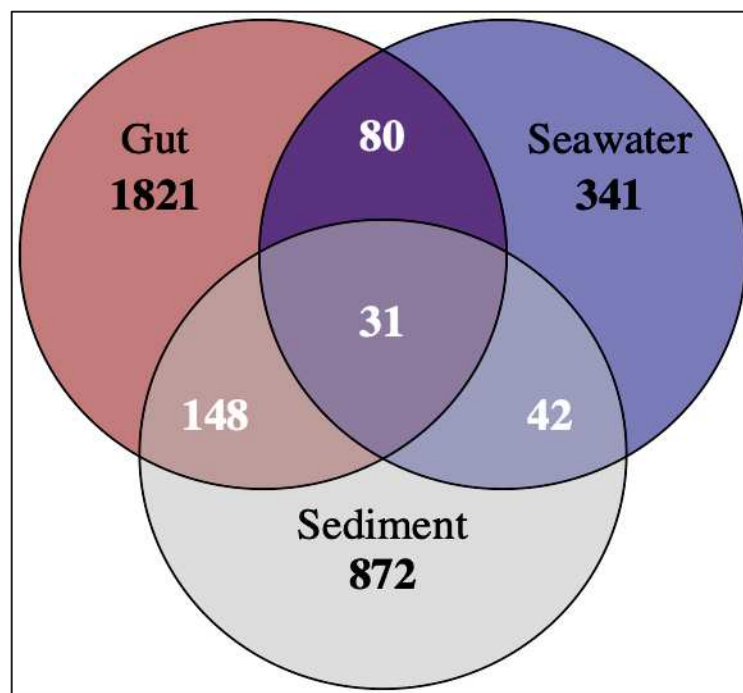


Figure 4 : Venn diagram of the core ASVs between gut, sediment and seawater microbiomes.

Gut microbiome is very specific

Our gut description is common with studies made on the gut microbiomes of terrestrial vertebrates including mammals (Ley *et al.*, 2008a; Song *et al.*, 2020), which seemingly supports that gut microbiome is specific to such a compartment. The importance of fermenters clades such as *Clostridiales*, *Vibrionales* or *Bacteroidales* have already been described as key taxa for host digestion (Fidopiastis *et al.*, 2006; Solden *et al.*, 2017; Raimundo *et al.*, 2021).

215 These results go together with the BLASTn analysis which revealed that 50% (1043) of the
 216 core microbial ASVs were closely related to sequences previously retrieved from animal
 217 microbiomes (**Figure 5**).

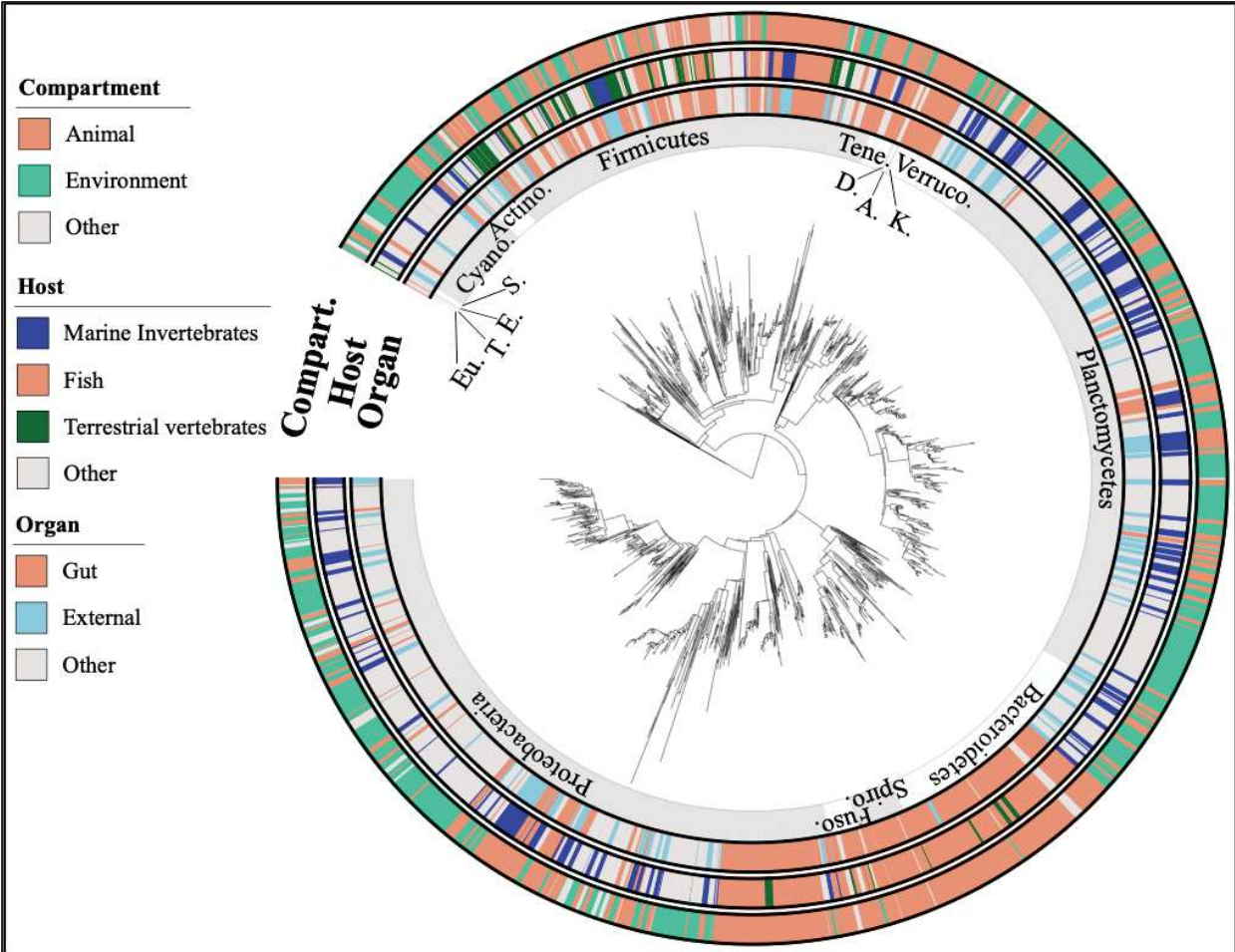


Figure 5 : Maximum parsimony phylogenetic tree of the 2 080 ASVs from the reef fish gut core microbiome. The 16S rRNA sequences were inserted into the original SILVA (release 138.1) tree using parsimony criteria with the Bacteria filter excluding highly variable positions. The inner ring represents the taxonomy provided by default in the SILVA bacterial tree. The three outer rings depict the habitat preferences of each ASV described here as three categories (i.e. compartment, host and organ) clustered from the environmental information associated with each closest blast. The tree was drawn using the web-based interface interactive tree of life (iTOL). Abbreviations : Eu. = *Euryarchaeota* ; T. = *Thaumarchaeota* ; E. = *Elusomicrobia* ; S. = *Synergistetes* ; Cyano. = *Cyanobacteria* ; Actino. = *Actinobacteria* ; Tene.= *Tenericutes* ; D. = *Deferribacteres* ; A. = *Acidobacteria* ; K. = *Kiritimatiellaeota* ; Verruco. = *Verrucomicrobia* ; Spiro. = *Spirochaetes* ; Fuso. = *Fusobacteria*.

218

In addition, 32% (659) mainly belonged to the Order *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Desulfovibrionales* families, and matched preferentially with previously reported intestinal tract. Among these sequences, 7% (79) matched with terrestrial animals against 24% (500) related with fish from the *Siganidae*, *Acanthuridae* and *Scaridae*, indicating a certain degree of conservation for a significant part of the coral fish gut microbiome (**Figure 5 ; Supplemental File 1**). This is particularly true for the ASVs related to *Epulopiscium* of which 41 on 56 were reported in intestines of coral fish (Miyake *et al.*, 2016; Ngugi *et al.*, 2017). The conservation of this clade is still not understood but its role might likely be involved in the digestion of the host (Ngugi *et al.*, 2017). Further studies would perform subsequent analysis on its distribution in the marine biome and its role for the coral reef fish.

Also, it is noteworthy that the related fish family hosts resulting from the BLASTn are the most represented in studies on coral reef fish gut microbiomes, demonstrating thus the considerable gap concerning all the other species. At a higher scale, 19% (403) of the core ASVs, mainly affiliated to Orders of *Pirellulales*, *Rhodobacterales* and *Vibrionales* were best related to sequences associated with other marine animal microbiomes, such as corals and sponges, indicating that another significant part of the fish gut microbiome maybe symbiotic generalists distributed among the marine biome.

Conclusion

Our results shed light on the fact that gut core microbiomes of reef fish are specific to reef ecosystems and notably to the enteric environment. However, we still lack knowledge on how the gut microbiome of reef fish is determined while they are a considerable part of the microbial diversity in reef ecosystems. By considering a large range of species, further studies have to determine their driving force and their role for the host and their environment. Finally,

universal primers miss the other Kingdoms of the microbiome such as Archaea, Eukarya and Virus which are still underestimated and unknown in gut coral reef fish.

Acknowledgements

This project was funded by a grant from the CNRS INSU EC2CO “Microbien” program project BIOMEVO, a grant from the CNRS international emerging actions (IEA) program project FISHμBIOM, the Royal Society and an ERC grant (759457) to Lancaster University and from the Explorations de Monaco program project Megafauna.

Marie Charlotte Cheutin was supported by a Ph.D grand from the French Ministry of Higher Education and Research.

A research permit was issued by Seychelles Bureau of Standards (n° FST18132), the *Terres Antarctiques et Australes Françaises* (TAAF) (decree 2019-45 of the 1st april, 2019) and the Martinique government services (decision n°122). We thank the Seychelles Fishing Authority research team, the crew of the R/V Marion Dufresne II for logistical support, assistance in the field and with sample preparation (Andrew Souffre, Rodney Melanie, Achille Pascal, Marie-Corinne Balett, Stephanie Marie, Clara Belmont). We are grateful to three trap fishers who provided boat time and fisheries expertise, and assisted with sample collection.

We are grateful to the genotoul sequencing platform in Toulouse (Occitanie, France), for providing the MiSeq Illumina sequencing.

Author contributions

JCA, MCC, TB and SV conceived the study. JR, CA, EM and SV conducted the fieldwork and MCC, JCA, CXR, JBJ, EM, ES, VM, CB, RG, ER, CA dissected the fish guts. MCC and CM extracted the DNA and prepared the DNA for sequencing. MCC, CXR and JCA analyzed the data. MCC and JCA wrote the first draft of the manuscript with input from SV, TB, JR, NG, TD and CH. All authors reviewed the manuscript and contributed to the final version.

Manuscrit B

Sulfate-reduction prevents marine fishes from farting methane

Authors : Marie-Charlotte Cheutin¹, Julie Balland¹, Émilie Roso¹, Martin Dessart¹, Fabien Rieuvilleneuve¹, Sébastien Villéger¹, Thierry Bouvier¹, Jean-Christophe Auguet¹

¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France

Keywords: Archaeome, gut, coral reef fish, methane production, sulfate-reduction.

En préparation

Des informations supplémentaires complètent ce manuscrit en Annexe 8.III.B

Abstract

Recent studies described the enteric microbiomes of fish by amplicon sequencing using universal primers which miss much of the archaeal diversity present. The previous studies performed on the intestinal tracts of terrestrial vertebrates suggest that methanogens represent the major part of the archaeome and might be a considerable source of methane emission into the atmosphere. Fish represent the highest biomass of vertebrates on earth and we still do not know their potential contribution in methane emission. Using 16S rRNA amplicon sequencing with 13 Archaea-targeted primers and quantitative PCR on methanogens with the *mcrA* gene, we showed that Archaea and specifically methanogens are commonly absent (7,8% amplification success) or exceptionally rare (< 100 copies/ μ L). The available prokaryotic 16S rRNA sequences provided from the same samples, indicated the same trend with 0.05% of Archaea, mainly constituted by non-methanogens *Thaumarchaeota*. We measured the emission of gas produced by Mediterranean fish *in vivo* by gas chromatography but we did not detect any methane production, suggesting that marine fish represent a methane-free source of proteins. In a second time, we tested the presence of sulfate-reducing bacteria (SRB) targeting the *dsrB* gene with qPCR using specific primers and with the prokaryotic 16S rRNA amplicon sequences. The success of amplification of the *dsrB* gene (37%) was very variable between sample fish and goes together with the result of the Tax4Fun2 prediction on the genes involved in sulfate-reducing metabolisms with a global contribution of 0.02% of the total functional gene contribution. As such, sulfate-reduction may be favored in the gut microbiome of marine fish and compete with methanogens, thus limiting the methane emission.

Introduction

The role and influence of the gut microbiome on the host fitness and its functionality have been largely demonstrated until considering it as an entire organ (Stappenbeck *et al.*, 2002; Turnbaugh *et al.*, 2006; Bäckhed *et al.*, 2015). Our knowledge on gut animal-associated microbes, known as “microbiome”, has been greatly enhanced by the next generation sequencing methods. However, most data on microbial diversity derives from universal 16S rRNA primers, which oversample bacteria while neglecting archaeal diversity (Thomas *et al.*, 2021). While archaea were originally described to be associated with extreme ecosystems such as volcanic environments (Wächtershäuser, 2006) or hydrothermal vents (Kan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016b), they are actually universally distributed from the ocean water column to the gut of animals (Pereira *et al.*, 2019; Borrel *et al.*, 2020). The current use of Archaea-targeted 16S rRNA gene primers shed light on the high archaeal diversity in vertebrates and its potential beneficial role on host health and metabolism (de Macario and Macario, 2009; Brugère *et al.*, 2014; Lurie-Weinberger and Gophna, 2015; Thomas *et al.*, 2021). Two studies have recently described and compared the archaeome of different taxonomic classes of vertebrates (Youngblut *et al.*, 2020; Thomas *et al.*, 2021). They revealed a greater gut archaeal diversity than previously described by universal primers of the 16S rRNA gene and demonstrated that archaeome structure was mainly explained by the host phylogeny with a strong co-phylogeny signal in herbivorous mammals (Youngblut *et al.*, 2020). As described in previous studies concerning great apes (Raymann *et al.*, 2017), humans (Probst *et al.*, 2013; Borrel *et al.*, 2017), insects (Lee *et al.*, 1987; Gijzen *et al.*, 1991), sponges (Turon and Uriz, 2020), and ruminants (Newbold *et al.*, 2015; Patra *et al.*, 2017), a substantial component of animal archaeome includes hydrogenotrophic methanogens with *Methanobacteriales*, *Methanomassilicocales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*. This pathway consists on the reduction of CO₂ or methyl groups with H₂ (Saengkerdsut and Rieke, 2014). While non-methanogenic archaea

have been associated with the gut archaeome of vertebrates with the *Halobacteria*, *Thaumarchaeota* and *Woesarchaeotota* (Baker *et al.*, 2020; Borrel *et al.*, 2020), methanogens remain the most abundant Archaea in the vertebrate gut and rely on a metabolic synergism between non-archaeal fermenters (Bonin and Boone, 2006; Youngblut *et al.*, 2020). By reducing the small fermentation end-products (*e.g.* dihydrogen, CO₂, formate methyl compounds and acetate) resulting from the fermentation of complex molecules such as carbohydrates (Toft and Andersson, 2010; Cavicchioli, 2011), methanogens maintain low dihydrogen concentrations and allow subsequent fermentations on volatile fatty acids, lactate or alcohol. *In fine*, methanogens contribute to the energy retrieval during digestion of organic matter for the host and are considered to be keystone taxa for the metabolism of fermentation in anoxic ecosystems (Borrel *et al.*, 2020).

Methane is the most potent greenhouse gas in the atmosphere with a global-warming potential 28-34 times that CO₂ (Allen, 2016). As such, the contribution of methanogenesis to climate change is under attention, as ~69% of the atmospheric methane originates from archaeal metabolism (Conrad, 2009; FAO, 2016). Around one quarter of the methane comes from the agricultural sector, especially livestock with ~83,6 million tons per year released into the atmosphere through eructation, normal respiration and flatulence (St-Pierre and Wright, 2013; Pérez-Barbería, 2017; Moissl-Eichinger *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2018). However, research on the animal archaeome and its contribution on methane emission is still in its infancy. This is particularly true concerning teleost fish, which represent the most abundant group of vertebrates on Earth with a biomass of 0.7 gigatons of carbon (seven times more than livestock) (Bar-On *et al.*, 2018). Yet, a first study in the late 1970 revealed a methanogenesis activity *in situ* in the intestines of the dover sole (*Solea solea*) and in the black cod (*Anoplopoma fimbria*) (Oremland, 1979). The following descriptions of the european flounder (*Platichthys flesus*) and gray mullet (*Mugil mugil*) gut archaeomes with the sequencing of

Archaea 16S rRNA and *mcrA* (methyl coenzyme reductase, subunit A) genes (van der Maarel *et al.*, 1998, 1999) did actually confirm the presence of methanogens. Considering the similarity of gut morphology between fish and terrestrial vertebrates with high rates of fermentation (Clements and Choat, 1995; Fidopiastis *et al.*, 2006), such a finding is not surprising. For instance, gut length of herbivorous is longer than gut of carnivorous fishes maximizing the gut capacity and retention time (Mountfort *et al.*, 2002; Egerton *et al.*, 2018). Thus, the gut length enhances a longer contact time between gut microbes and insoluble substrates and contributes to a high digestive efficiency (Clements and Choat, 1995; Fidopiastis *et al.*, 2006; Mackie *et al.*, 2009). Enteric microbiome of fish has been described to be quite similar to the gut microbiome of mammals, with a predominance of bacterial fermenters *Firmicutes* and *Bacteroidetes* (Turnbaugh *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2008b; Egerton *et al.*, 2018). Briefly, complex molecules (*e.g.* cellulose, hemicelluloses, pectin) can be hydrolyzed in pyruvate and short-chain fatty acids (*e.g.* acetate, propionate and butyrate) that contribute to the energy retrieval of the host and serve for methanogenesis metabolism. In that sense, herbivorous fish might be a potential incubator for methanogenesis fermentation and may contribute to methane emission as their terrestrial counterpart (Clements and Choat, 1995). The recurrent transitions from a coral cover to a macroalgal dominance which is occurring in reefs worldwide (Hughes *et al.*, 2007, 2017) enhance the dominance of herbivorous fish such as *Siganidae*, of which gut microbiome has been already described to be adapted with specific fermentative bacteria (Cheutin *et al.*, 2021). Such a shift is not unique with the actual tropicalization of temperate seas which allowed the arrival of tropical alien species such as *Siganus rivulatus* and *S. luridus* in the Mediterranean Sea which caused a severe marine deforestation (Vergés *et al.*, 2014, 2016). Considering this fact, understanding the influence of fish populations in methane production remains a critical gap in evaluating the effect of current changes on greenhouse gas cycles. Here, we hypothesized that macroalgal biomass might be

transferred to fish and supported by microbial fermentation of which methanogenesis would contribute. Nonetheless, several studies tried to describe the archaeal diversity associated with teleost fish but with low success, and this becomes particularly true concerning herbivorous fishes (Fidopiastis *et al.*, 2006; Clements *et al.*, 2007; Ni *et al.*, 2014).

Sulfur occurs in marine realm as sulfate and is part of normal seawater (~ 7% of the total dissolved solids) and contributes strongly to macroalgal structure through a large range of sulfated polysaccharides such as agar, carrageenan, laminarin and porphyrins (Hehemann *et al.*, 2010). Gut microbiomes of fish are adapted for the degradation of complex molecules where the role of the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in the hydrolysis of such components is crucial for the host (Clements and Choat, 1995; Clements *et al.*, 2007; Hehemann *et al.*, 2010). Thanks to beta-agarases and beta-porphyrinases, they are capable of breaking down algal polysaccharides, releasing fermented products such as acetate, butyrate, sulfated compounds and dihydrogen. Thus, we investigated an alternative pathway for terminal carbon and electron flow through sulfate-reduction. We hypothesized that sulfate reducing bacteria (SRB) are favored in marine fishes gut and compete with methanogens for the electron donors provided by the first fermenters (*i.e.* acetate, butyrate, propionate, dihydrogen) (Kalyuzhnyi *et al.*, 1998).

Hence, many questions about the contributions of archaea and specifically methanogens, to the microbiome of marine fish can now be addressed. First, *i)* what is the archaeal diversity associated with the gut of marine fishes? Secondly, *ii)* what is the methane emission rate resulting from its gut microbial fermentation? Finally *iii)* Is sulfate-reduction an alternative pathway to methanogenesis?

To address these hypotheses, we ran PCR with several primers specific to Archaea 16S rRNA, methanogen *mcrA* and SRB *dsrB* genes on samples collected in the gut of 490 reef fish belonging to 110 species. We then ran a second experiment to detect a methane flux *in vivo*

- 123 with herbivorous juveniles *Sarpa salpa* and *Sardina pilchardus* using gas chromatography
- 124 coupled with flame ionization detector (GC-FID).

Material and methods

1) Sample collection and DNA extraction

Sampling collection was performed between 2017 and 2019, in three regions located in the Western Indian Ocean (WIO) with Europa (- 22° 20' S , 40° 22' E), Juan de Nova (- 17° 03' S, 42° 43' E) and the archipelago of Seychelles (- 4°41' S , 55° 26' E) ; and one located in Caribbean Sea, the Martinique island (14° 38' N , - 61° 01' W). Adult fishes were collected using hand lines, traps, underwater nets and were fished by harpoon. Immediately after capture, fishes were killed by cervical dislocation (following the European directive 2010/63/UE). They were then conserved on ice in coolers for dissection in the laboratory later on the same day. At the laboratory, fishes were placed in trails washed with 70% ethanol and the whole intestinal tract of each fish was extracted using sterile dissection tools following the protocol of Clements et al., (2007) and Miyake et al., (2015). Environmental samples (*i.e.* sediment, macroalgae and seawater) were also collected in each station. Sediment was directly sampled and conserved, the macroalgae were scraped using buccal swab (CliniSciences®, Nanterre, France) and the seawater samples consisted in the filtration of 500 mL through a 0.2 µm Whatman® Nuclepore™ filter (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, MO, US) placed in a Nalgene™ (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, US) bottle.

All samples were immediately stored at -80°C until DNA extractions. A total of 490 fishes belonging to 110 species covering 25 families, 29 swabs of macroalgae, 33 samples of sediment, and 60 filters of seawater were sampled (**Supplemental Table 1**). Fish diet was assessed thanks to the Fishbase references (Froese and Pauly, 2021) and the phylogeny was inferred following the fish tree of life (<https://fishtreeoflife.org/>) (Rabosky *et al.*, 2018). Total genomic DNA from 200 mg of homogenized intestinal contents was extracted using the MagAttract PowerSoil ® DNA kit according to the manufacturer instructions (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) with automated processing and liquid handling system

(Thermo Scientific KingFisher Flex TM). Nucleic acids were eluted in molecular water (Merck Millipore TM) and quantified on a Thermo Scientific NanoDrop 8000 TM spectrophotometer.

2) *Amplification of the 16S rRNA and functional genes*

Archaea were first targeted using PCR amplification with 13 specific primers set. The protocols used for each combination are presented in **Table 1**. Because qPCR may be more sensitive for the detection of rare taxa such as Archaea, methanogens, and SRB, we performed quantified PCR (qPCR) on the LightCycler® 480 system (Roche, Bâle, Switzerland) using the LightCycler® 480 SYBR green I master for the mix PCR and the detection. Each run was standardize using a 10-fold serial dilution (10^9 to 10^2 copies/ μ L) of plasmids containing a partial 16S rRNA gene of *Methanocorpusculum aggregans* for the standard curve of Archaea, the *mcrA* gene for the methanogens and the *dsrB* gene for SRB. Archaeal 16S rRNA genes were amplified using the a934bF (5'-GATTGGCGGGGAGCA-3') and a1000R (5'-GGCCATGCACYWCYTCTC-3') primer set (Großkopf *et al.*, 1998) using the following protocol : an initial denaturation step (5 min ; 95°C) followed by 45 cycles with a denaturation of 30s at 95°C, an annealing step of 20s at 60°C and an extension of 30s at 72°C. At the end of the cycles, a final extension of 5 min at 72°C is performed. The *mcrA* gene for methanogens and the *dsrB* gene for SBR were respectively amplified using the set of primers mlas (5'-CGTTCATBGCGTAGTTVGGRTAGT-3') and mcrAR (5'-GGTGGTGTMGGDTTCACMCARTA -3') (Steinberg and Regan, 2008) and the set dsr4F (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') and dsrp2060R (Geets *et al.*, 2006). The protocol used for the PCR was the same for both, with an initial denaturation step (5 min ; 95°C) followed by 45 cycles with a denaturation of 30s at 95°C, an annealing step of 40s at 60°C and an extension of 1min at 72°C. A final extension of 10min was performed at 72°C. The accuracy of the qPCR

was confirmed through melting curve analysis. All quantifications were performed in triplicate for each sample in independent runs.

3) Analysis of Archaea and BSR from prokaryotic 16S rRNA gene amplicon sequencing

For the prokaryotic 16S rRNA gene, we used the available data provided by Cheutin et al., 2021 obtained by Illumina MiSeq 2x250 bp of the v4-v5 regions of the 16S rRNA amplified with universal primers 515F-Y (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (Parada *et al.*, 2016). Sequence reads were processed using the DADA2 pipeline (v1.12.1) in R (Callahan *et al.*, 2016) and inferred in Amplicon Sequence Variants (ASVs) (Glassman and Martiny, 2018), following the methodology of Cheutin et al., (2021) available in GitHub: <https://github.com/mccheutin/Archaeome>.

Taxonomy assignment was performed using the SILVA reference database (*release 132*) (Quast *et al.*, 2013). The ASV's count table, their taxonomy and their sequences were organized in a phyloseq object using the phyloseq package (version 1.28.0) (McMurdie and Holmes, 2013). We obtained a final dataset constituted by 5 948 390 sequences (15 666 ASVs) ranging from 796 to 38 546 sequences by sample constituted by 99.91% Bacteria, 0.05% Archaea and 0.04% Eukarya (**Figure 1**).

193
194
195

Table 1 : Primers set and their respective protocol used for the amplification of the 16S rRNA and functional genes of methanogens (*mcrA*) and sulfate-reduction (*dsrB*).

Target	Gene	Region	Primers set	Initial denaturation	Denaturati on	Annealing	Extension	Final extensio n	Hold	Ref
Universal	16S rRNA	V4-V5	515F-Y/926R	98°C; 30"	98°C ; 10"	35 cycles 60°C ; 1'	72°C ; 1'30	72°C ; 10'	4° ; ∞	[1]
		V1-V5	a21f/arch958R*		98°C ; 10"	10 cycles 55°C ; 1'	72°C ; 1'			[2]
		V3-V8	arch349F/uni1392R*		98°C ; 10"	10 cycles 57°C ; 1'	72°C ; 1'			[3]
		V3-V6	arch344F/arch1017R*		98°C ; 10"	10 cycles 56°C ; 45"	72°C ; 1'			[4]
		V1-V4	SSU1ArF/a806R*		98°C ; 30"	10 cycles 55°C ; 1'	72°C ; 30"			[5]
Archaea	16S rRNA	V4-V5	a516F/a915R		98°C ; 10"	30 cycles 60°C ; 1'	72°C ; 30"			[6]
		V3-V4	arch349F/SSU666ArR		98°C ; 10"	32 cycles 55°C ; 45"	72°C ; 1'			[7]
		V3-V4	arch344F/SSU666ArR		98°C ; 10"	32 cycles 56°C ; 45"	72°C ; 1'			[8]
		V4	arch519F/a806R		98°C ; 10"	35 cycles 63°C ; 1'	72°C ; 30"			[9]
		V3-V4	arch344F/a806R		98°C ; 10"	35 cycles 63°C ; 1'	72°C ; 30"			[10]
		V3-V4	arch349F/a806R			35 cycles				[11]

					98°C ; 30"	54°C ; 1'	72°C ; 30"		
		V3-V6	a519F/arch1017R			32 cycles			[12]
					98°C ; 10"	52°C ; 1'	72°C ; 1'		
		V1-V5	SSU1ArF/SSU520R			32 cycles			[13]
					98°C ; 10"	55°C ; 1'	72°C ; 30"		
Archaea	16S rRNA	V6	a934bF/a1000R			45 cycles			[14]
					95°C ; 30"	60°C ; 20"	72°C ; 30"		
Methanogen	<i>mcrA</i>		mlas/mcrAR	95°C ; 5'		45 cycles		72°C ; 10'	[15]
					95°C ; 30"	60°C ; 40"	72°C ; 1'		
Sulfate-reducing bacteria	<i>dsrB</i>	-	dsrp2060F/dsr4R			45 cycles			[16]
					95°C ; 30"	60°C ; 40"	72°C ; 1'		

* Primers set used as first amplification in nested PCR for the other couples. Bold sets are used for the qPCR.

References : [1] (Wächtershäuser, 2006) ; [2] (DeLong, 1992) ; [3] (Takai and Horikoshi, 2000; Klindworth *et al.*, 2013) ; [4] (Pausan *et al.*, 2019) ; [5] (Takai and Horikoshi, 2000; Bahram *et al.*, 2019) ; [6] (Stahl and Amann, 1991; Takai and Horikoshi, 2000) ; [7] (Takai and Horikoshi, 2000; Bahram *et al.*, 2019) ; [8] (Casamayor *et al.*, 2002; Bahram *et al.*, 2019) ; [9] (Takai and Horikoshi, 2000; Gantner *et al.*, 2011) ; [10] (Takai and Horikoshi, 2000; Casamayor *et al.*, 2002) ; [11] (Takai and Horikoshi, 2000) ; [12] (Stahl and Amann, 1991; Pausan *et al.*, 2019) ; [13] (Bahram *et al.*, 2019) ; [14] (Großkopf *et al.*, 1998; Gantner *et al.*, 2011) ; [15] (Steinberg and Regan, 2008) ; [16] (Foti *et al.*, 2007)

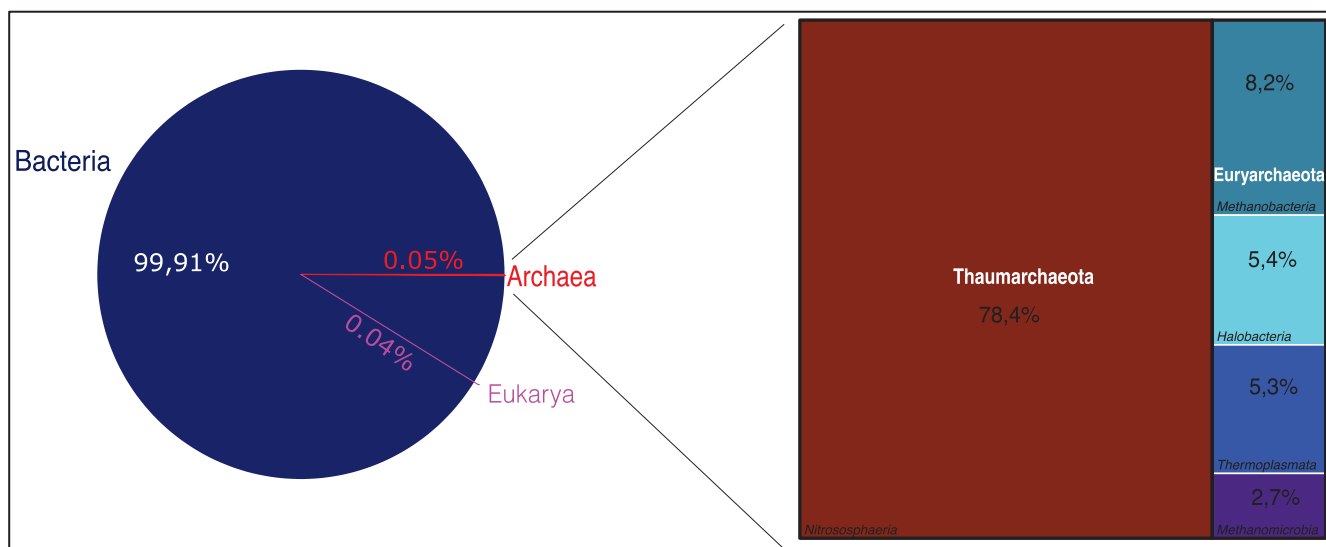


Figure 1 : Taxonomic diversity of the gut microbiome of coral reef fishes assessed with universal-targeted 16S rRNA gene primers. Archaeal ASVs which represent 0.05% of the gut microbiome are represented in a treemap.

Then, we used the function `subset_taxa()` on the previous phyloseq package created to generate two new phyloseq objects exclusively constituted by Archaea and BSR. The latter was obtained by filtering all Bacteria with Family or Genus names containing “desulf” or “Desulf”. We used the literature to exclude bacteria *Lawsonia*, *Bilophila* (*Desulfovibrionaceae*) and *Malonomonas* (*Desulfuromonadaceae*) that were non SRB (Kolb *et al.*, 1998; Schoenborn *et al.*, 2001; Laue *et al.*, 2001). Second, we predicted from the original phyloseq object the genes associated with sulfate-reducing and methanogenesis metabolisms using the bioinformatic tools Tax4Fun2 v.1.1.5 (Wemheuer *et al.*, 2020) with a clustering threshold set at 99%. The predicting functional profiles were then proceeded using the blast identity to reference at 90%. To target these specific pathways, we targeted all genes which contained “methyl-coenzyme M reductase” for the methanogenesis and “dissimilatory” or “adenylylsulfate” for the sulfate-reduction. Finally, we created two new functional phyloseq objects.

We analyzed the distribution of the methanogens and BSR and their associated predicted metabolisms, between types of samples (*i.e.* gut fish, seawater, sediment and algae) and among fish diet and fish phylogeny. The significance of the contribution was calculated with the Kruskal-Wallis (KW) test (999 permutations) from the R package *vegan* v2.5.7 (Oksanen *et al.*, 2019). To understand the distribution of the archaea and BSR, we calculated the Bray-Curtis distance between all pairs of samples using the package *vegan*. We tested the role of the diet and of the host family level using PERMANOVA (999 permutations) computed on this dissimilarity matrix with the function *adonis()* from the R package *vegan*.

4) Direct gas production associated with fish

Using a beach seine, we sampled in May 2019, in the Mediterranean Sea at Palavas-les-Flots (France ; 43° 31' N, 3° 54' E), 57 herbivorous juveniles of *Sarpa salpa* and *Sardina pilchardus* which had all full stomachs. Because stress input during fish sampling may provoke a gas production bias, fish were acclimated in a black container for 25 min. Three hermetic zip bags (8 L volume) filled with 3L of filtered *in situ* seawater were used for the fish incubation and 2 hermetic zip bags were used without the addition of fish as control. The bags were incubated for 1 hour in the sea to preserve the natural seawater temperature (15°C). Headspace and seawater of zip bags were retrieved in duplicate after the incubation using syringes connected with dried Vacutainer™ (Becton Dickinson and Co, Franklin Lakes, NJ) of 9 mL. Samples were conserved at 4°C until the detection with an Agilent™ 7890a (Agilent, Santa-Clara, CA, USA) gas chromatography system using a flame ionization detector (GC-FID).

Results and discussion

Rarity of archaea in prokaryotic 16S rRNA sequences

Gut archaeome of fish is known to be hardly detectable (Fidopiastis *et al.*, 2006; Smriga *et al.*, 2010; Kormas *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2014) or constitutes a very tiny component of the global microbiome (<1%)(Ni *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2021) (**Table 2**).

Diverse bacteria 16S rRNA genes were detected in our study by using universal primers and they made 99.92 % of the sequences while Archaea and Eukarya represented 0.08 % (**Figure 1**). Among the 15 666 ASVs, Archaea were represented by only 21 ASVs . Among them *Nitrosopumilales* and *Nitrosphaerales* (*Thaumarchaeota*) jointly represented 71% of the archaeal sequences (**Figure 1**). *Thaumarchaeota* are nitrifying Archaea which may be strongly influenced by the nitrogenous content of the food intake, notably through the consumption of invertebrates which are known to harbor gut-inhabiting *Thaumarchaeota* (Friedrich *et al.*, 2001; Bredon *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2019). This is in accordance with the results of Youngblut *et al.*, (2021) who observed that *Thaumarchaeota* exhibited host clade specificity to reptiles and bony fish (Youngblut *et al.*, 2020). In contrast, *Euryarchaeota* with *Halobacteriales*, *Methanobacteriales*, *Methanomassiliicoccales* and *Methanosarcinales* only represented 29% (**Figure 1**). As such, our results suggest that the gut archaeomes of coral reef fishes are actually poor in methanogens. This has also been described in Thomas *et al.*, 2021 who did not detect either *Methanobacteriales* nor *Methanomassiliicoccales*. Yet, other studies made on the wild marine dover sole (van der Maarel *et al.*, 1999) and in several freshwater fish species (Xia *et al.*, 2014; Youngblut *et al.*, 2020) observed contrasted results and pinpointed at the strong presence of *Euryarchaeota* with the dominances of *Methanococcales* (van der Maarel *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2014) and *Methanomicrobiales* (Ni *et al.*, 2014) suggesting that habitat and species may play a role in their presence or absence.

Table 2 : Studies which have investigated the archaeal diversity associated with fish gut. W = Wild ; C = Captive

Fish species	Diet	Habitat (Condition)	Technique	Conclusion	Ref
<i>Mugil cephalus</i>	Omnivores	Marine (W)	Fingerprinting by terminal RFLP of arch21F/arch958R PCR products (DeLong, 1992)	Detection of marine groupe II and I of which methanogenic archaea	(van der Maarel <i>et al.</i> , 1998)
<i>Platichthys flesus</i>	Invertivores	Marine (W)			
<i>Platichthys flesus</i>	Invertivores	Marine (W)	Fingerprinting by terminal RFLP of Nested PCR products arch21F/arch958R (DeLong, 1992) + S-D-Arch-0344-a-S-20/S-O-Msar-0860-a-A-21 (Raskin <i>et al.</i> , 1994)	Detection of <i>Methanococcoides</i> strains (probably a unique <i>Methanococcoides methylutens</i>)	(van der Maarel <i>et al.</i> , 1999)
<i>Sparus aurata</i>	Invertivores	Marine (C)	Pyrosequencing of PCR products arch344F/arch915R (Dowd <i>et al.</i> , 2008)	Detection of methanotrophs and methanogens in 3 fishes of 30 belonging to <i>Methanomicrobia</i>	(Kormas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Herbivores	Freshwater (W+C)	Metagenomic with HiSeq 2000 of PCR products with 357F-GC/518R (Muyzer <i>et al.</i> , 1993)	< 1% abundance of archaean phylotypes with a negative correlation with vacuity Majority of Euryarchaeota	(Ni <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lates calcarifer</i>	Piscivores	Freshwater (C)	Metagenomic with HiSeq 2000 of PCR products with S-D-Bact-0008-a-S-20 (Hicks <i>et al.</i> , 1992) / -* -Univ-1492-b-A-21 (Kane <i>et al.</i> , 1993)	3.7% and 2.3% abundances of archaean phylotypes in controlled and starved experimental fishes. Importance of <i>Methanococci</i> (<i>Euryarchaeota</i>)	(Xia <i>et al.</i> , 2014)
<i>Cyprinus carpio</i>	Omnivores	Freshwater (W)	MiSeq of PCR products with arch516F (Raymann <i>et al.</i> , 2017) /arch915R (Takai and Horikoshi, 2000)	Importance of methanogens (<i>Euryarchaeota</i>) but also non methanogens with <i>Thaumarchaeota</i> Low co-phylogeny signal but host clade specificity and markedly different from other vertebrate clades.	(Youngblut <i>et al.</i> , 2020)
<i>Carassius gibelio</i>	Detritivores	Freshwater (W)			
<i>Blicca bjoerkna</i>	Omnivores	Freshwater (W)			
<i>Abramis brama</i>	Detritivores	Freshwater (W)			
<i>Leuciscus idus</i>	Invertivores	Freshwater (W)			
<i>Leuciscus cephalus</i>	Omnivores	Freshwater (W)			
<i>Rutilus rutilus</i>	Omnivores	Freshwater (W)			
<i>Perca fluviatilis</i>	Invertivores	Freshwater (W)	MiSeq from nested PCR with 344F (Casamayor <i>et al.</i> , 2002)/1041R (Gantner <i>et al.</i> , 2021)	Low abundances of archaea and especially methanogens in contrast with other vertebrates	(Thomas <i>et al.</i> , 2021)
<i>Salmo trutta</i>	Piscivores	Freshwater (W)			
<i>Alburnus baliki</i>	Invertivores	Freshwater (W)			

<i>Squalius cephalus</i>	Omnivores	Freshwater (W)	<i>al.</i> , 2011) + 519F (Ovreås <i>et al.</i> , 1997)/915R (Stahl and Amann, 1991).	
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	Omnivores	Freshwater (W)		
<i>Lepomis gibbosus</i>	Omnivores	Freshwater (W)	qPCR with a934F (Amann <i>et al.</i> , 1995)/a1000R (Gantner <i>et al.</i> , 2011).	
<i>Ameiurus melas</i>	Invertivores	Freshwater (W)		
<i>Scarus taeniopterus</i>	Herbivores	Coral reef (W)		
<i>Holocentrus rufus</i>	Invertivores	Coral reef (W)		
<i>Tetrapturus belone</i>	Piscivores	Marine (W)		
<i>Scarus vetula</i>	Herbivores	Coral reef (W)		
<i>Sargocentron spiniferum</i>	Invertivores	Coral reef (W)		
<i>Hermosilla azura</i>	Herbivorous	Marine (W)		
<i>Chlorurus sordidus</i>	Omnivorous	Coral reef (W)	Cloning and sequencing from nested PCR products with 27F/1492R (Lane, 1991) + arch21F/arch958R (DeLong, 1992)	(Fidopiastis <i>et al.</i> , 2006)
<i>Acanthurus nigricans</i>	Herbivorous	Coral reef (W)		
<i>Lutjanus bohar</i>	Piscivorous	Coral reef (W)		

The ASVs associated with the gut are different from both the planktonic and benthic ones (**Figure 2**) (PERMANOVA: $R^2 = 0.20$; $p = 0.001$). Therefore, it is likely rare sequences might have evolved with the gut of reef fish and are not just transient. Even if our results should be taken carefully because of the weak archaeal sampling depth, we found that host family level influences the archaeome structure ($R^2 = 0.29$; $p = 0.001$) which was also observed in the gut bacteriome of reef fish (Cheutin *et al.*, 2021). However, we did not detect any influence of the diet ($R^2 = 0.06$; $p = 0.29$) which is in accordance with the findings of other vertebrates where diet was less consistently significant in the archaeal structure in contrast to the strong influence of the diet in the Bacteria-biased survey of the same sample dataset (Cheutin *et al.*, 2021). Such findings may be due to the fact that Archaea are often second fermenters and depend more on the bacterial fermentation products than on the substrate providing from the diet (Borrel *et al.*, 2020).

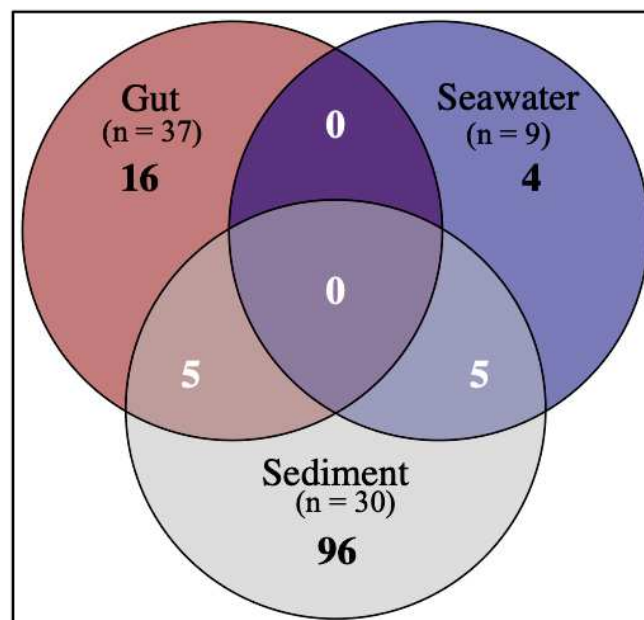


Figure 2 : Venn diagram representing the number of archaeal ASVs specific to and shared between gut microbiomes of reef fishes (19 species), sediment and seawater.

Rarity of methanogens with 16S rRNA archaea and mcrA targeted-genes

None of the 13 couples of specific primers of methanogenesis (**Table 1**) yielded amplification with PCR or qPCR. Regarding the low success of previous studies (**Table 2**), the complexity of the sample matrix likely does not allow the PCR amplification with Archaea primers (*e.g.* PCR inhibitors coupled with the stronger bacterial abundance). In addition, a tiny signal (<100 copies/ μ L) was obtained concerning the qPCR using *mcrA* gene targeted primers, reinforcing the idea that methanogens are present in a trace abundance. Indeed, we only obtained a tiny signal for 7.8% of the samples of which *Siganidae* had the best amplification success rate with 36% followed by 33% in *Ostraciidae*, 17% in *Lethrinidae*, 16% in *Holocentridae* and 15% in *Serranidae* (**Figure 3**). While vertebrate herbivores are known to be richer in methanogens than omnivores than carnivores (St-Pierre and Wright, 2013; Youngblut *et al.*, 2020), this is seemingly different for fish with the presence of methanogens in trace concentrations or even absent whatever the diet (**Figure 3**). A study comparing gut microbiomes of terrestrial and marine herbivorous iguanas reported similar results (Hong *et al.*, 2011). While terrestrial iguanas were rich in methanogens, no archaeal population was detected in the gut of the marine iguanas, probably due to the host species and its dietary difference based on macroalgae. In addition, it is notable that most of the studies that detected archaea in fish gut investigated carnivores or omnivores species from captivity and fed with standardized food. In contrast, studies on wild herbivores such as the *Kyphosus aureus* (Fidopiastis *et al.*, 2006), *Chlorurus sordidus* or *Acanthurus nigricans* (Smriga *et al.*, 2010) described a general absence of Archaea (**Table 2**). Nevertheless, this observation might overall be due to a higher investigation effort in captive fishes than in the wild (Romero *et al.*, 2014).

Even though methanogens might be present in marine fishes, their contribution to methane emission is likely negligible in contrast to their terrestrial counterparts. Our predicted profile using Tax4Fun2 on the prokaryotic 16S rRNA gene goes together with the low

309 methanogen groups found in the microbiome (**Figure 1 ; Figure 4**). Also, we did not obtain
310 any signal of methane emission from the gas chromatography experiment during the incubation
311 of fish *in vivo*. Further, this experiment was made on wild juvenile fish and might be renewed
312 with bigger fish for a longer incubation period with standardized feeding sources. A study
313 demonstrated a negative correlation between the archaeal abundance and the gut vacuity after
314 a fasting period (Xia *et al.*, 2014). Such a parameter might be difficult to control in wild fish
315 which may keep a long time period of fasting with higher vacuity rates than captive fishes
316 (Arechavala-Lopez *et al.*, 2011). In addition, the species used for the incubation is likely to
317 influence the results. The study of Oremland *et al.*, 1979 (Oremland, 1979) indicated for the
318 first time a methanogenic activity *in situ* in the dover sole (*Microstomus pacificus*) and in the
319 black cod (*Anoplopoma fimbria*) while the rose fish (*Sebastes norvegicus*) had not, suggesting
320 that the model used for the experiment might explain a detection success or not.

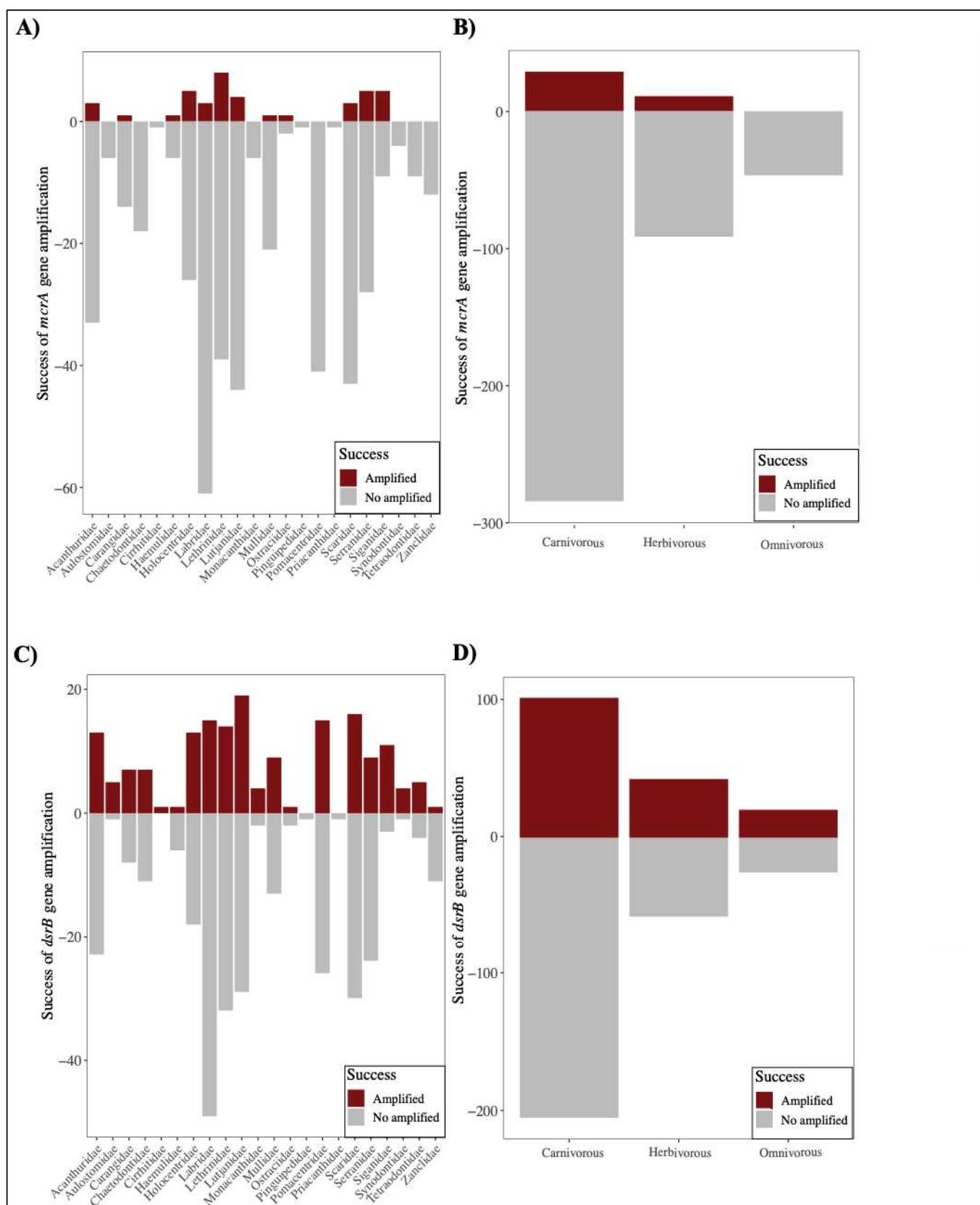


Figure 3 : Amplification success of the *mcrA* and *dsrB* genes. Number of samples which had amplified (in red) or not (grey) are represented across fish families (A ; C) and trophic guilds (B ; D).

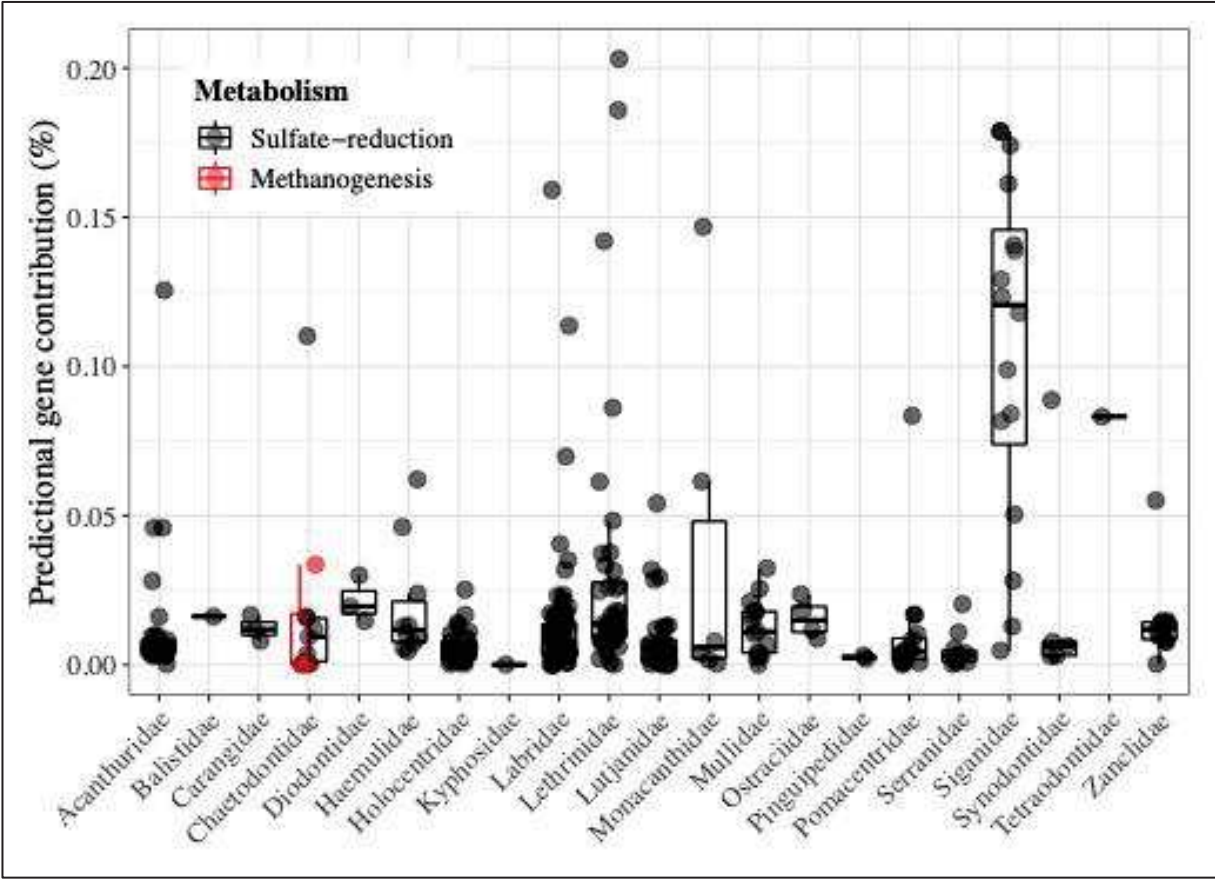


Figure 4 : Relative contribution of predictional genes associated to sulfate-reduction (in gray) and to methanogenesis (in red) between fish families. Sulfate-reduction enzymes were predicted with the four genes coding for the adenylylsulfate reductase, subunit A and B [EC : 1.8.99.2] and the sulfite reductase dissimilatory-type, subunit A and B [EC: 1.8.99.3]. Methanogenesis enzymes were predicted with the five genes coding for the methyl coenzyme reductase, subunit A,B and G [EC: 2.8.4.1].

Sulfate-reduction as an alternative pathway

The amplification of the prokaryotic 16S rRNA gene revealed that sulfate-reducing bacteria (SRB) (411 ASVs) constituted 3.12% of the gut microbiome and were significantly more represented in the gut than in environmental samples (KW = 59.7 ; $p = 0.001$). This is particularly true regarding certain families such as *Siganidae* and *Zanclidae* where relative abundances of SRB were significantly higher than in other families (KW = 83.20 ; $p = 0.001$) (Figure 5).

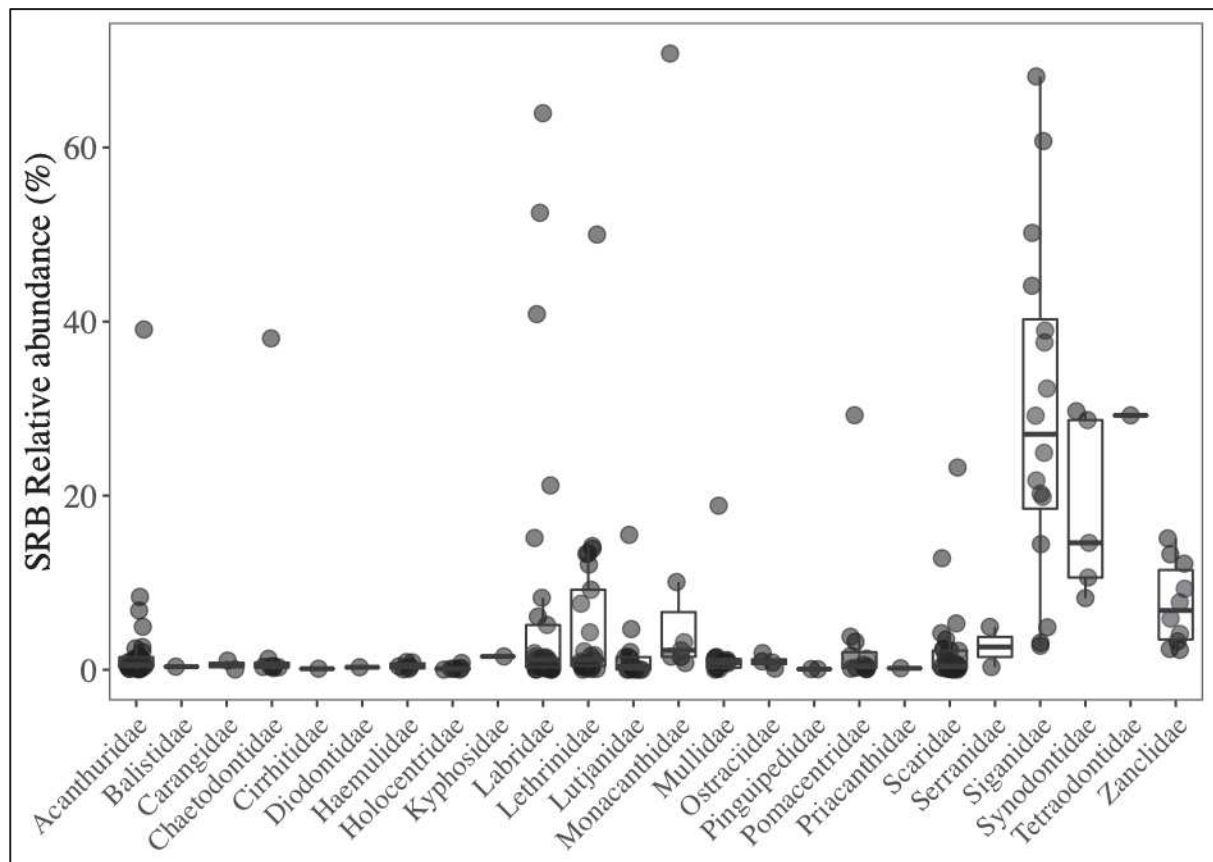


Figure 5 : Relative abundances of sulfate-reducing bacteria in the gut microbiome of fish families. ASVs were assessed with universal-targeted 16S rRNA gene primers.

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

The SRB associated with the gut were mainly constituted by *Deltaproteobacteria* of which 77% were *Desulfovibrionales* (with a dominance of *Desulfovibrio* spp.) and 20% of *Desulfobacterales*. *Desulfovibrio* spp. are widespread anaerobic SRB characterized by the ability to reduce sulfate to hydrogen sulfide (Gibson *et al.*, 1988; Liamleam and Annachhatre, 2007). They have been described in a broad range of gut animals such as humans (Chen *et al.*, 2021), colobine (Amato *et al.*, 2016), mouse (Deplancke *et al.*, 2000) and even termites (Brune and Friedrich, 2000). Our results are in accordance with previous studies which described *Desulfovibrio* spp. to be one of the most dominant Genus in herbivorous reef fishes such as *Siganidae*, *Acanthuridae*, *Scaridae* and *Kyphosidae* (Fidopiastis *et al.*, 2006; Sullam *et al.*, 2012; Miyake *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Cheutin *et al.*, 2021). A recent study revealed

that *Desulfovibrionaceae* were detected as a biomarker in omnivorous coral fish, suggesting that this family, and particularly *Desulfovibrio* spp. evolved within gut animals since a long time period and might play a role in the degradation of complex molecules (Cheutin *et al.*, 2021). The detection of SRB goes together with the predictive profile of sulfate-reduction obtained with the Tax4Fun2 algorithm on the prokaryotic 16S rRNA amplicon sequences (**Figure 4**). The predicted genes associated with sulfate-reduction enzymes (*i.e.* adenylylsulfate reductase, subunits A and B [EC : 1.8.99.2] and the sulfite reductase dissimilatory-type, subunits A and B [EC: 1.8.99.3]) mainly contributed to $0.02 \pm 0.03\%$ of predicted gut microbial functions. Members of *Siganidae* presented the highest relative contributions of sulfate-reduction with a mean of $0.11 \pm 0.05\%$. The relative contribution of sulfate-reduction associated functions did not significantly differ between diets (KW = 5.57 ; $p = 0.06$). Interestingly, some samples from *Lethrinidae* and *Labridae* exhibited high values of contribution $> 0.14\%$, suggesting that this metabolism could might also occur within carnivores (**Figure 4**).

In addition, the qPCR amplification of the *dsrB* gene had 37% of success with 11 of 14 samples (79%) of *Siganidae* (**Figure 3.C**), reinforcing our previous results concerning the strong association of SRB with *Siganidae*. In addition, the success of the *dsrB* gene amplification was also high concerning the invertivores *Aulostomidae* (81% success), *Synodontidae* (80% success) and *Monacanthidae* (67% success) (**Figure 3.D**). While the amplification success was not pervasive, these results provide further information concerning the ubiquitous presence of SRB in coral reef fish gut in a broad range of families (**Figure 3.C**) and in all trophic guilds (**Figure 3.D**). However, we cannot be sure that these amplifications are not due to transient SRB issued from contaminant DNA provided by digested prey or algae which were rich in SRB. Indeed, the signal was scarce and indicated that concentrations did not exceed 1 000 copies/ μ L in all samples. Further questions result about the final product of

the sulfate-reduction in fish and its role in biogeochemical cycles in sea such as their production of H₂S.

Conclusion

In contrast to other vertebrates, marine fishes host no lineage of methanogens in their gut. Further, it is noteworthy that carbon energy provided from nutritional sources is metabolized by the microbiome and transformed into a product differing from methane. Further analyses might give support to the sulfate-reduction metabolism as major competitor against methanogenesis in marine fish making them a considerable methane-free source of proteins for human populations. Such a result is quite comforting with the increasing tropicalization of the seas by the herbivores and the increasing amount of fish farming.

Acknowledgements

This project was funded by a grant from the CNRS INSU EC2CO “Microbien” program project BIOMEVO, a grant from the CNRS international emerging actions (IEA) program project FISHμBIOM, the Royal Society and an ERC grant (759457) to Lancaster University and from the Explorations de Monaco program project Megafauna.

Marie Charlotte Cheutin was supported by a Ph.D grand from the French Ministry of Higher Education and Research.

A research permit was issued by Seychelles Bureau of Standards (n° FST18132), the *Terres Antarctiques et Australes Françaises* (TAAF) (decree 2019-45 of the 1st april, 2019) and the Martinique government services (decision n°122). We thank the Seychelles Fishing Authority research team, the crew of the R/V Marion Dufresne II for logistical support, assistance in the field and with sample preparation (Andrew Souffre, Rodney Melanie, Achille Pascal, Marie-Corinne Balett, Stephanie Marie, Clara Belmont). We are grateful to three trap fishers who provided boat time and fisheries expertise, and assisted with sample collection.

We are grateful to the genotoul sequencing platform in Toulouse (Occitanie, France), for providing the MiSeq Illumina sequencing.

397

398 **Author contributions**

399 JCA, MCC, TB and SV conceived the study. MCC, JB, ER extracted the DNA and
400 prepared the DNA for sequencing. MCC and MD made the gas measure experiment. MCC, JB,
401 ER analyzed the data. MCC and SV wrote the first draft of the manuscript. All authors reviewed
402 the manuscript and contributed to the final version.

4. Déterminants biotiques

4. I – Effet de la phylogénie : Manuscrit C

Les études réalisées sur les microbiomes entériques des poissons indiquent que la phylogénie est l'un des plus important déterminant de la variabilité des communautés microbiennes (Sullam *et al.*, 2012). C'est également le cas chez les poissons coralliens (Smriga *et al.*, 2010 ; Scott *et al.*, 2020 ; Pratte *et al.*, 2018) mais aucune étude n'a étudié les règles d'assemblages qui régissent ces communautés, à l'exception de Chiarello *et al.*, (2018) qui ont détecté un léger signal de phylosymbiose des communautés microbiennes cutanées des poissons coralliens. Ceci-dit, les études de Miyake *et al.*, (2015) et Scott *et al.*, (2020) ont trouvé une relation significative entre la phylogénie des poissons chirurgiens et les similarités de leurs microbiomes entériques. Un fort signal de co-évolution a également été noté entre la bactérie géante *Epulopiscium* et les poissons chirurgiens (Ngugi *et al.*, 2017). A notre connaissance, deux seules études ont analysé la phylosymbiose chez les microbiomes entériques des poissons marins et ont finalement conclu que celles-ci étaient plutôt régies par des règles stochastiques. Toutefois, peu d'espèces ont été analysées (Givens *et al.*, 2015) avec une histoire évolutive récente (*i.e.* les espèces appartiennent à la même famille) (Escalas *et al.*, 2020). Pourtant, les poissons, ont l'une des histoires évolutives les plus fructueuse du règne animal avec > 6 000 espèces de poissons corallien aujourd'hui décrite (Kulbicki *et al.*, 2013). Leur diversité les rend alors comme parfaits candidats pour étudier les règles d'assemblages qui structurent leurs microbiomes entériques.

4. II – Effet du régime alimentaire : Manuscrit D

La grande richesse de traits écologiques des poissons coralliens les caractérise comme des systèmes holobiontes divers renfermant une importante diversité microbienne associée à des fonctions essentielles pour leurs hôtes mais également pour l'écosystème (Troussellier *et al.*, 2017). Pourtant seule une fraction d'espèce a été étudiée, la plupart herbivores et corallivores, afin de pouvoir associer le rôle du microbiome dans des processus écologiques d'intérêt comme le contrôle du développement des macroalgues (Scott *et al.*, 2020) où leur rôle comme vecteur de microorganismes dans les récifs (Ezzat *et al.*, 2020 ; Grupstra *et al.*, 2021 ; Nicolet *et al.*, 2018). Les carnivores jouent également un rôle crucial dans les dynamiques de

populations récifales et peuvent être bénéfiques aux récifs en contrôlant les espèces invasives (Cowan *et al.*, 2020 ; Kroon *et al.*, 2020). Par ailleurs, ils représentent un enjeu considérable pour les pêcheries artisanales et peuvent atteindre des biomasses $> 200\text{g/m}^2$ (Kulbicki *et al.*, 2008). La grande diversité de stratégies alimentaires regroupée au sein des carnivores laisse donc supposer une grande variabilité des microbiomes, à la composition bien distincte des herbivores (Clements *et al.*, 2007 ; Egerton *et al.*, 2018), aux fonctions associées très spécifiques qui restent à décrire.

Objectifs du chapitre et principaux résultats

Les objectifs de ce chapitre visent à **comprendre les déterminants relatifs à l'hôte sur les assemblages entériques microbiens des poissons récifaux.**

De ce fait, j'ai donc analysé dans un premier temps :

- i) *Quel est l'effet de la phylogénie sur les patrons structuraux du microbiome entérique ?*

Puis dans un deuxième temps, j'ai regardé :

- ii) *Quel est l'effet du régime alimentaire sur la structure taxonomique et fonctionnelle du microbiome entérique ?*

Pour répondre à ces questions, j'ai étudié dans un premier temps les règles d'assemblages des communautés bactériennes en les comparant avec la phylogénie de leurs hôtes pour déterminer si deux espèces proches partageaient des microbiomes plus similaires que des espèces éloignées. Pour ce faire, j'ai donc analysé à la fois les corrélations entre les temps de divergence des hôtes avec la similarité des microbiomes et ai comparé la topologie de l'arbre phylogénétique des hôtes avec la topologie des similarités bactériennes.

Dans un deuxième temps, j'ai établi l'inventaire taxonomique et fonctionnel des bactériomes entériques, en ciblant particulièrement les carnivores. J'ai pu par la suite comparer les fonctions prédites associées aux microbiomes grâce à l'algorithme Tax4Fun2, en fonction des différentes stratégies alimentaires afin de déterminer des fonctions essentielles liées à la nutrition, comme c'est le cas chez les carnivores terrestres (Zhu *et al.*, 2018).

Les résultats principaux de ce chapitre démontrent qu'il existe bel et bien une relation de phylosymbiose entre les poissons coralliens et leur bactériome entérique, aussi forte que celle retrouvée chez les mammifères (Song *et al.*, 2020 ; Ley *et al.*, 2008). Ce signal est d'autant plus fort chez les herbivores mais se perd à l'échelle de la famille. De nombreux taxa bactériens sont également conservés au sein des différentes espèces et suivent des assemblages phylosymbiotiques avec certaine guildes trophiques (*i.e.* carnivore et herbivore) suggérant une interaction de longue date avec un rôle potentiel dans les processus de digestion.

L'influence du régime alimentaire est secondaire mais il n'en reste pas moins un déterminant structurel fort des bactériomes entériques et des fonctions associées. Une distinction nette est observable entre les carnivores et les herbivores. Ceci dit, bien que les carnivores aient une plus grande diversité de stratégies alimentaires, la variabilité de son microbiome n'en n'est pas plus riche ni variée contrairement aux herbivores. Alors que nous pensions avoir des fonctions digestives spécifiques à chaque régime, peu étaient significativement associées aux carnivores, suggérant que leur digestion ne soit pas dépendante des activités métaboliques de leur bactériome entérique.

Manuscrit C

Gut bacteriome of coral reef fishes follows phylosymbiotic patterns

Authors : Marie-Charlotte Cheutin¹, Sébastien Villéger¹, Christina C. Hicks², James P. W. Robinson², Nicholas A. J. Graham², Clémence Marconnet¹, Claudia Ximena Ortiz Restrepo¹, Jean-Baptiste Juhel¹, Eva Maire², Elliott Sucre³, Virginie Marques¹, Cassandra Benkwitt², Rachel L. Gunn², Eilish Richards⁴, Camille Albouy⁵, Marc Trousselier¹, Giulia Donati⁴, Loïc Pelissier⁴, David Mouillot¹, Tony Dejean, Thierry Bouvier⁶, Jean-Christophe Auguet¹

¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, 34095 Montpellier, France

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

³ Centre Universitaire de Mayotte, Route Nationale 3, BP53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

⁴ ETH, Universität Zürich, 8092 Zürich, Switzerland

⁵ IFREMER, Unité Ecologie et Modèles pour l'Halieutique, EMH, Nantes Cedex 3, France

⁶ SPYGEN, 73370 Le Bourget-du-Lac, France

Keywords: Gut bacteriome, coral fish, phylosymbiosis, conserved clades

Des informations supplémentaires complètent ce manuscrit en Annexe 8.III.C

Les fichiers supplémentaires sont disponibles sur ce lien

Abstract

Our understanding of the mechanisms explaining community assembly of fish gut bacteriome over evolution is not well understood. This is particularly true for coral reef fishes that play a pivotal role in the functioning of coral habitats. Using 16S rDNA metabarcoding, we unraveled the mechanisms underlying the biodiversity of the gut bacteriome of 378 individual belonging to 101 coral reef fish species and spanning more than 150 million years of diversification. Our findings provide the most conclusive evidence to date that phylosymbiosis has occurred between coral fishes and their gut bacterial symbionts. The strength of the signal was higher for herbivorous fishes (Mantel r test = 0.68 ; $p < 0.001$) than for carnivorous ($r = 0.29$; $p < 0.01$) or omnivorous fishes ($r = -0.27$; $p > 0.05$). Despite the high intraspecific variability, we show that this pattern is primarily related to the modulation of gut bacteriome diversity and composition by host evolutionary history and diet. Although intimately entangled, both driving forces acted at different host evolutionary scale. While fish phylogeny seems to predict the presence of recently acquired bacterial clades, diet determined the horizontal acquisition of functional guilds in the early stages of fish evolution. Only two conserved clades affiliated to *Epulopiscium* and *Blastopirellula* displayed a significant phylogenetic signal for the entire fish dataset after first accounting for diet. It remains to be seen which processes (co-evolution, co-speciation, ecological filtering) linked the evolution of these two clades to coral fishes.

Introduction

Host-associated microbes are incontestably considered to be a major component of the host system, by establishing holobiont units (Theis *et al.*, 2016; Carthey *et al.*, 2019). Their crucial role in vital host functions such as host nutrition metabolism (Clements *et al.*, 2009; Flint *et al.*, 2012; Miyake *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018), development (Martin *et al.*, 2010; Sampson and Mazmanian, 2015; Burns *et al.*, 2016) or behavior regulator (Sampson and Mazmanian, 2015; Reber *et al.*, 2016) has been largely demonstrated through the animal and plant reigns. The interest for their evolution and the processes that lead to their assembly has been increasingly growing these two last decades. Holistic approaches have been used to identify ecological and host drivers (Ley *et al.*, 2008b; Bletz *et al.*, 2017) in order to provide the evolutionary pattern and mechanisms underlying the establishment of the host-symbiont associations (Lim and Bordenstein, 2020). Numbers of studies have demonstrated that microbial community structure is strongly influenced by the evolutionary history of the host, resulting in more divergent microbiota with increased interspecific phylogenetic distance (Brooks *et al.*, 2016; Mazel *et al.*, 2018).

This phenomenon, known as phylosymbiosis, may arise from stochastic events such as dispersal fluctuations in microbial communities (Erlandson *et al.*, 2018; Grieneisen *et al.*, 2019) or host shifts in geographical range (Moeller *et al.*, 2017). Parallely, deterministic evolution resulting from phylogenetically related host trait influences (Brooks *et al.*, 2016; Mazel *et al.*, 2018) and ecological filters with niche variation across host lineages (*e.g.* diet, habitat) are also intimately associated with phylosymbiotic mechanisms (Mazel *et al.*, 2018). For example, mammals dietary traits go hand in hand with several physiological (pH, oxidative state) or anatomical (shape of the gut) adaptations which select microbial combinations in a long evolutionary process (Groussin *et al.*, 2017; Youngblut *et al.*, 2019). Widespread evidence of phylosymbiotic has been shown in microbiomes from a large range of host from vertebrates

(e.g. mammals, apes, humans, American pikas, *Peromyscus* deer mice) to invertebrates (e.g. ants, bees, sponges) (Easson and Thacker, 2014; Sanders *et al.*, 2014; Groussin *et al.*, 2017; Kwong *et al.*, 2017; Kohl *et al.*, 2018; Ross *et al.*, 2019). This pattern does not appear as a universal pattern though (Lim and Bordenstein, 2020) and particularly for external associated-microbes (Bletz *et al.*, 2017; Chiarello *et al.*, 2018; Mazel *et al.*, 2018; Pollock *et al.*, 2018; Trevelline *et al.*, 2020).

To the best of our knowledge, the analysis of phyllosymbiosis patterns in teleosts has received very little attention although fishes represent the most diverse and oldest group of vertebrates. Weak to no phyllosymbiosis signal has been found in skin microbial communities associated with teleosts (Chiarello *et al.*, 2018; Doane *et al.*, 2020). Without mentioning the term of phyllosymbiosis, Miyake *et al.* (2015) and Scott *et al.* (Scott *et al.*, 2020) found a significant relation between surgeonfish phylogeny and gut microbiome dissimilarities. Recently, a study by Ngugi *et al.* (2017) points to a strong signal of host-microbiome coevolution between surgeonfishes and their *Epulopiscium* gut symbionts. However, these studies have focused on a narrow section of the fish phylogeny, and no global assessment of phyllosymbiosis between fishes and their gut symbionts has been performed to date.

Coral reef fishes play a considerable role for ecosystem functioning with more than 6000 species described (Bellwood *et al.*, 2004; Kulbicki *et al.*, 2013) distributed in all tropical seas (Cowman and Bellwood, 2013; Quimbayo *et al.*, 2019), carrying a high diversity of biological traits (Mouillot *et al.*, 2014). Although modulation of the fish gut microbiome has been associated to many environmental and host factors (Clements *et al.*, 2014; Egerton *et al.*, 2018), species identity and diet appear to be the consistent dominant drivers (Miyake *et al.*, 2015; Pratte *et al.*, 2018; Scott *et al.*, 2020; Polanco Fernández *et al.*, 2021). Despite a large intraspecific variability, the gut microbiomes of 5 coral herbivorous species were shown to be

highly species specific and constituted by environmental generalists, animal associates and fish specialists (Scott *et al.*, 2020). Much more work has been done to infer the relation between reef fish microbiome and nutritional ecology (Ngugi *et al.*, 2017), gut anatomy (Escalas *et al.*, 2021) or fish diet (Miyake *et al.*, 2015; Pratte *et al.*, 2018; Scott *et al.*, 2020; Cheutin *et al.*, 2021). However, the magnitude to which these two drivers interact to modulate the coral fish gut microbiome remains unknown.

In this study, we aim to disentangle the individual contributions of host evolutionary history and diet strategies that regulate the enteric core microbiome of coral reef fishes. Using a metabarcoding 16S rDNA approach with universal primers, we first aim to describe the microbial inventory of a hundred species providing from the Indian Ocean and the Caribbean Sea. Then, we assessed the determinants of the microbial diversity and their structure through reef fish phylogeny, investigating phylosymbiosis signal at several host and microbial levels. In order to target phylosymbiotic clades, we investigated through a ClaaTU approach, the taxa determinant and cladal taxonomic units, conserved through reef fish species and tested their phylosymbiosis within reef fish communities.

Materials & Methods

1) Sampling area

The study focuses on four regions surrounded by coral reefs, of which three located in the Western Indian Ocean (WIO), Europa (- 22° 20' S , 40° 22' E), Juan de Nova (- 17° 03' S, 42° 43' E) and the archipelago of Seychelles (- 4°41' S , 55° 26' E) ; and one located in Caribbean Sea, the Martinique island (14° 38' N , - 61° 01' W). The Scattered Islands are included in the *Terres Australes et Antarctiques Françaises* (TAAF) administration, and are permanently under the only human presence and protection of the French military. These islands constitute small and flat carbonate platforms isolated in the Mozambique channel at the large of Madagascar. The archipelago of Seychelles is located on the north-eastern Madagascar and grouped 44 islands. The two biggest granitic islands, Praslin and Mahe were sampled for this study. These islands have already been the object of an investigation in Cheutin et al., (2021) and were thus considered as a unique region in this study. The volcanic island of Martinique represents in our study the only region located in Caribbean Sea. As for the Seychelles islands, the coral reefs of Martinique constitute a substantial economic value in ecosystem services for the local population through fishery and tourism activities, but also in coastal protection against storms and waves (Failler *et al.*, 2010).

2) Sample collection

Sampling collection was performed in 2017 for Martinique and 2019 for the regions of the WIO. Fish samples were collected using hand lines, traps, underwater nets and were fished by harpoon. Because ontogeny may influence the gut microbiome of coral reef fishes (Parris *et al.*, 2016), only adult individuals were targeted. Immediately after capture, fishes were killed by cervical dislocation (following the European directive 2010/63/UE) and conserved on ice

in coolers for dissection in the laboratory later on the same day. At the laboratory, fishes were placed in trays washed with 70% ethanol and the whole intestinal tract of each fish was extracted using sterile dissection tools following the protocol of Clements et al., (2007) and Miyake et al., (2015). Gut contents were immediately stored at -80°C until DNA extractions. A total of 378 fishes belonging to 101 species covering 54 genera and 25 families were sampled for their gut bacteriome (**Figure 1**). Host taxonomic identification was proceeded using the reference book on reef fishes from the West Indian Sea (Taquet and Delinguer, 2007) and from the Florida-Caribbean-Bahamas (Humann and DeLoach, 2014). The intra-dietary levels were described using categories as in Mouillot et al., (2014). On one hand, carnivores were declined in mobile invertivores (MI) with fish eating mobile invertebrates (*e.g.* crustaceans, gastropods), sessile invertivores (SI) eating sessile invertebrates (*e.g.* coral, sponges, tunicates, worms), planktivores (PK) and piscivorous fish (FC). On the other hand, herbivores were divided into strict herbivores (H) eating macrophytes (*e.g.* seaweeds, turf) and detritivores (HD) which bite dead pieces of coral and detritus. Finally, omnivorous fishes (OM) which feed on both algae and invertebrates were also described. The phylogeny of coral reef fish species was extracted from a published time-calibrated phylogeny covering all Actinopterygian orders (Rabosky *et al.*, 2018). Subsequent inputs have been made for 7 species (*Carangoides plagiotaenia*, *Epinephelus spilotocep*, *Lethrinus enigmaticus*, *L. variegatus*, *Myripristis adusta*, *Scarus caudofasciatus*, *S. falcipinnis*, *S. sordidus*) which lacked from the original database by referring to the TimeTree database references (Kumar *et al.*, 2017). Species were thus manually added to the phylogenetic tree using the TreeGraph 2 graphical editor (Stöver and Müller, 2010). The host phylogenetic affiliation, their associated categories and ocean origin were drawn and visualized using the interactive Tree of Life (iTOL) web server (Letunic and Bork, 2016).

3) DNA extraction and 16S rDNA gene amplification

Total genomic DNA from 200 mg of homogenized intestinal contents was extracted using the MagAttract PowerSoil ® DNA kit according to the manufacturer instructions (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) with automated processing and liquid handling system (Thermo Scientific KingFisher Flex TM). Nucleic acids were eluted in molecular water (Merck Millipore TM) and quantified on a Thermo Scientific NanoDrop 8000 TM spectrophotometer. The V4-V5 region of the 16S rDNA gene was targeted with the universal primers 515F-Y(5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (Parada *et al.*, 2016) coupled with platform specific Illumina adaptor sequences on the 5' ends. Each 25µL PCR reaction was prepared with 12.5µL Taq Polymerase (Phusion ® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer), 0.5µL forward primer (10µM), 0.5µL reverse primer (10µM), 1µL template DNA, 0.75µL DMSO, and 9.75µL molecular water. PCR amplifications involved the following protocol: an initial 98°C denaturing step for 30 sec following by 35 cycles amplification (10 sec denaturation at 98°C; 1 min at 60°C annealing; 1.5 min extension at 72°C), and a final extension of 10 min at 72°C. Amplification and primer specificity were verified by electrophoresis on a 2.0% agarose gel for confirmation of ~450 bp amplicon size. All samples were amplified in triplicate and equally pooled for a final product of 50 µL. Each amplicon pool was sequenced using the 2x250bp Miseq chemistry on an Illumina MiSeq sequencing platform at the INRA GeT-PlaGE platform (Toulouse, France).

5) Sequence processing

All analyses were carried out with R software 4.0.2 (R Core Team, 2020) and are available on GitHub: <https://github.com/mccheutin/Phylosymbiosis>. Sequence reads were processed using the DADA2 pipeline (v1.12.1) in R (Callahan *et al.*, 2016). Briefly, sequences were trimmed and filtered based on reads quality profiles (maxN =

0 ; maxEE = (2 , 2) ; truncQ = 2 ; and truncLen = (240 , 240)), error correct, dereplicated and Amplicon Sequence Variants (ASVs) were inferred (Glassman and Martiny, 2018). Forward and reverse ASVs were merged and pooled in a count table where chimeras were identified and removed. Taxonomy assignment was performed using the SILVA reference database (release 132) (Quast *et al.*, 2013). The ASV's count table, their taxonomy and their sequences were organized in a phyloseq object using the phyloseq package (version 1.28.0) (McMurdie and Holmes, 2013). After removing the organites and the eukarya sequences from the phyloseq object, we obtained a final dataset constituted by 5 614 276 sequences (15 246 ASVs) ranging from 478 to 38 540 sequences by sample.

6) Identifying the core bacteriome of coral reef fishes

In order to consider the taxa which may have evolved in close association with their hosts for a long time period (Berg, 1996; Martinson *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2013), we distinguished the permanent versus transient bacterial inhabitants by examining the species abundance distribution (SAD) patterns of each ASV and by partitioning the SAD into core and satellite ASVs (Magurran and Henderson, 2003). For this purpose, the index of dispersion for each ASV was calculated as the ratio of the variance to the mean abundance (VMR) multiplied by the occurrence. The ASVs were considered as 'core' if their indices followed a Poisson distribution (*i.e.*, stochastic distribution), falling between the 2.5 and 97.5% confidence interval of the χ^2 distribution (Krebs, 1999). A total of 2 080 bacterial ASVs representing 86.1 % of the total reads constituted the core bacteriome of the 378 gut samples belonging to 101 coral reef fish species (**Figure 1 ; Supplemental Figure 1**). All subsequent analyses detailed below were performed on this core microbiome.

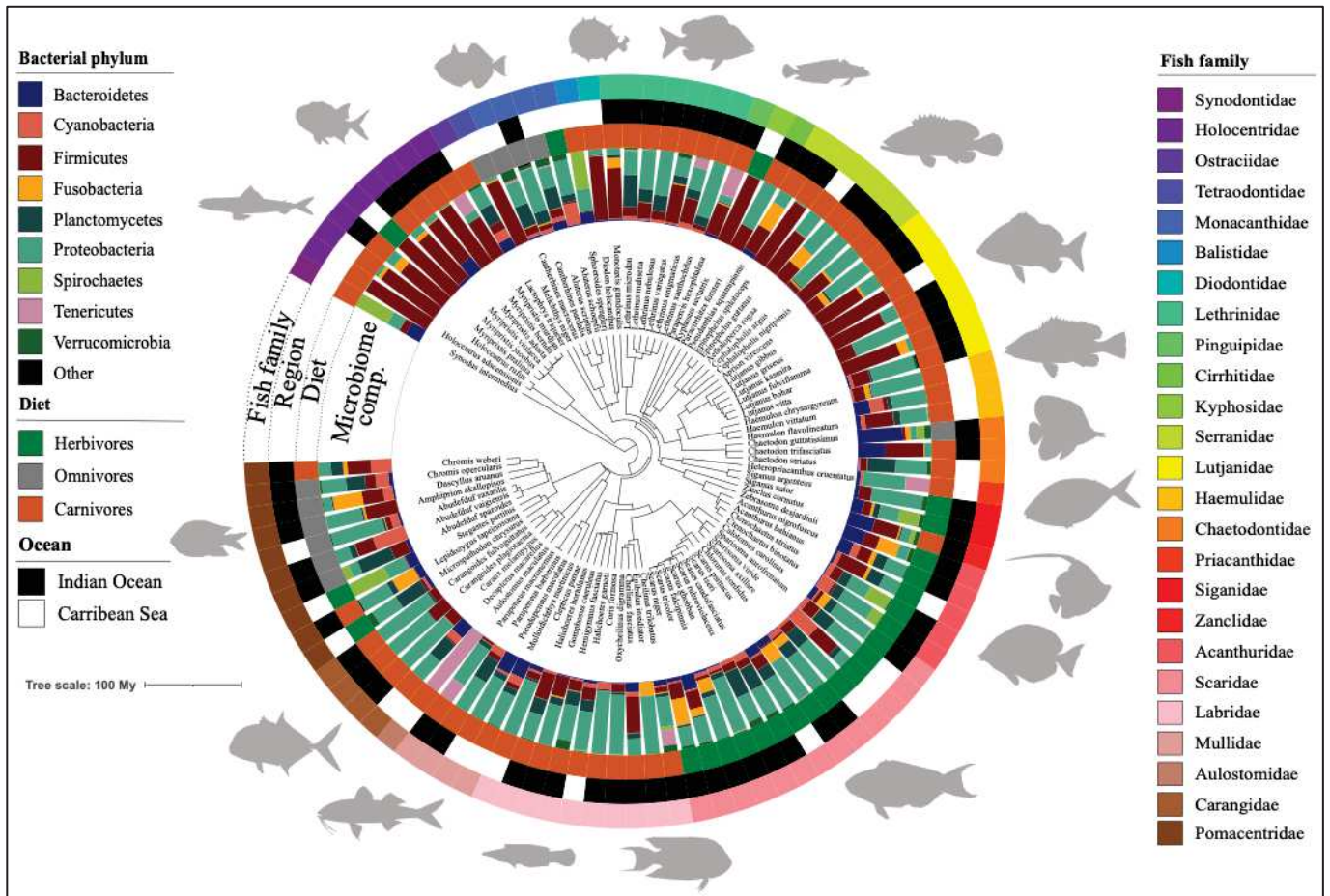


Figure 1 : Fish phylogenetic tree with respective core bacteriome and followed by fish metadata. The dated fish phylogeny was obtained from Rabosky *et al.* (2018). From inner to outer, the data mapped onto the tree is the relative abundances of microbial phyla in each host (relative abundances are an estimated average generated from all samples for each host species), fish dietary classes, fish oceanic region and fish family.

7) Distribution of microbial taxa across fish phylogeny

First, we investigated the distribution of core microbial taxa across the fish phylogeny and their diet (**Figure 1**). Because the Linnaean taxonomy may limit our ability to detect discriminant gut bacteria, we used an eco-phylogenetic approach with the ClaaTU algorithm (Gaulke *et al.*, 2018) based on the distribution and shared ancestry of bacterial taxonomic units. Here, we directly used the rarefied enteric core. The rarefaction was made with a random subsampling of 1 808 sequences within each sample using the ‘rarefy_even_depth’ function from the phyloseq R-package version 1.28 (McMurdie and Holmes, 2013). Good’s coverage estimator (Chao *et al.*, 1988) was 99.6 ± 0.7 indicating that the coverage was still excellent

after rarefaction. The ClaaTU approach allowed us to detect conserved Cladal Taxonomic Units (CTUs) in coral fish gut bacteriome and to discriminate bacterial clades exclusive to and conserved among all fish, particular fish species, family and trophic guilds. A clade was supposed to be conserved if its observed prevalence was greater than that expected by chance ($p \leq 0.2$) after a phylogenetic permutation test (Martin, 2002). The taxonomic labels associated to each clade are implemented. The taxonomic label is only assigned to the ancestor of the tip if 100% of the other tips contained by the parent node also share this label. In order to integrate only CTUs related to the phylogeny, we excluded those conserved in trophic guilds. The patterns resulting from fish species conserved bacterial eco-phylogenetic groups were visualized in a heatmap illustrating their occurrence through fish family phylogeny.

8) Alpha and Beta Diversity

Four complementary alpha diversity indices were computed to assess the taxonomic (*i.e.* richness and Shannon's index H exponentially transformed in Effective Number of Species (ENS) (Jost, 2006)) and phylogenetic (*i.e.* Faith PD and Chao1 index) facets of diversity. Comparison of alpha diversity indices was achieved using a Kruskal-Wallis test (999 permutations) in the vegan R-package followed by a post-hoc Dunn test (999 perm, p-value corrected by Bonferroni method) in order to identify which species, family or diet means differed. In order to investigate whether alpha diversity was associated with host phylogeny distances, we used Moran's index of autocorrelation (I) (Moran, 1948; Gittleman and Kot, 1990) in the R package phylosignal (version 1.3) (Keck *et al.*, 2016). The local indicator of phylogenetic association (I_i) was further applied to test whether individual fish species displayed alpha diversity differing from random expectation (999 permutations; $p < 0.05$). Values ranged from -1 (perfect clustering of phylogenetically distant samples) to 1 (perfect

clustering of phylogenetically closed samples), with 0 meaning a perfect random association between bacterial communities and host phylogeny.

Taxonomic dissimilarities between pairs of bacteriome samples were assessed using Bray-Curtis (BC) dissimilarities and phylogenetic dissimilarities with the Weighted (W-Uni) and Unweighted (Un-uni) Unifrac metrics (Lozupone *et al.*, 2010), computed on relative abundances of ASVs.

9) Bacteriome assembly

To understand which mechanisms are underlying the microbial assembly of the core gut bacteriome, dissimilarity matrices first visualized their assembly by families in a two dimensional Principal Coordinates Analysis (PCoA). To determine the significant sources of variation in bacteriome, dissimilarity matrices were assessed using permutational analysis of variance (PERMANOVA) with the *adonis* function from the *vegan* package.

In order to see whether bacterial compositions differed more between different host species than hosts from the same species, the average distance to the centroid position was measured. Then, we calculated if this distance between gut bacteriome dissimilarity was correlated to the time divergence of their hosts which would assume phyllosymbiotic process. To quantify phyllosymbiosis, we compared measurements of bacteriome dissimilarity to host phylogenetic distance measured as branch length on the fish tree (Rabosky *et al.*, 2018) with *cophenetic.phylo()* function from the *ape* package (Paradis and Schliep, 2019). Finally, we aim to understand if the bacterial compositions were assembled in a hierarchical manner through host evolutionary history. Using the normalized Robinson-Foulds (nRF) (Robinson and Foulds, 1981) and normalized matching-cluster (nMC) metrics which is considered as a finer approach to detect phyllosymbiosis between closely related branches, we calculate the topological similarity between host tree and the bacterial dendrograms, with normalized distance ranging

from 0.0 (complete congruence) to 1.0 (complete incongruence) (Bogdanowicz and Giaro, 2013; Brooks *et al.*, 2016). The bacterial dendrograms were constructed by collapsing individual samples to generate an aggregate bacterial community for each species and then by comparing relationships of their beta diversity metrics (Brooks *et al.*, 2016). These analyses were tested on the entire core bacteriome and on the CTUs community, for all hosts and at different taxonomical and community levels.

Results

Fish bacteriome alpha diversity is highly variable and related to the host phylogeny

Alpha diversity of the enteric core bacteriome varied significantly among host species and families (**Supplemental Table 1**), with richness and Shannon index (in Effective Number of Species) on average equal to 62.6 ± 60.3 and 24.7 ± 28.3 , respectively (**Figure 2**). The equivalent indices for phylogenetic alpha diversities calculated using the Faith and Chao1 indices were on average equal to 8.4 ± 4.7 and 67.1 ± 66.4 , respectively (**Figure 2; Supplementa File 1**).

A significant correlation using Moran's index was observed between host inter-specific phylogenetic distances and enteric microbial taxonomic richness (Observed: $I_i = 0.058$, $p = 0.013$; Shannon : $I_i = 0.077$, $p = 0.005$) and phylogenetic richness (Faith : $I_i = 0.105$, $p = 0.001$; Chao1 : $I_i = 0.051$, $p = 0.016$), thus indicating that fish gut microbiome alpha diversity was related to host phylogenetic distances. Using the local indicator of phylogenetic association (I_i), we then investigated whether individual fish species displayed alpha diversity differing from random expectation. We observed that several species exhibited a local phylogenetic signal ($p < 0.05$) in all metrics used. That is the case for all species members of *Holocentridae* family **Supplemental File 2** and *S. intermedius* (Shannon $I_i = 0.068$, $p = 0.025$) which presented the poorest alpha diversity measures but also with two *Acanthuridae* (*A. nigrofusus* (Shannon $I_i = 0.016$, $p = 0.005$) and *C. striatus* (Shannon $I_i = 0.082$, $p = 0.004$)) and two *Labridae* (*H. hortulanus* (Shannon $I_i = 0.121$, $p = 0.02$), *G. caerulus* (Shannon $I_i = -0.039$, $p = 0.032$)) which exhibited, in contrast, the highest values of alpha diversity (**Figure 2; Supplemental Figure 2; Supplemental File 2**).

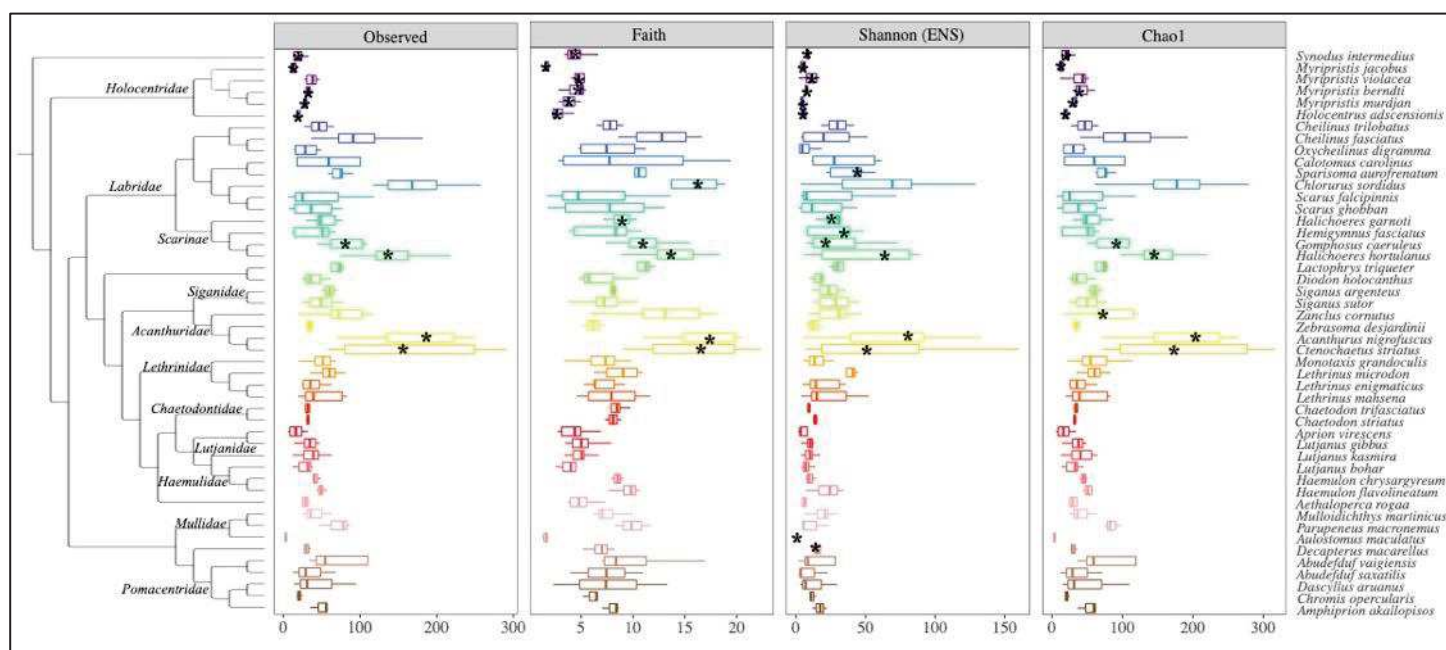


Figure 2 : Alpha diversity of all fish species, organized by host phylogenetic affiliation. The phylogeny is based on the Rabosky et al. (2018) fish phylogeny. Four complementary diversity indices were computed to assess the taxonomic (*i.e.* observed richness and Shannon's index H exponentially transformed in Effective Number of Species (ENS)) and phylogenetic (*i.e.* Faith PD and Chao1 index facets of diversity). Fish families are color coded. Individual fish species displaying alpha diversity indices differing significantly from random expectation (local Moran index (I_i) test) are indicated with a star. Local Moran index for each fish species is plotted in [Supplemental Figure 1](#) and values are available in [Supplemental File 2](#).

277

278 *The gut bacteriome composition is highly variable and species-specific*

279 The core gut bacteriome was mainly dominated by phyla *Proteobacteria* (represented
280 by *Vibrionales* and *Desulfovibrionales*) and *Firmicutes* (mainly from Order *Clostridiales*),
281 which collectively comprised ~66% of the sequences (**Figure 1**). Coral fishes hosted a high
282 diversity of other phyla (albeit at lower relative abundances), with over 18 phyla and notably
283 the *Planctomycetes* (10.6%), *Bacteroidetes* (6.2%), *Cyanobacteria* (4%), *Fusobacteria* (3.9%),
284 *Spirochaetes* (3.2%), *Tenericutes* (2.4%) and *Verrucomicrobia* (1.8%) regularly found in fish
285 bacteriomes. Despite this apparent homogeneity in phyla composition, we observed a large
286 range of intraspecific dissimilarities across all the fish species studied with species *Alaustomus*
287 *maculatus* and *Lethrinus mahsena* at the lower and higher extremity of this range for BC metric,
288 respectively (**Figure 3.A**). At family level, *Aulostomidae* displayed significantly lower

intraspecific dissimilarities indicating potential higher selective pressure on the interaction between fishes and their gut bacterial symbionts (**Figure 3.B**). Although average gut bacteriome intraspecific variability was high, interspecific dissimilarities were still on average 33% higher than intraspecific ones whatever the metric used (**Supplemental Figure 3**). This pattern was congruent with phylosymbiosis which anticipates that an individual's microbial community will exhibit higher similarity to communities of the same host species than to those from different host species.

Phylosymbiosis is prevalent in coral fish gut bacteriome

Phylosymbiosis predicts a significant degree of association between host evolutionary history recapitulated by host phylogeny and microbiome community relationships. Using Mantel tests to analyze these relationships and independently of the dissimilarity metric used, we indeed found a positive and significant correlation between fish species divergence time and bacteriome dissimilarities (Mantel test for BC ; $r = 0.23$; $p = 0.011$) (**Figure 4 ; Table 1**). This trend was maintained within trophic guilds with a stronger correlation for herbivorous (Mantel test for BC ; $r = 0.42$; $p = 0.008$) than carnivorous fishes (Mantel test for BC ; $r = 0.32$; $p = 0.007$). No correlation was found for omnivorous fishes (Mantel test for BC; $r = 0.031$; $p = 0.481$). Due to the low number of observations, no correlation was found either when testing for phylosymbiosis at the fish family level (**Table 1**).

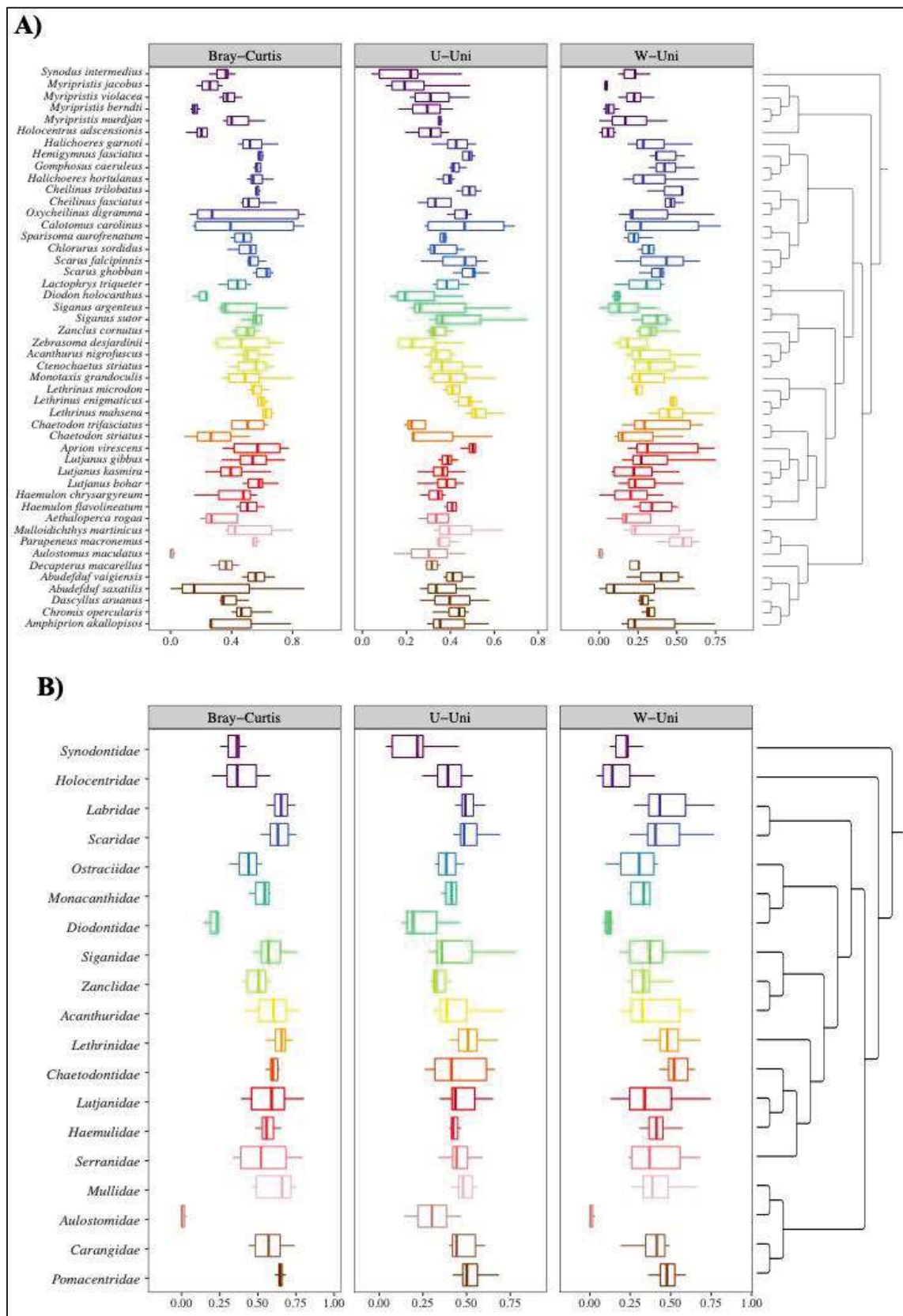


Figure 3 : Beta-diversity values for the Bray-Curtis, the Unweighted (U-Uni) and the Weighted Unifrac (W-Uni) distances, among **(A)** fish species ($n = 48$ species with more than 2 individuals), and among **(B)** fish families ($n = 19$ with more than 2 individuals).

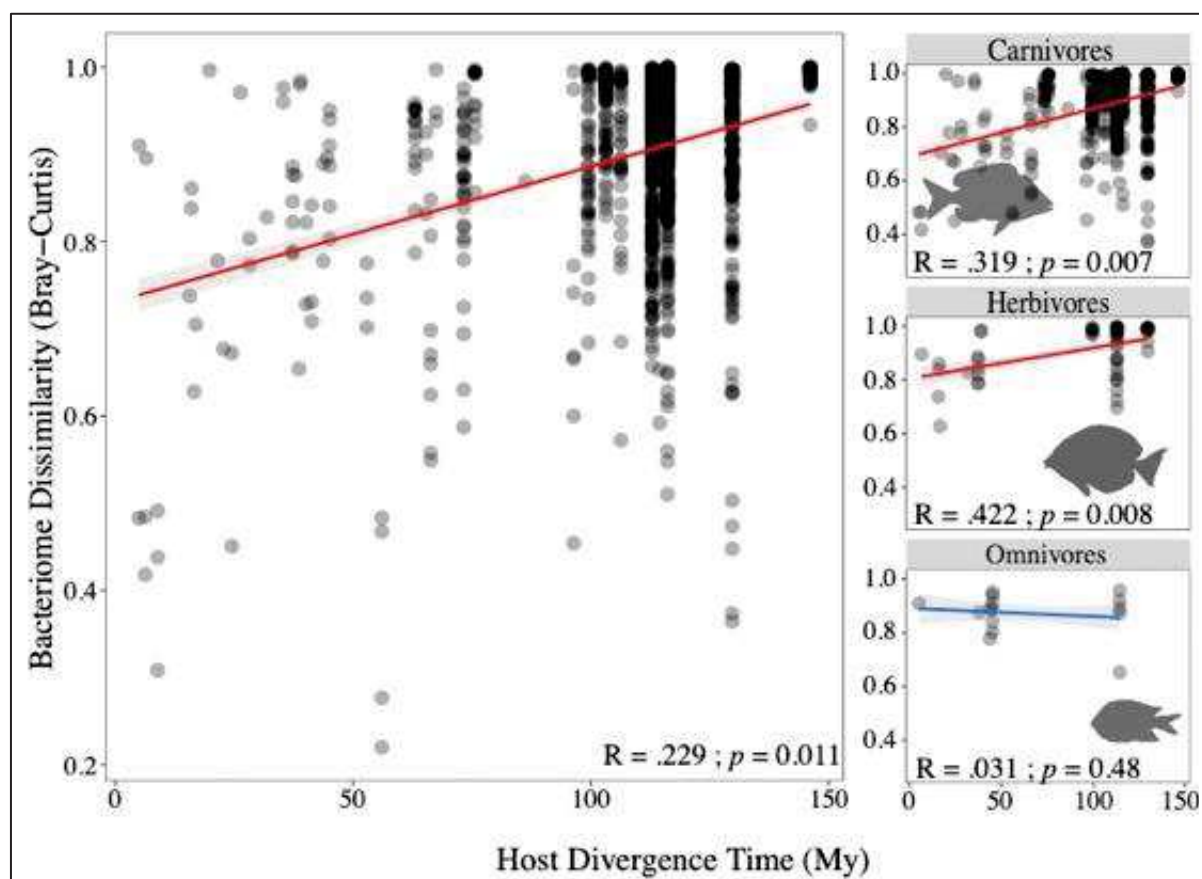


Figure 4 : Mantel tests assessing the degree of correlation between fish evolutionary distances in million years (My) and bacteriome Bray-Curtis dissimilarities (left panel). Within trophic guilds, carnivores and herbivores show a strong correlation between fish divergence time and bacterial community dissimilarity, but omnivores do not (Right panel). Mantel results are presented at different scales and for other dissimilarity metrics in the **Table 1** and in the **Supplemental Table 1**.

309
310

Table 1 : Phyllosymbiosis and Co-phylogeny results resulting from the Mantel test, the normalized Robinson-Foulds (nRF) and the normalized Matching cluster (nMC) analyses. The Mantel test is based on Spearman correlations between host divergence and bacteriome beta dispersion. The nRF and the nMC are based on the topology of the phylogenetic relatedness for bacteriome considering all bacteria and phylogenetic tree of hosts (**See the Supplemental Table 1 analyses on bacterial Order and Family levels**). The resulting scores are comprised between 0 (complete congruence) and 1 (complete incongruence). P-values for nRF and nMC were determined by the probability of 10 000 randomized dendrogram topologies yielding equivalent or more congruent phyllosymbiotic patterns than the actual microbiota dendrogram. All tests were proceeded on the Bray-Curtis (BC), W-Uni (Weighted Unifrac) and U-Uni (Unweighted Unifrac) bacteriome matrices for n sampling size of species. Codes for p-value : *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not ($0.05 < NS < 0.1 < NS$).

Host	Metric	Mantel (p-value)	nRF (p-value)	nMC (p-value)
All species (n = 48)	BC	r = 0.22 (**)	nRF = 0.96 (*)	nMC = 0.80 (NS)
	U-Uni	r = 0.35 (***)	nRF = 0.93 (**)	nMC = 0.66 (***)
	W-Uni	r = 0.21 (**)	nRF = 0.93 (**)	nMC = 0.73 (*)
Carnivorous (n = 31)	BC	r = 0.32 (**)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.59 (***)
	U-Uni	r = 0.44 (***)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.63 (***)
	W-Uni	r = 0.29 (**)	nRF = 0.93 (*)	nMC = 0.71 (*)
Herbivorous (n = 11)	BC	r = 0.42 (**)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.57 (NS)
	U-Uni	r = 0.58 (**)	nRF = 0.56 (***)	nMC = 0.33 (***)
	W-Uni	r = 0.68 (***)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.36 (***)
Omnivorous (n = 6)	BC	r = 0.03 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.58 (NS)
	U-Uni	r = -0.03 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
	W-Uni	r = -0.27 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
Holocentridae (n = 5)	BC	r = -0.42 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 1.00 (NS)
	U-Uni	r = 0.38 (NS)	nRF = 0.33 (*)	nMC = 0.00 (NS)
	W-Uni	r = -0.33 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 1.00 (NS)
Labridae (n = 7)	BC	r = -0.06 (NS)	nRF = 0.60 (NS*)	nMC = 0.67 (NS)
	U-Uni	r = 0.01 (NS)	nRF = 0.80 (NS)	nMC = 0.56 (NS)
	W-Uni	r = 0.20 (NS)	nRF = 0.80 (NS)	nMC = 0.56 (NS)
Scarinae (n = 5)	BC	r = -0.13 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 1.00 (NS)
	U-Uni	r = 0.11 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 1.00 (NS)
	W-Uni	r = 0.38 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
Lethrinidae (n = 4)	BC	r = 0.83 (NS)	nRF = 0.50 (NS)	nMC = 0.33 (NS)
	U-Uni	r = 0.89 (NS)	nRF = 0.00 (*)	nMC = 0.00 (*)
	W-Uni	r = 0.71 (NS*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.50 (NS)
Lutjanidae (n = 4)	BC	r = 0.37 (NS)	nRF = 0.50 (NS)	nMC = 0.33 (NS)
	U-Uni	r = 0.03 (NS)	nRF = 0.50 (NS)	nMC = 0.33 (NS)
	W-Uni	r = 0.60 (NS)	nRF = 0.50 (NS)	nMC = 0.33 (NS)
Pomacentridae (n = 5)	BC	r = 0.01 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
	U-Uni	r = 0.09 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
	W-Uni	r = -0.49 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)

323 Although less sensitive than matrix comparison methods (Mazel *et al.* 2018),
 324 topological comparison approaches consisting in analyzing the congruence between of a host
 325 phylogenetic tree and a microbiome dendrogram confirmed mantel tests results. We found
 326 significant results for the Robinson-Foulds analysis for all metrics (RF results for BC : nRF =
 327 0.96 , $p = 0.022$; U-Uni & W-Uni : nRF = 0.93 , $p = 0.002$) and significant results for the
 328 Matching cluster analysis for the Unifrac distances (MC results for U-Uni : nRF = 0.66 , $p = 0$
 329 ; W-Uni : nRF = 0.73 , $p = 0.025$), supporting the existence of a strong phyllosymbiosis signal
 330 in coral fish gut bacteriomes (**Figure 5 ; Table 1**).

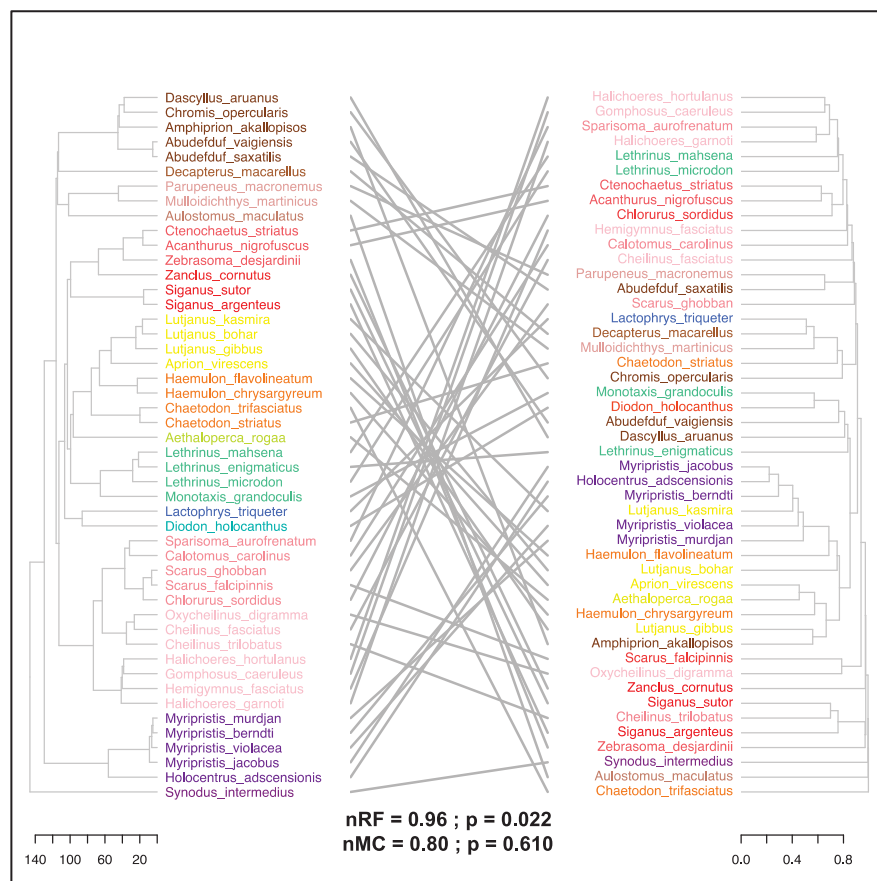


Figure 5 : Tanglegram illustrating the topological relationships between fish phylogeny and microbial communities clustered with an UPGMA algorithm. Topological congruencies are quantified by the normalized Robinson-Foulds (nRF) metric, which takes into account symmetry in rooted tree shape on a scale from 0 (complete congruence) to 1 (incomplete incongruence). Parallel lines connect species whose position is concordant between host phylogeny and microbiota dendrogram. Host species and their microbiome are colored following a gradient by phylogenetic proximity.

Phylosymbiosis may result from codiversification between hosts and specific microbial symbionts but it can also simply be due to shifts in host geographical ranges (Moeller *et al.*, 2017) or reflect the effect of filtering by a phylogenetically conserved host trait such as diet on the assembly of microbiotas (Moran and Sloan, 2015; Mazel *et al.*, 2018). Visualization of bacterial assembly on the two first axes of a PCoA ordination (**Figure 6**) and PERMANOVA analyses (**Table 2**) confirmed that bacteriome composition primarily associated with fish evolutionary history. We observed a strong (R^2 between 25 and 51 %) and significant ($p < 0.001$) association between fish species, order and family, which served as a proxy for host evolutionary history, and the three dissimilarity metrics used for gut bacterial communities (**Table 2**). Host diet (carnivory, omnivory, herbivory) and reef locations (Europa, Juan de Nova, Seychelles and Martinique) were significant but weaker determinants of bacteriome beta-diversity (**Table 2**), indicating that they may impact gut bacteriome composition but less than host phylogeny.

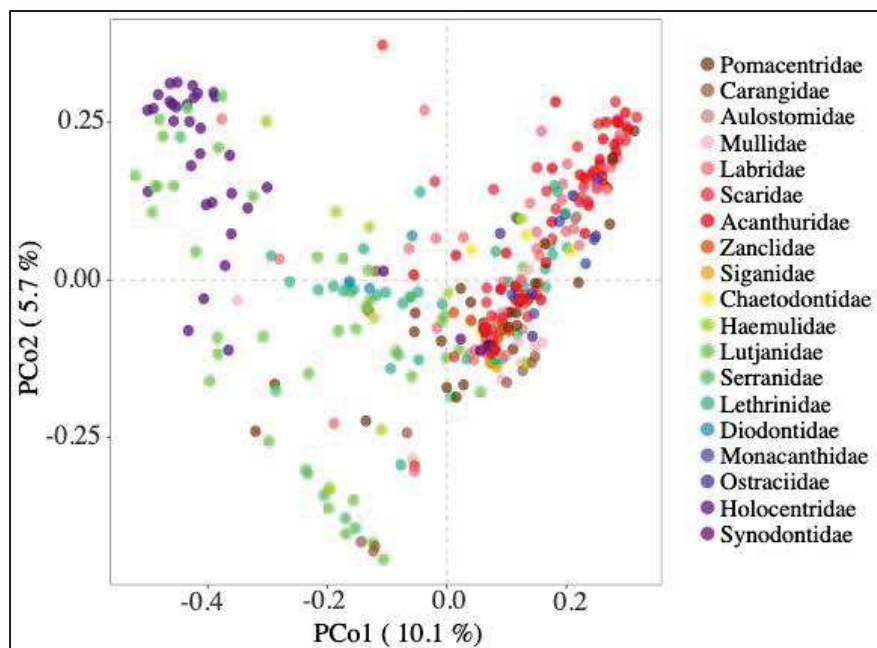


Figure 6 : Principal Coordinates Analysis (PCoA) plot illustrating Bray-Curtis distance between pairs of bacteriome samples. Bacteriomes are colored according to their families following a gradient by phylogenetic proximity and are plotted in the same window.

Table 2 : Results of the PERMANOVAs for the Bray-Curtis (BC), Unweighted-Unifrac (U-Uni) and the Weighted-Unifrac (W-uni) indices to test the effect of the taxonomy (family, genus, species), the diet (trophic guilds and intra-dietary classes) and the region. The host community (with n = sampling size) was tested at global (full dataset), dietary and taxonomical scales. When it was able, the influence of the region was tested inside the species. Codes for p-value : *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not, even with a low probabilities $p \leq 0.1$ (NS*). For each test, only triplicates were considered, if not, the test was not proceeded (-).

Host Community	Metric s	Family R ² (p-value)	Genus R ² (p-value)	Species R ² (p-value)	Trophic guilds R ² (p-value)	Region R ² (p-value)
All dataset N = 378	BC	R ² = 0.25 (***)	R ² = 0.36 (***)	R ² = 0.40 (***)	R ² = 0.03 (***)	R ² = 0.05 (***)
	U-Uni	R ² = 0.28 (***)	R ² = 0.39 (***)	R ² = 0.45 (***)	R ² = 0.04 (***)	R ² = 0.08 (***)
	W-uni	R ² = 0.35 (***)	R ² = 0.47 (***)	R ² = 0.51 (***)	R ² = 0.04 (***)	R ² = 0.06 (***)
Herbivores N = 109	BC	R ² = 0.19 (***)	R ² = 0.30 (***)	R ² = 0.44 (***)	R ² = 0.03 (***)	R ² = 0.13 (***)
	U-Uni	R ² = 0.27 (***)	R ² = 0.39 (***)	R ² = 0.53 (***)	R ² = 0.03 (**)	R ² = 0.20 (***)
	W-uni	R ² = 0.33 (***)	R ² = 0.43 (***)	R ² = 0.57 (***)	R ² = 0.03 (**)	R ² = 0.16 (***)
Carnivores N = 235	BC	R ² = 0.25 (***)	R ² = 0.37 (***)	R ² = 0.47 (***)	R ² = 0.05 (***)	R ² = 0.06 (***)
	U-Uni	R ² = 0.28 (***)	R ² = 0.40 (***)	R ² = 0.50 (***)	R ² = 0.06 (***)	R ² = 0.09 (***)
	W-uni	R ² = 0.33 (***)	R ² = 0.47 (***)	R ² = 0.55 (***)	R ² = 0.07 (***)	R ² = 0.08 (***)
Omnivores N = 34	BC	R ² = 0.20 (***)	R ² = 0.38 (***)	R ² = 0.55 (***)	-	R ² = 0.14 (**)
	U-Uni	R ² = 0.23 (***)	R ² = 0.38 (***)	R ² = 0.52 (***)	-	R ² = 0.15 (***)
	W-uni	R ² = 0.24 (**)	R ² = 0.38 (**)	R ² = 0.54 (**)	-	R ² = 0.12 (NS*)

345
346

Conserved bacterial lineages associated to fish evolutionary history

In order to further resolve the effect of fish evolutionary history and diet and particularly understand which specific bacteriome clades were connected to the evolution of coral fishes, we employed an ecophylogenetic approach grouping ASVs in conserved taxonomic units (CTUs) based on their shared ancestry and their common distribution across fishes. We identified 1 930 and 1 476 bacterial CTUs that were conserved ($p \leq 0.05$) in at least one fish species or family, respectively. Only 379 of which were considered as significant ecophylogenetic groups conserved in all fish species ($p \leq 0.05$) (**Supplemental File 3**). These latter were classified mainly as *Firmicutes* (33% of CTUs) dominated by Genera *Epulopiscium* (6%) and *Clostridium_sensu_stricto_1* (11%), *Proteobacteria* (25%) mainly constituted by *Rhodobacterales* (15%) and *Rhizobiales* (6%), and finally *Planctomycetes* (25%) entirely of the order *Pirellulales* (**Supplemental Figure 4**).

Analysis of the phylosymbiosis patterns associated to these particular clades highlighted the potential confounding effect of fish dietary strategy. For *Firmicutes*, the phylosymbiosis signal was only conserved in herbivores (**Figure 7**; **Supplemental Table 1**). For *Clostridium_sensu_stricto_1*, phylosymbiosis was only significant for the U-Uni distance in carnivores. In contrast, for *Planctomycetes* (and *Pirellulales*) and *Proteobacteria* (*Rhodobacterales* and *Rhizobiales*), the phylosymbiosis signal was conserved in carnivores and herbivores. In order to circumvent the somewhat correlation between fish phylogeny and diet, we used the ClaaTu workflow to identified conserved clades among the different dietary strategy (578 CTUs) and remove them from the aforementioned patterns of clade conservation. Doing so, only two CTUs affiliated to *Epulopiscium* and *Blastopirellula*, remained conserved among all fish species. The number of CTUs exclusively related to host phylogeny and conserved more recently during host evolution (*i.e.* in at least one fish family or species) was much higher with 900 and 1 354 CTUs, respectively (**Figure 8**).

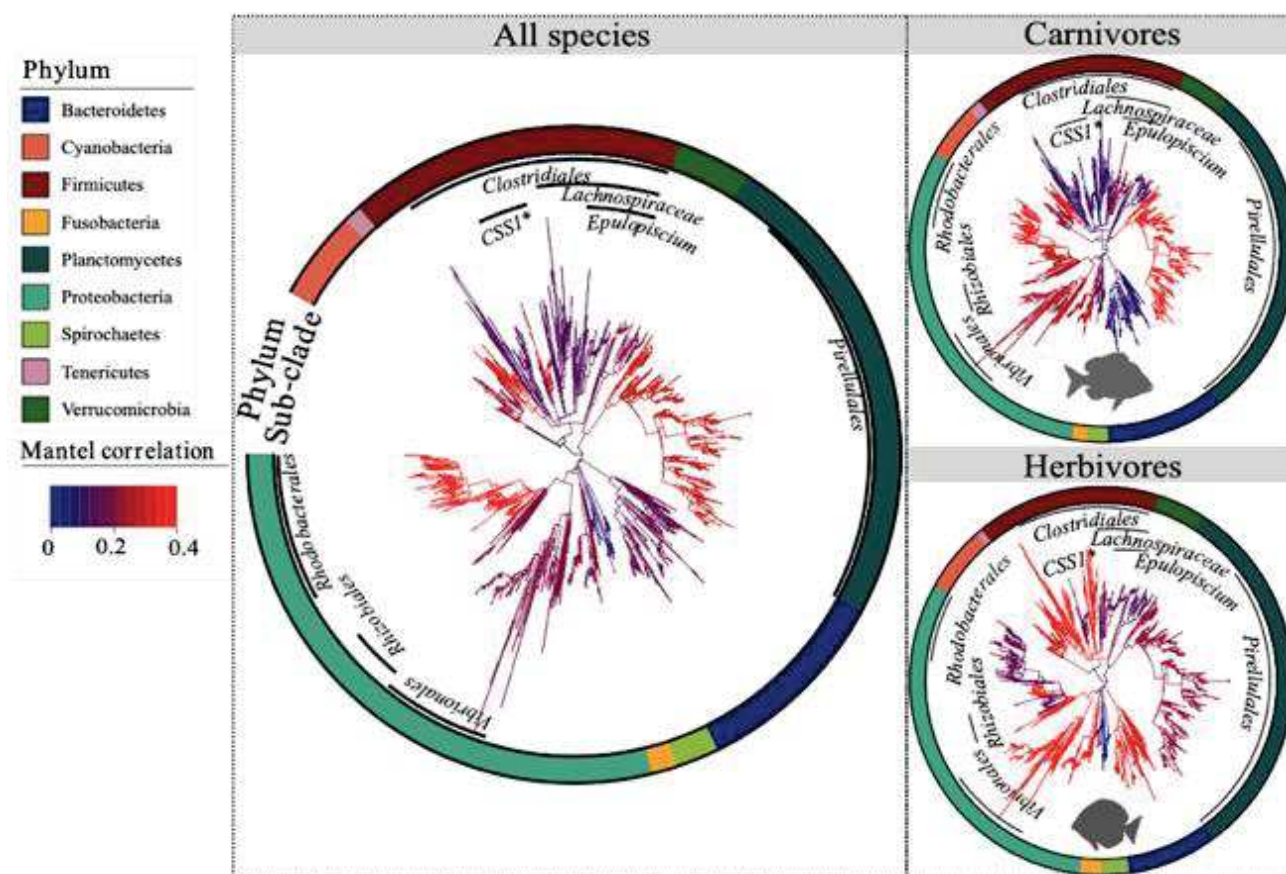


Figure 7 : Bacteriome phylogenetic tree of major phyla and sub clades identified as CTUs with the branches colored following their Mantel correlation coefficient for all species (left) and faceted for carnivores and herbivores dietary strategies (right). Values of the Mantel test are available in the Supplemental Table 1.

372

373 Of the 900 family-conserved CTUs, 471 were unique in at least one family. For
 374 example, 16 of the 35 CTUs affiliated to *Epulopiscium* were exclusive to and conserved among
 375 *Acanthuridae*. In contrast, 4 *Epulopiscium* CTUs were conserved in at least 4 fish families.
 376 Mapping the distribution of the 35 CTUs onto the fish phylogeny revealed that *Epulopiscium*
 377 CTUs were distributed in 8 fish families (*Acanthuridae*, *Diodontidae*, *Holocentridae*,
 378 *Kyphosidae*, *Labridae*, *Lutjanidae*, *Pinguipedidae*, *Serranidae*) spanning 146 My of fish
 379 evolution (Supplemental File 3).

380

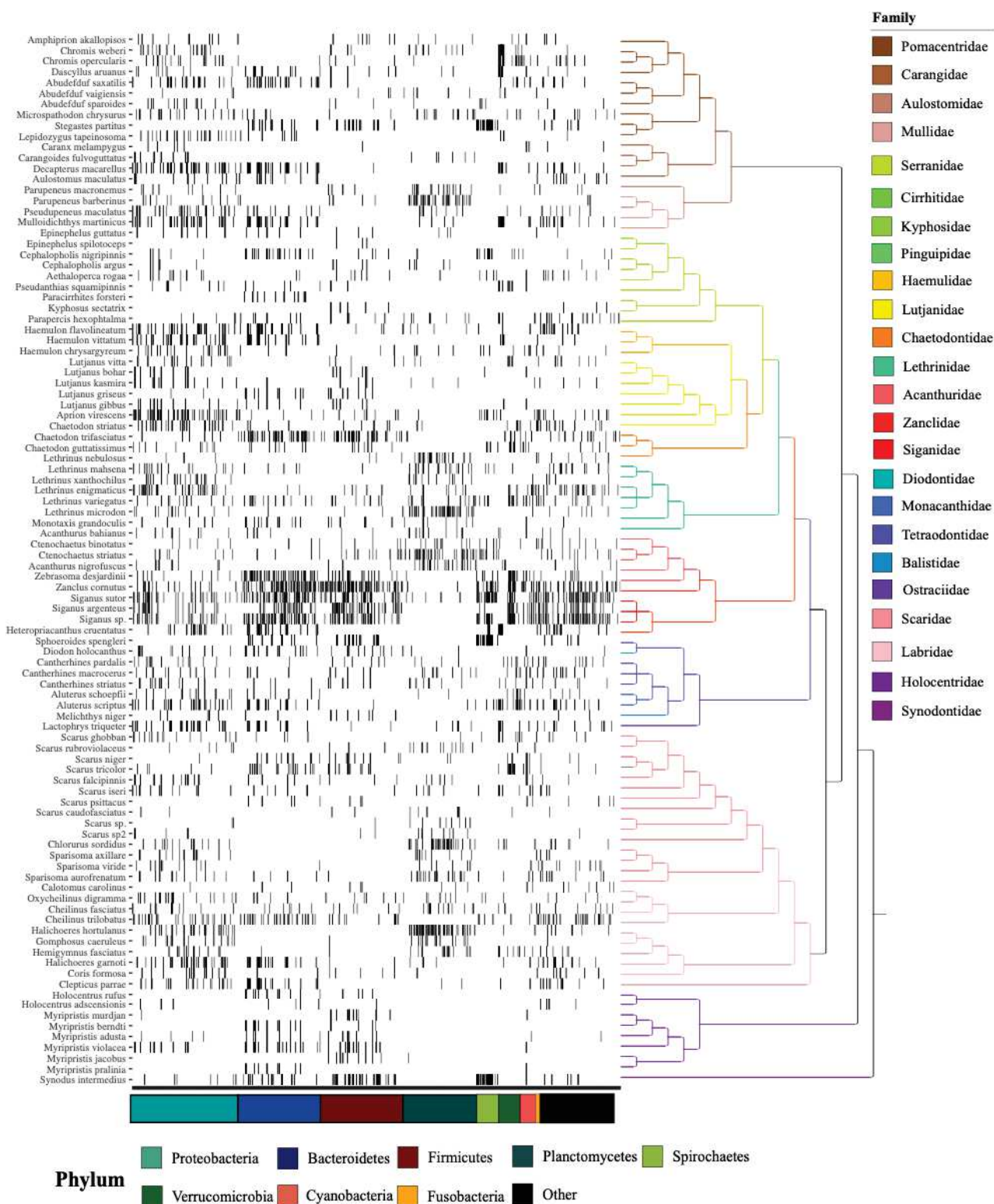


Figure 8 : Patterns of conserved bacterial eco-phylogenetic groups across the fish phylogeny. The 900 eco-phylogenetic groups that were conserved significantly ($p \leq 0.05$) in at least one fish family are plotted as columns in a heatmap that illustrates their occurrence across the fish phylogeny. Black ticks indicate an eco-phylogenetic group was detected in a given fish family.

Discussion

Although fishes represent the most diverse and oldest group of vertebrates, our understanding of their gut microbiome and its functional significance is still lagging well behind that of terrestrial vertebrates. This is particularly true for the > 6 000 fish species living on coral reefs which represent a diverse and abundant group as well as the principal link between reefs and associated human societies as source of food but also through regulation of ecosystem processes (Bellwood and Choat, 1990; Raymundo *et al.*, 2009; Maire *et al.*, 2018). Coral reef fish represent more than 30 families and have a variety of diets (from detritivorous, herbivorous, invertivorous to carnivorous), allowing to understand to what extent vertical (*i.e.* host evolutionary history) and horizontal (*i.e.* dietary strategies) bacterial inheritances have shaped fish gut bacteriome evolution. Previous works on mammals have suggested the existence of phyllosymbiosis patterns for gut microbiomes, being driven by the significant influence of the host phylogeny and diet (Moeller *et al.*, 2016; Groussin *et al.*, 2017; Gaulke *et al.*, 2018; Youngblut *et al.*, 2019). However, the influence of the phylogeny of the host on gut microbiome of fishes that diverged much more earlier than mammals (150 Mya for fishes vs 63 Mya for placental mammals) (Benton *et al.*, 2009) remains unclear. Our results exhibited the first evidence of a consistent pattern of phyllosymbiosis across coral reef fishes and pointed at the combined effect of host phylogeny, which seems to predict the presence of recently acquired bacterial clades, and diet, which drives the horizontal acquisition of bacterial clades in the early stages of fish evolution.

Consistent with previous studies on fishes (Miyake *et al.* 2015, Clements *et al.*, 2014; Givens *et al.*, 2015; Pratte *et al.* 2018; Scott *et al.* 2020; Cheutin *et al.*, 2021), terrestrial vertebrates (Colston and Jackson, 2016), and mammals (Ley *et al.*, 2008a) gut bacteriomes, the composition of coral reef fish gut bacteriome was broadly represented by the phyla

Proteobacteria (represented by *Vibrionales* and *Desulfovibrionales*) and *Firmicutes* (mainly from Order *Clostridiales*). At a finer taxonomic level however, no ASV, nor bacterial genus was shared among the 101 species of coral fishes and we observed high bacteriome intraspecific dissimilarities with a large variability of these latter across coral fishes (**Figure 3**). Such intraspecific variability in gut bacteriome confirms findings reported for tropical (Cheutin *et al.* 2021, Miyake *et al.* 2015) and temperate reef fishes (Escalas *et al.* 2021). This variability in bacteriome dissimilarities between individuals of the same fish species is indicative of the nature and strength of host–symbiont interactions, ranging from obligate to facultative (Thacker and Freeman, 2012). Low variability would indicate high specificity with a strong selection of specific symbionts by the host, while higher intraspecific variability may be the reflection of a relaxed pressure on the host-symbiont interaction.

In congruence with phylosymbiosis, which anticipates that an individual's microbial community will exhibit higher similarity to communities of the same host species than to those from different host species (Mazel *et al.*, 2018), interspecific dissimilarities were on average 33% higher than intraspecific ones (**Supplemental Figure 3**). Phylosymbiosis also predicts that microbial community relationships recapitulate the phylogeny of their host (Brucker and Bordenstein, 2013). Consistent with this pattern, matrix comparison methods revealed a positive and significant correlation between fish species divergence time and bacteriome dissimilarities (**Figure 4**), while topological comparison approaches showed a significant congruence between the fish phylogenetic tree and the dendrogram representation of bacteriome dissimilarities (**Figure 5**). These results support the existence of a strong phylosymbiosis signal in coral fish gut bacteriomes (R value of Mantel test ranged between 0.21 and 0.68 in function of the metric and the fish guild, Table 1) contrasting with the weak phylosymbiotic signal observed for skin coral fish microbiomes (Chiarello *et al.* 2018). This

pattern agrees with the discrepancy observed in the phylosymbiotic signal between internal tissues and the mucus of corals (Pollock *et al.*, 2018) and confirm that internal microbiotas, which are naturally protected from environmental perturbations, tend to harbor phylosymbiosis patterns much more frequently than surface microbiotas (Mazel *et al.* 2018). The strength of fish gut bacteriome phylosymbiosis was equivalent to the one observed in vertebrates (Groussin *et al.* 2017, Song *et al.* 2020) corroborating the fact that although vertical inheritance of symbionts is generally evoked in the establishment of phylosymbiosis, this pattern can alternatively arise from horizontal microbial transmission (Lim and Borderstein, 2020). Indeed, contrary to mammals which acquire vertically their early gut microbiota through breastfeeding (Fernández *et al.*, 2013), fish pioneering microbial symbionts are mainly recruited from the environment (Sylvain *et al.* 2017). The mechanisms of transmission of the heritable microbes in coral reef fishes are not well understood but they might provide understanding on the construction of microbial association in fish. Whereas some species might care for their eggs, influencing the chorion surface (*e.g.* *Pomacentridae*, *Syngnathidae*) (Beemelmans *et al.*, 2019), or transmit their microbes with trans-ovarian mechanisms to the yolk of the eggs (Brock and Bullis, 2001), the first colonization mainly occurs with the microbes present on the chorion' surface which colonize the gut of the fish during the first water ingurgitation (Llewellyn *et al.*, 2014). From this point and for each generation, phylosymbiosis may arise from ecological filtering processes (McFall-Ngai *et al.*, 2013; Groussin *et al.*, 2017; Mazel *et al.*, 2018; Moran *et al.*, 2019). Hosts that share a recent evolutionary ancestor are more likely to harbor physiological, behavioral, or ecological similar phenotypes, which select comparable microbes from their environment (Moran *et al.*, 2019).

Fish gut bacteriome were indeed species-specific, both in terms of alpha diversity (**Figure 2**) and in terms of structure of the community (**Figure 6**). Moran's I autocorrelations and PERMANOVA analyses showed that fish species hosted different levels of bacteriome

phylogenetic diversity and composition, and these differences were strongly phylogenetically conserved. Though phylogeny was the main driver of bacteriome beta-diversity, fish diet and reef locations explained a significant amount of bacteriome community variance (**Table 1**). The apparent predominance of phylogeny over diet in explaining gut community composition maybe however misleading. First because, both drivers have been identified to explain different aspects of microbiome diversity in mammals (Groussin *et al.*, 2017; Youngblut *et al.*, 2019). Groussin *et al.* (2017) showed that diet mainly drives the horizontal acquisition of ancient bacterial clades while host phylogeny modules the presence of more recent lineages. Second because diet is intimately related to the evolutive history of fishes and phylogenetic conservatism is apparent at coarse dietary resolution (*e.g.* species from the same family belonged to the same trophic guild) (Casey *et al.*, 2019; Parravicini *et al.*, 2020). In fish, gut morphology has been described and is strongly associated with the diet. This is particularly true for the herbivores which exhibit a significantly longer gut than carnivores (Egerton *et al.*, 2018) which markedly influences the enteric microbiome (Escalas *et al.*, 2021). In agreement, we observed the strongest signal of phylosymbiosis for herbivores (**Figure 4**). Hence, part of the bacteriome community variance explained by host evolutionary history maybe in fact the reflect of the effect of filtering by a phylogenetically conserved host trait such as diet.

Despite the difficulty of disentangling the effect of host evolutionary history and diet on fish gut bacteriomes, we took advantage of the incomplete overlapping between fish phylogeny and dietary strategies to understand which specific bacteriome clades were conserved across coral fish evolution. The number of CTUs exclusively related to host phylogeny and conserved in at least one fish family or species was high, highlighting the influence of host phylogeny at short evolutionary scales. At larger evolutionary scales however, our ecophylogenetic approach acknowledges the strong imbrication of fish evolutionary history and dietary strategies since 99.5 % of conserved clades in all fish were shared with conserved

clades among fish dietary strategy. For example, the phylum *Firmicutes* and more particularly the genus *Clostridium_sensu_stricto_1*, which were the dominant CTUs, are common fish gut anaerobic bacteria known to ferment plant cell wall components and produce short chain fatty acids (SCFAs), thus providing energy to their hosts (Clements *et al.*, 2007; Mountfort *et al.*, 2002). Our finding therefore agrees with the idea that diet is primarily selecting for functional guilds implied in the degradation of complex molecules such as cellulose or herbivores or chitin for carnivores (Youngblut *et al.*, 2020). In the end, only two CTUs affiliated to *Epulopiscium* and *Blastopirellula* displayed a significant phylogenetic signal after first accounting for diet. This finding corresponds with studies on the microbiome of *Acanthuridae* in which giant bacteria of the genus *Epulopiscium* have been shown to co-evolve with their hosts (Fishelson *et al.*, 1985; Clements *et al.*, 1989; Miyake *et al.*, 2016) representing key niche-partitioning driver in the nutritional ecology of herbivorous surgeonfishes (Ngugi *et al.*, 2017). We show here that although *Acanthuridae* hosted most the CTUs affiliated to *Epulopiscium*, the distribution of this bacteria in coral fishes is larger than previously thought, including non-herbivorous species such as *Lethrinidae*, *Lutjanidae*, *Labridae* and one of the most ancient fish family: the *Holocentridae*. We also detect a strong and significant phyllosymbiotic signal for this clade in herbivorous fishes (**Figure 7**). These results suggested that the importance of this symbiont may go beyond the restrict group of macroalgae-feeding surgeonfishes and it remains to be seen whether the evolution of *Epulopiscium* is only linked to coral herbivorous fishes or coral fishes in general.

Conclusion

Our survey of coral fish bacteriome diversity provides the most conclusive evidence to date that phyllosymbiosis has occurred between coral fishes and their gut bacterial symbionts.

Our results indicate that host evolutionary history and diet, which were the major modulators of gut bacteriome diversity in coral fishes, acted at different host evolutionary scale. While fish phylogeny seems to predict the presence of recently acquired bacterial clades, diet determined the horizontal acquisition of functional guilds in the early stages of fish evolution. Conserved clades exclusively related to fish evolutionary history identified in this study may be of special interest for future work attempting to discern the processes (*i.e.* co-speciation, co-evolution...) that drive the diversification of fish gut bacterial symbionts.

Acknowledgements

This project was funded by a grant from the CNRS INSU EC2CO “Microbien” program project BIOMEVO, a grant from the CNRS international emerging actions (IEA) program project FISH μ BIOM, the Royal Society and an ERC grant (759457) to Lancaster University and from the Explorations de Monaco program project Megafauna.

Marie Charlotte Cheutin was supported by a Ph.D grand from the French Ministry of Higher Education and Research.

A research permit was issued by Seychelles Bureau of Standards (n° FST18132), the *Terres Antarctiques et Australes Françaises* (TAAF) (decree 2019-45 of the 1st april, 2019) and the Martinique government services (decision n°122). We thank the Seychelles Fishing Authority research team, the crew of the R/V Marion Dufresne II for logistical support, assistance in the field and with sample preparation (Andrew Souffre, Rodney Melanie, Achille Pascal, Marie-Corinne Balett, Stephanie Marie, Clara Belmont). We are grateful to three trap fishers who provided boat time and fisheries expertise, and assisted with sample collection.

We are grateful to the genotoul sequencing platform in Toulouse (Occitanie, France), for providing the MiSeq Illumina sequencing.

Author contributions

JCA, MCC, TB and SV conceived the study. JR, CA, EM and SV conducted the fieldwork and MCC, JCA, CXR, JBJ, EM, ES, VM, CB, RG, ER, CA dissected the fish guts. MCC and CM extracted the DNA and prepared the DNA for sequencing. MCC, CXR and JCA analyzed the data. MCC and JCA wrote the first draft of the manuscript with input from SV, TB, JR, NG, TD and CH. All authors reviewed the manuscript and contributed to the final version.

Manuscrit D

Is the assertion « I am what I eat » true in coral fish?

Authors : Marie-Charlotte Cheutin¹, Sébastien Villéger¹, Christina C. Hicks², James P. W. Robinson², Nicholas A. J. Graham², Clémence Marconnet¹, Claudia Ximena Ortiz Restrepo¹, Jean-Baptiste Juhel¹, Eva Maire², Elliott Sucré³, Virginie Marques¹, Cassandra Benkwitt², Rachel L. Gunn², Eilish Richards⁴, Camille Albouy⁵, Marc Trousselier¹, Giulia Donati⁴, Loic Pelissier⁴, Thierry Bouvier¹, Jean-Christophe Auguet¹

¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

³ Centre Universitaire de Mayotte, Route Nationale 3, BP53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

⁴ETH, Universität Zürich, 8092 Zürich, Switzerland

⁵ IFREMER, Unité Ecologie et Modèles pour l'Halieutique, EMH, Nantes Cedex 3, France

Key-words: gut bacteriome ; dietary strategy ; carnivorous ; reef fish ; taxonomic and phylogenetic diversity ; functional prediction diversity

Des informations supplémentaires complètent ce manuscrit en Annexe 8.III.D

Les fichiers supplémentaires sont disponibles sur ce lien

Abstract

Coral reef fish are an important link between reefs and society. Their top-down control on macroalgae and metazoan populations is essential for the functioning of the reefs. Yet, major studies on their gut microbiomes have overall been focused on herbivorous and corallivorous species, underestimating the large panel of carnivorous species which may support a considerable taxonomic and functional microbial communities. This study aims to describe the taxonomic and functional role of the gut microbiomes associated to coral reef fish using 8 different dietary classes. We showed that dietary strategy was a determinant of the structuration of microbial communities (PERMANOVA for Bray-Curtis: $R^2 = 0.11$; $p < 0.001$) and their associated functions (PERMANOVA for Bray-Curtis: $R^2 = 0.20$; $p < 0.001$). We demonstrated that trophic positions explained significantly alpha and beta diversities with higher richness and variability found in lower trophic guild such as herbivores (Trophic level for Shannon entropy $r_s = -0.45$; $p < 0.001$; Trophic level for Bray-Curtis dispersion $r_s = -0.12$; $p = 0.025$). The description of carnivorous allowed us to describe 13 unique genera which have never been related to gut microbiome of fish, suggesting that carnivores may represent a considerable role of reservoir for rare taxa. We could only find functional and bacterial biomarkers within trophic guilds (*i.e.* herbivores, carnivores and omnivores) but the signal was lost using the 8 dietary strategies. Comparing the microbial functions associated to gut microbiomes, carnivores were enriched in amino acids, chitin and carbohydrates metabolisms while herbivorous and omnivorous gut microbial activities were related to uric acid metabolisms.

Introduction

Fishes are immersed from early stages in a sea of microbes which will be recruited during the first food items ingestion to form the early gut microbiota (Nayak, 2010; Parris *et al.*, 2016). Thanks to major leaps in the field of molecular biology, interest for the enteric microbes associated with fish raised and spotted on light their active contribution to the host fitness. Indeed, microbiomes of metazoans play a myriad of key functional roles for host such as regulation of the immune system, development, homeostasis, digestion and behavior (Bates *et al.*, 2007; Chu and Mazmanian, 2013; Lee and Hase, 2014; Moran *et al.*, 2019). Their importance is such that most studies on fish microbiomes have targeted commercial species from aquaculture in order to generate economic benefits (de Bruijn *et al.*, 2018). Yet, reared fishes represent a very small fraction of the real diversity of teleosts with only 15 species that form the most of the world aquaculture production (FAO, 2016).

Among wild fishes, coral reef contain > 6 000 species with various diets, behavior, location, and represent a major source of ecological, social and economic values for coastal populations (McClanahan, 1995; Polunin and Roberts, 1996; McClanahan *et al.*, 2005; Sadovy, 2005). Thus, coral reef fishes represent a multitude of hologenome systems which may carry an important taxonomic and functional diversity for the reefs. However, these hotspots of marine microbial biodiversity are vulnerable to present-day reef degradations (Chiarello *et al.*, 2020). The actual described fish microbiomes represent a very thin fraction of the reef fish tree of life. They have mostly been delineated in herbivores and corallivores species because of their respective ecological roles in seagrass regulation and in the enhancing of microbe dispersal (*i.e.* pathogens and symbionts) through corals (Raymundo *et al.*, 2009; Nicolet *et al.*, 2018; Ezzat *et al.*, 2020; Grupstra *et al.*, 2021). For example, herbivorous fishes play a pivotal role in the mitigation of macroalgal colonization, also known as coral-macroalgal phase shift

(CMPS). CMPS is a recursive phenomenon in worldwide reefs, impacting reef fish assemblage, trophic structure and coral reef habitat (Hughes *et al.*, 2017; Woodhead *et al.*, 2019; Bellwood *et al.*, 2019). In that way, the comprehension of the enteric microbiome of herbivorous foraging activity (Scott *et al.*, 2020), detoxification and degradation of potential chemical and complex molecules (Hay, 1988; Miyake *et al.*, 2015, 2016), or the settlement in a macroalgae dominated reef (Cheutin *et al.*, 2021), provoked interest. Although herbivorous fishes have received the lion's share of ecological surveys, carnivorous fish act as a major regulator through top-down control of populations, and may be beneficial for the health of the reef avoiding invaders such as the Crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* from Indo-Pacific reefs (Cowan *et al.*, 2020; Kroon *et al.*, 2020). Additionally, they constitute a consequent part of the artisanal fisheries (*i.e.* grouper, snapper, *Carangidae* families) reaching a biomass that can exceed 200g/m² in some reefs (Kulbicki *et al.*, 2009). The various diets within carnivorous fishes and prey items associated is expected to generate a strong variability between microbiomes which may greatly differ from those of herbivores (Clements *et al.*, 2007; Urrutia-Cordero *et al.*, 2015; Egerton *et al.*, 2018). Further studies corroborated that herbivores were highly distinct from other fishes, with a dominance of *Firmicutes* (Mountfort *et al.*, 2002; Clements *et al.*, 2007). In contrast, the other marine non herbivorous fish species appeared to be highly constituted by *Proteobacteria* (Egerton *et al.*, 2018; Miyake *et al.*, 2015) of which dominant genera such as *Vibrio* and *Photobacterium* are the most common described (Egerton *et al.*, 2018; Givens *et al.*, 2015; Smriga *et al.*, 2010) and which might play a key role in digestion (Ray *et al.*, 2012). The prediction of host functional characteristic and phenotypes using microbiome traits is a topic of utmost interest (*e.g.* in human and cattle) (Ross *et al.*, 2013). For instance, they could improve host's diagnostic assessment in the case of pathology, the description of their functional role in their environment, the characterization of their nutritional quality, as well as the prediction of their variability. This holds particularly true for

fishes which are pivotal for ecosystems functioning and of social benefits. One important prerequisite for such analysis in coral reef fishes is to have a robust knowledge of their microbiome with an adequately number of sample size that cover most of the functional diversification and trophic guild.

Our general objective is to improve the trophic characterization of marine fishes by providing new traits based on gut microbiomes. To this end, we analyzed the fish gut microbiome variability within a large data set covering two oceanic regions and trophic guilds, including the up to date poorly described group of carnivores. More specifically, we assessed the taxonomic and phylogenetic diversities of the gut microbiota and predict the microbial associated functions in order to identify specific traits related to nutritional pathways. Furthermore, we used the trophic structure model based on the study of Paraviccini et al., (2020), in which we predicted the assignation of the trophic guilds to 8 classes: “Herbivores, Microvores, Detritivores, Planktivores, Corallivores, Sessile invertivores, Microinvertivores, Crustacivores, Macroinvertivores and Piscivores. Such information will provide a better description of the diversity and the understanding of the role of the microbiome in trophic interactions in coral reef fishes.

Material and Methods

1) Sampling collection

Fish has been collected in four islands surrounded by coral reefs between 2018 and 2019. Three, Europa (- 22° 20' S , 40° 22' E), Juan de Nova (- 17° 03' S, 42° 43' E) and the archipelago of Seychelles (- 4°41' S , 55° 26' E), were located in the Western Indian ocean and one, the Martinique island (14° 38' N , - 61° 01' W), was located in Caribbean Sea. Sampling collection was made using hand lines, traps, underwater nets, and harpoon. After capture, collected fishes were immediately killed by cervical dislocation (following the European directive 2010/63/UE) and frozen into ice on boat until dissection under laboratory sterile condition of the gut intestinal tract, following the protocol of Clements *et al.*, (2007). Then, gut contents were immediately conserved at -80°C until DNA extractions. Taxonomic identification of fish was proceeded using the reference book on reef fishes from the West Indian Sea (Taquet and Delinguer, 2007) and the Florida Caribbean Bahamas (Humann and DeLoach, 2014). Using the reference database of FishBase (Froese and Pauly, 2021) we classified fish species into the three nutritive groups, herbivorous, carnivorous and omnivorous and determine their corresponding trophic level, from 2 (*e.g.* detritus and algal feeding fish) to 4.5 (*e.g.* piscivores). Because trophic guilds of carnivores are very broad, we used the predictions made by the Bayesian phylogenetic model of Parravicini *et al.*, (2020) on 615 reef fish species, where carnivores are declined in crustacivores (*e.g.* feeding on large Crustacea such as Decapoda and Stomatopoda), macroinvertivores (*e.g.* feeding on large Mollusca such as Bivalvia, Gastropoda or Polyplacophora, and Echinoidea and Ophiuroidea), microinvertivores (*e.g.* feeding on worms, Arachnida, Pycnogonida or small crustaceans), piscivores (*e.g.* feeding on Actinopterygii and Cephalopoda) and sessile invertivores (*e.g.* feeding on Asteroidea, Bryozoa, Holothuroidea or Tunicata). Trophic guilds of omnivores is imprecise. We therefore decline

them in planktivores (*e.g.* feeding on zooplankton and cyanobacteria) and corallivores (*e.g.* feeding on Anthozoa and Medusozoa) (**Supplemental Table 1**).

2) 16S rDNA barcoding proceeding

A total of 200 mg of homogenized intestinal contents was used to extract the total genomic material using the MagAttract PowerSoil® DNA kit according to the manufacturer instructions (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) with automated processing and liquid handling system (Thermo Scientific KingFisher Flex™). Molecular water was used for the elution of nucleic acids (Merck Millipore™) which were finally quantified on a Thermo Scientific NanoDrop 8000™ spectrophotometer. The hypervariable regions V3-V4 of the 16S rDNA gene were targeted with the universal primers 515F-Y(5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (Parada *et al.*, 2016) specifically sequence-adapted in the 5' ends for the Illumina platform. A PCR reaction of 25 µL was prepared with 12.5 µL Taq Polymerase (Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer), 0.5µL forward primer (10µM), 0.5µL reverse primer (10µM), 1µL template DNA, 0.75µL DMSO, and 9.75µL molecular water. PCR amplifications protocol began with an initial denaturing step (98°C ; 30 sec), following by 35 cycles of amplification (denaturation: 98°C for 10 sec ; annealing: 60°C for 1 min ; extension: 72°C for 1.5 min), and a final extension step (72°C for 10 min). Electrophoresis on a 2.0 % agarose gel confirmed the amplification and the primer specificity of a ~450 bp amplicon size. Triplicate was made for each sample in order to send an equal pool of a final 50 µL amplicon product to the Illumina Miseq sequencing platform (INRA GeT-PlaGE platform, Toulouse, France) using the 2x250bp Miseq chemistry.

All analyses were carried out with R software 4.0.2 (R Core Team, 2020) and are available on GitHub: <https://github.com/mccheutin/Trophic-guilds>.

Sequence reads were processed using the DADA2 pipeline (v1.12.1) in R (Callahan *et al.*, 2016). Briefly, sequences were cleaned, inferred in Amplicon Sequence Variants (ASVs) (Glassman and Martiny, 2018) and the taxonomy performed using the SILVA reference database (*release 132*) (Quast *et al.*, 2013). The ASV's count table, their taxonomy and their sequences were organized in a phyloseq object using the phyloseq package (version 1.28.0) (McMurdie and Holmes, 2013). Eukarya and organite sequences were removed from the phyloseq object and a final dataset constituted by 5 614 276 sequences (15 246 ASVs) ranging from 478 to 38 540 sequences by sample was obtained.

3) Computation of the core gut microbiome and its functional genes predicted

To avoid satellite ASVs which are ASVs which may be only transient in the gut microbiome (Berg, 1996; Koch *et al.*, 2013; Martinson *et al.*, 2011), we examined the species abundance distribution (SAD) patterns for each ASV and identified which ASVs might belong to the core and to the satellite (Magurran and Henderson, 2003). An index of dispersion (*i.e.* the ratio of the variance to the mean abundance -VMR- multiplied by the occurrence) was thus calculated for each ASV and was compared to a Poisson distribution (*i.e.* stochastic distribution). ASVs belonged to the core if their distribution were between the 2.5 and 97.5% confidence interval of the χ^2 distribution (Krebs, 1999).

Functional predictions were then assessed using the bioinformatic tool Tax4Fun2 v.1.1.5 (Wemheuer *et al.*, 2020) with a clustering threshold set at 99%. The predicting functional profiles were then proceeded using the blast identity to reference at 90%. To avoid KOs which might be a source of false functional redundancy, we cleaned 1 771 KOs (21%) implied in several different metabolic pathways. For the analysis of the metabolic pathway at level B, we cleaned pathways which are not indicators of a particular function such as "NA", "general function prediction only", "function unknown", "enzyme families", "others". To

facilitate the analyses of the KOs, we created a phyloseq object using the environmental table of the gut microbiome and changed the `otu_table()` and `tax_table()` by the KOs table (transformed in relative contribution) and the functional level declinations.

4) Statistical analysis on alpha diversity

All statistical analyses on microbial taxonomy were proceeded on the ASVs core. A first description of the core is printed to Phylum, Class and Genus levels and we aimed to detect new genera which have never been attributed to fish or even to carnivorous. Broadly, the description of the top 10 functional pathways at level B was illustrated between diets predicted by Parravicini *et al.* 2020.

Then, the alpha diversity is measured on a rarefied enteric core made with a random sequence sub-sampling within each sample using the function ‘rarefy_even_depth’ from the phyloseq R-package version 1.28 (McMurdie and Holmes, 2013). We used the Good’s coverage estimator (Chao *et al.*, 1988) to ensure that coverage was still excellent after rarefaction. Taxonomic diversity is measured with the index of Shannon H exponentially transformed to express it as an effective number of species (ENS) (Jost, 2006), and its phylogenetic equivalent with the index of Chao1 (Chao, 1984). Alpha-diversity indices were compared between trophic guilds and diet predicted by the model of Parravicini using a Kruskal-Wallis (KW) test (999 permutations) in the vegan R-package followed by a post-hoc Dunn test (999 perm, p-value corrected by Bonferroni method). The correlation between trophic positions and alpha diversity values was tested using the Spearman rank correlation (999 permutations).

In order to test if the pathogenetic load might be correlated to the vacuity of the microbial niche, to the microbial homogeneity or to the trophic level, we targeted two opportunistic and pathogen genera *Vibrio* and *Staphylococcus*. *Vibrio* is a dominant Genus

known to be implied in several metabolism way as chitin (*i.e.* Raimundo *et al.*, 2021) but might also be an opportunistic bacterium (Hendrikson and Zenoble, 1983). As such, we tested if low diversities (with the Shannon entropy and the dispersion of the beta diversity) and trophic position might influence the load of a potential opportunistic bacteria *Vibrio* and a known pathogen Genus *Staphylococcus*. We calculated their abundance from the rarefied core in each host and tested their correlation with Spearman test against the Shannon entropy, the distance to the centroid (calculated with `betadisp()` from the package `vegan`) and the trophic position.

5) Statistical analysis on beta diversity

To understand the effect of the diet on the gut bacteriome variability and on the Kegg orthologs (KOs), we calculated the dissimilarity matrix based on relative abundances of ASVs and KOs with the Bray-Curtis, weighted (W-Uni) and unweighted (U-Uni) Unifrac (Lozupone and Knight, 2005) distances and visualized their assembly by diet predicted in a two dimensional Principal Coordinates Analysis (PCoA). The effect of diet on beta-diversity changes was tested with a permutational analysis of variance (PERMANOVA) proceeded with the `adonis` function from the `vegan` package. The variability of the beta-diversity between dietary strategy, measured as the distance to the centroid for each sample with `betadisp()` function, was tested with Kruskal Wallis (999 permutations). The correlation between dispersion and the trophic level was tested with Spearman test.

In order to detect the biomarkers of microbial lineages and biomarkers of functional gene predicted with associated metabolic pathway at level B which might significantly marked a type of diet, we used a LEfSe approach (Linear Discriminant Analysis based on Effect Size) (Segata *et al.*, 2011) on both large trophic guilds (*i.e.* herbivores, carnivores and omnivores) and on the dietary categories predicted by Parravicini *et al.*, 2020.

216 Because some metabolisms are known to be associated to carnivorous diets, we targeted
217 functions which are associated to metabolisms of the urate, chitin, lipase, carnitine,
218 carbohydrate and amino-acid such as glutamine, glutamate, alanine and purine (Muegge *et al.*,
219 2011; Montague *et al.*, 2014; German *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Leigh *et*
220 *al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018). On the other hand, we targeted functions associated with amylase
221 and cellulase metabolisms which might be associated with herbivores (Mountfort *et al.*, 2002;
222 Wu *et al.*, 2015; Ngugi *et al.*, 2017; Leigh *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2020). Because it was hard
223 to detect any signal at the diet predicted level, we illustrated the most contrasted functions
224 through a heatmap using the function heatmap().

225

Results

Description of the gut bacteriome

In order to evaluate the effect of the diet on the core microbial composition (representing 81% of the total sequence dataset) and predicted functions, a total of 1 090 309 high-quality 16S rRNA effective sequences were obtained from 102 herbivores, 3 371 577 from 246 carnivores and 373 871 from 30 omnivores (**Supplemental Table 1**). On average, 10 689 sequences per herbivore samples were harvested (ranging from 384 - 35 588), 13 705 sequences per carnivore samples (from 158 to 38 382) and 12 462 per omnivore samples (from 950 to 30 948). To avoid misestimation due to the variation of the sequence abundance between samples, we used a normalized dataset of relative abundance for the analysis. The rarefaction curve on the core microbiota was performed at 1 060 sequences/sample, resulting in a 99 ± 1.6 % coverage according to Good's estimation (**Supplemental Figure 1**).

Globally, the bacteriome was constituted by 32% of *Firmicutes* (of which 27.5% were *Clostridiales*), 30% of *Proteobacteria* (15,7% of *Gammaproteobacteria* and 10.9% of *Alphaproteobacteria*), 10% of *Planctomycetes* and 7% of *Bacteroidetes* (**Figure 1.A**). Classes of *Clostridia* (mainly represented by genus *Clostridium_sensu_stricto_1*), and *Gammaproteobacteria* (mainly represented by genera *Photobacterium* and *Vibrio*), dominated the crustacivore and piscivore guilds, respectively, while the herbivore, microvore and detritivores guilds (HMD) and sessile invertivores had more dominant classes with a relevant contribution of *Planctomycetia*, *Clostridia*, *Bacteroidetes* and *Alphaproteobacteria* (**Figure 1.B and 1.C**).

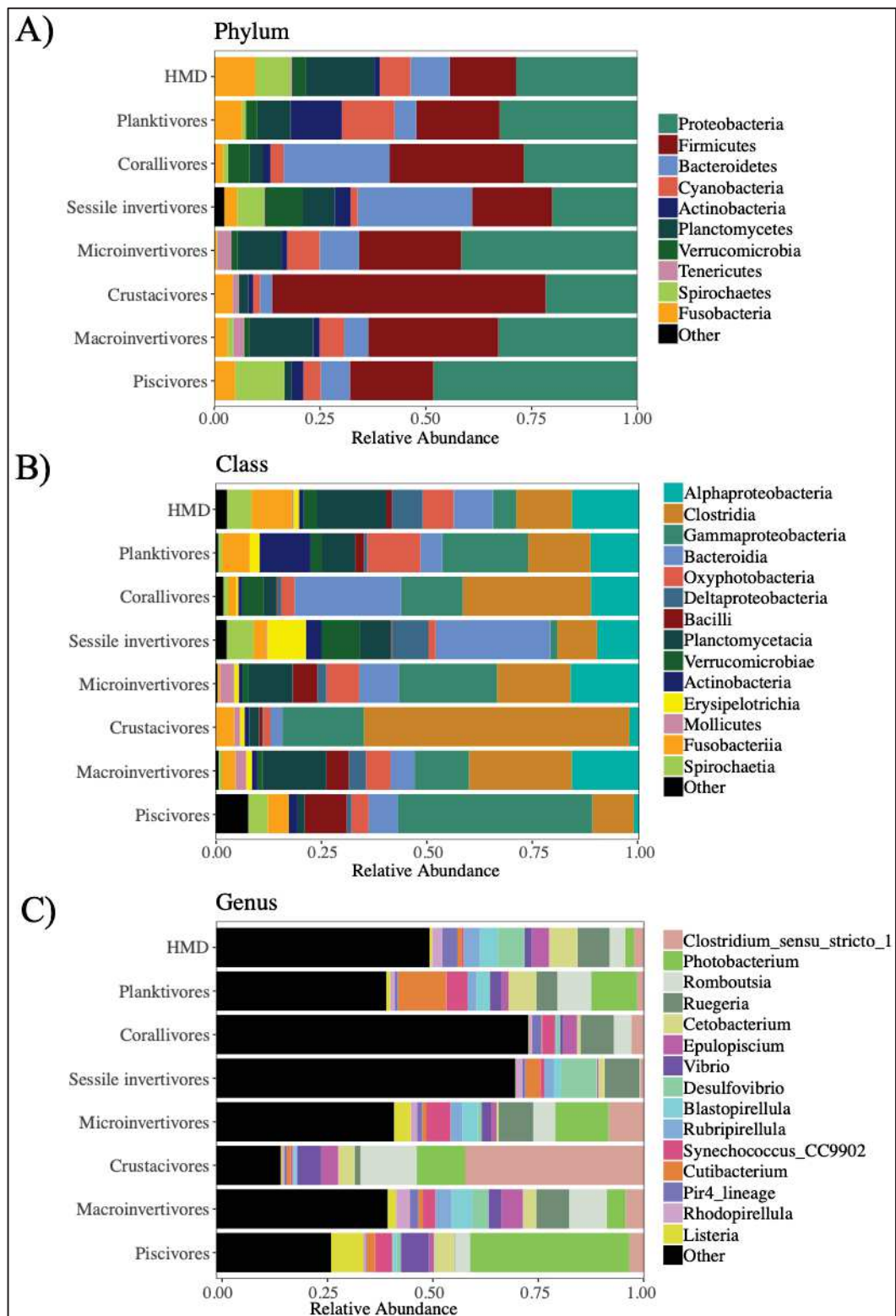


Figure 1 : Relative composition of the core gut microbiome of coral reef fishes according to their predicted diet modelled by Parravicini et al., 2020. Microbial constitution are represented in levels of (A) Phylum, (B) Class, and (C) Genus. *HMD = Herbivores Microvores Detritivores

250 *Correlation between alpha diversity and trophic position*

251 The alpha diversity is highly influenced at both trophic guild levels (Shannon : KW = 34.5 ; p
252 < 0.001 ; Chao1: KW = 31.1 ; p < 0.001) and between intra-dietary classes (Shannon : KW =
253 121.7 ; p < 0.001 ; Chao1: KW = 104.9 ; p < 0.001) with significantly higher taxonomic and
254 phylogenetic diversity in herbivores (Shannon: $X = 39.8 \pm 37.9$; Chao1: $X = 102 \pm 89.4$) than
255 omnivores (Shannon: $X = 17.3 \pm 17.1$; Chao1: $X = 54.3 \pm 56.8$) than carnivores (Shannon: X
256 = 17.4 ± 16.9 ; Chao1: $X = 47.9 \pm 38.6$) (**Table 1 ; Figure 2.A**). Inside the carnivorous guild,
257 the diversity is also highly variable with higher richness in sessile invertivores (Shannon: $X =$
258 28.8 ± 13.3 ; Chao1: $X = 77.2 \pm 27.5$) and lower in piscivorous fishes (Shannon: $X = 5.7 \pm 4.5$
259 ; Chao1: $X = 19.9 \pm 12.7$). Comparing the diversity indices between trophic positions, we found
260 a significant negative correlations for both indices ($r_s = -0.45$; p < 0.001) (**Figure 2.B**).

261

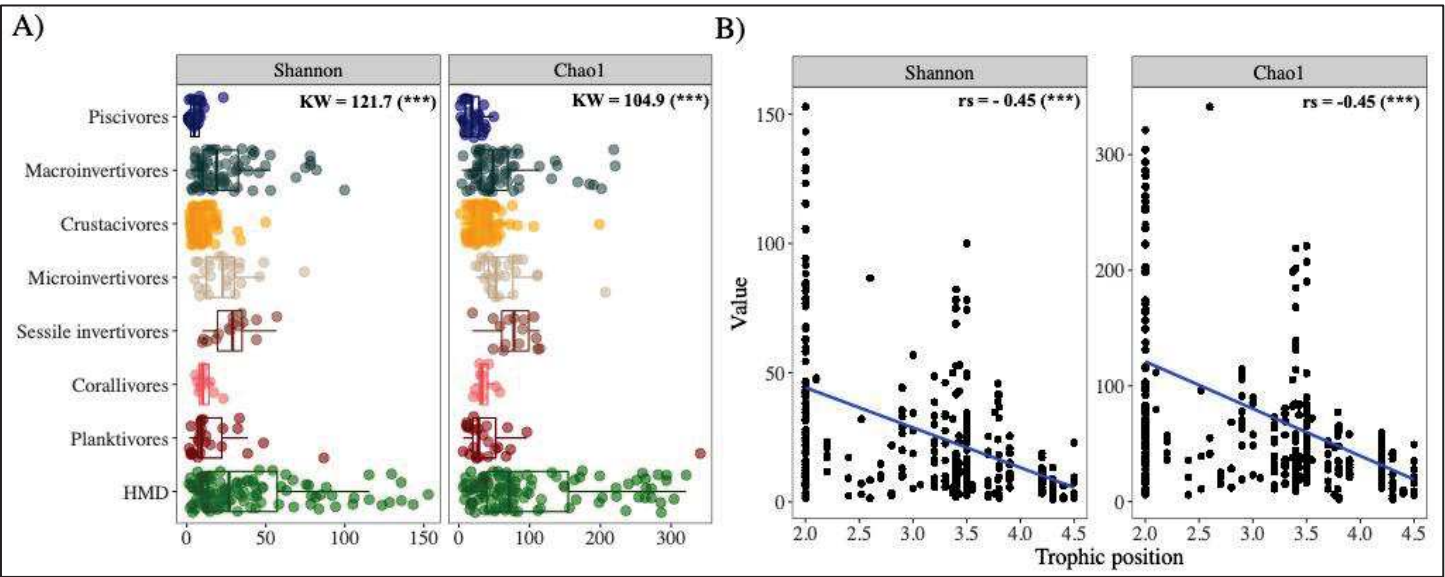


Figure 2 : Alpha diversity of gut bacteriome expressed in taxonomic diversity with the Shannon's index H exponentially transformed in Effective Number of Species (ENS) and the phylogenetic equivalent with the Chao1 index. **(A)** Alpha-diversity boxplots of 8 dietary classes predicted by Parravicini et al., 2020. Significant results ($p \leq 0.05$) ensuing from Dunn pairwise tests are available in the **Table 1**. **(B)** Correlation between alpha-diversity and the trophic position of species. Codes for p-value: *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not (NS). HMD* = Herbivores Detritivores Microvores

262

263 **Table 1 : P-values resulting from the pairwise Dunn test** on the taxonomic richness (lower half) and phylogenetic diversity (upper half) on the
 264 dietary classes at high levels (in upper case) and finer levels following the classification of Parravicini et al., 2021 (lower case). Significant p-
 265 values ($p \leq 0.05$) are indicated in bold.

	HERBIVORES	OMNIVORES	Planktivores	Corallivores	CARNIVORES	Sessile invertivores	Microinvertivores	Crustacivores	Macroinvertivores	Piscivores
HERBIVORES		0	0	0.07	0	1	1	0	0.16	0
OMNIVORES	0		-	-	0.37	-	-	-	-	-
Planktivores	0	-		1	-	0	0.03	1	0.18	0
Corallivores	0.13	-	1		-	0.05	0.45	1	1	0.89
CARNIVORES	0	1	-	-		-	-	-	-	-
Sessile invertivores	1	-	0.04	0.20	-		1	0	0.39	0
Micro- invertivores	1	-	0.48	1	-	1		0	1	0
Crustacivores	0	-	1	1	-	0	0		0	0.05
Macro- invertivores	1	-	0.24	1	-	1	1	0		0
Piscivores	0	-	0.04	0.48	-	0	0	0.42	0	

266

Influence of the diet on the structuration of bacteriome communities.

The microbial constitution markedly differed among guilds with significant PERMANOVA results when considering the 8 dietary strategies (*i.e.* predicted from Parravicini *et al.*, 2020) (PERMANOVA for BC : $R^2 = 0.11$; $p = 0.001$) (**Figure 3.A** ; **Supplemental Figure 2.A and 2.B**) and within carnivores (*i.e.* all the dietary strategies without the Herbivores Detritivores Microvores) (PERMANOVA for BC : $R^2 = 0.13$; $p = 0.001$) (**Supplemental Figure 2.C and 2.E**). A PCoA ordination of bacteriome dissimilarities based on the Bray-Curtis matrix showed the separation of two clusters with crustacivores/piscivores on one side and HMD/corallivores/microinvertivores/planktivores on the other side (**Figure 3.A**). The dispersion of the beta diversity was significantly explained by the trophic guild for Bray-Curtis (KW = 23.38 ; $p = 0.001$), the Unweighted (KW = 37.77 ; $p < 0.001$) and the Weighted Unifrac (KW = 36.73 ; $p < 0.001$) metrics and was negatively correlated with the trophic level as for BC ($r_s = -0.12$; $p = 0.025$) and W-Uni metric ($r_s = -0.10$; $p = 0.045$) (**Supplemental Figure 3**).

In order to detect bacterial lineages affiliated to a type of diet, we used a LEfSe approach on the trophic guild (carnivores/herbivores/omnivores) and on the dietary classes predicted by Parravicini *et al.* (2020). We did not detect any biomarkers for the 8 dietary classes tested but these later exhibited unique genera. These genera were rare and collectively represented less than 1% of the global core (**Table 2**). For trophic guilds (*i.e.* carnivores, herbivores, omnivores) however, biomarkers ($|\text{LDA score}| > 2.0$) were detected for each one of them. Herbivore biomarkers were affiliated to *Nostocales* (5.7 % of the total herbivorous bacteriome), *Bacteroidales* (9.4 %), *Brachyspirales* (precisely Genus *Brachyspira* (3.4 %), *Fuerstia* (0.09 %), *Ascidiaceihabitans* (0.09 %), *Pirellula* (1.01 %), *Labrenzia* (1.00 %) and *Actibacter* (0.2 %). For carnivores, biomarkers were affiliated to *Ruminococcaceae* (2.0 %), *Alistipes* (0.4 %) while *Phormidiaceae* (0.2 %), *Spongiibacteraceae* (represented mostly by

BD1-7_clade and constitutes 0.2 % of the total omnivorous bacteriome), *Marivita* (0.09 %) characterized the omnivorous diet (Figure 3B).

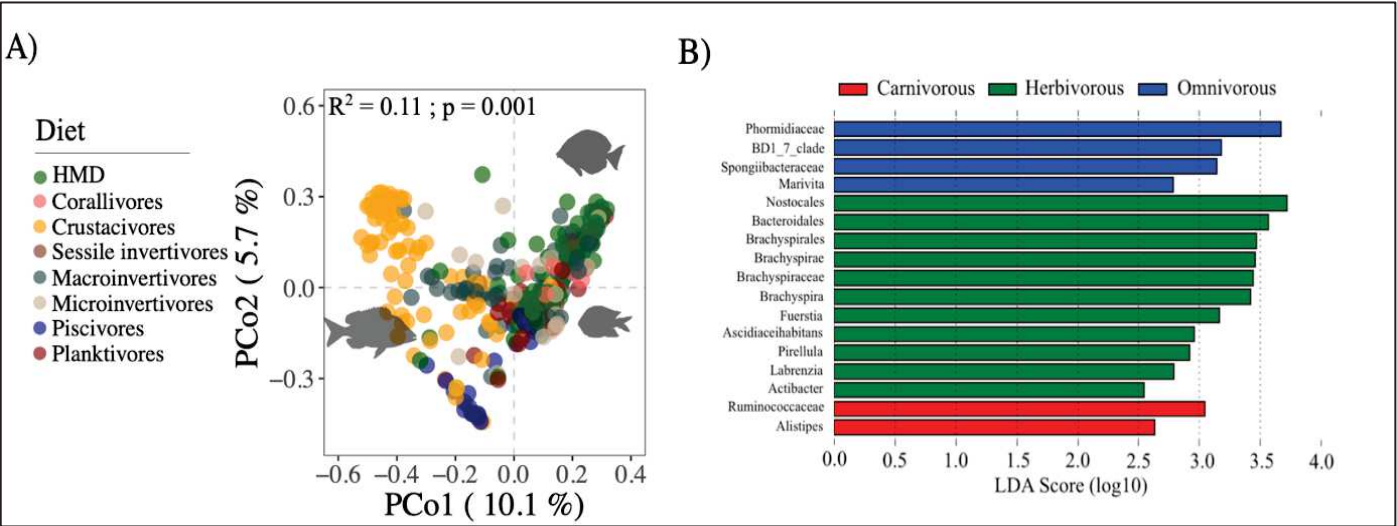


Figure 3 : Gut core microbial variability in dietary classes. (A) Principal Coordinates Analysis on the core gut microbiome according to the diet predicted. PERMANOVA proceeded indicated that this effect explained significantly 11% of the variability of microbial composition. (B) The LEfSe result obtained does not indicate any discriminant at diet predicted level but exhibited significant (LDA score ≥ 2.0) Genera at trophic guild scale (carnivore in red, herbivores in green and omnivores in blue). HMD* = Herbivores Detritivores Microvores

Correlation between diversity, trophic level and the abundance of *Vibrio* and *Staphylococcus*

Finally, we investigated the effect of the diversity and the trophic position on *Staphylococcus* and *Vibrio* relative abundances which respectively represent 0.2% and 2.1% of the gut core. *Staphylococcus* relative abundances were correlated with the Shannon entropy ($r_s = 0.07$; $p = 0.01$) and with the beta variability of Bray-Curtis distance ($r_s = 0.10$; $p = 0.04$). *Vibrio* relative abundance was correlated with both trophic position ($r_s = 0.15$; $p < 0.001$) and beta variability for all metrics except the W-Uni (Table 3).

305 **Table 2 : Unique gut microbes found at genus level in five dietary classes.** The occurrence
306 corresponds to the number of individuals which load the genus with their mean relative
307 abundance inside their host.

Dietary class	Unique microbial taxa	Occurrence (Mean Relative Abundance $\pm$ SD)	Fish Host Description
Corallivores	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	5 (2.19% $\pm$ 1.2)	This study
	<i>Euryarchaeota</i> <i>Methanobacteriales</i> <i>Methanobrevibacter</i>	3 (0.73% $\pm$ 1.2)	This study
	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>S5- A14a</i>	2 (12 % $\pm$ 16.0)	This study
	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Peptococcus</i>	4 (0.81% $\pm$ 0.9)	<i>Lutjanus kasmira</i> (Gao et al., 2020)
Macro- invertivores	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillales</i> <i>Exiguobacterium</i>	2 (1.42% $\pm$ 1.2)	<i>Liza aurata</i> (Jammal et al., 2017)
	<i>Proteobacteria</i> <i>Myxococcales</i> <i>Pajaroellobacter</i>	2 (1.29% $\pm$ 1.6)	This study
	<i>Proteobacteria</i> <i>Diplorickettsiales</i> <i>Rickettsiella</i>	2 (0.63% $\pm$ 0.55)	This study
Crustacivores	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Angelakisella</i>	9 (0.22% $\pm$ 0.4)	<i>Sarpa salpa</i> (Escalas et al., 2021)
	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Harryflintia</i>	3 (0.42% $\pm$ 0.6)	This study
	<i>Proteobacteria</i> <i>Pasteurellales</i> <i>Pasteurella</i>	3 (0.37% $\pm$ 0.4)	<i>Salmo salar</i> and <i>Cyclopterus lumpus</i> (Sandlun et al., 2021)
Sessile invertivores	<i>Proteobacteria</i> <i>Desulfovibrionales</i> <i>Bilophila</i>	4 (0.66% $\pm$ 0.6)	This study
	<i>Elusimicrobia</i> <i>Elusimicrobiales</i> <i>Elusimicrobium</i>	2 (3.31% $\pm$ 4.1)	This study
	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Eubacterium</i>	9 (0.29% $\pm$ 0.2)	<i>Aplodactylus arctidens</i> (Clements et al., 2007) ; Mullet (Mounfort et al., 1993)
	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Ruminiclostridium_9</i>	7 (0.54% $\pm$ 0.5)	This study

	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Ruminococcaceae_NK4A214_group</i>	4 (0.48% ± 0.4)	<i>Cephalopholis urodeta</i> (Gao et al., 2020)
	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Ruminococcaceae_UCG-009</i>	3 (0.30% ± 0.4)	This study
	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Ruminococcaceae_UCG-010</i>	8 (1.6% ± 3.5)	This study
	<i>Proteobacteria</i> <i>Rhodobacterales</i> <i>Aestuariivita</i>	13 (0.16% ± 0.3)	This study
	<i>Proteobacteria</i> <i>Rhodobacterales</i> <i>Albirehodobacter</i>	2 (1.14% ± 1.1)	<i>Atractosteus tropicus</i> (Méndez-Pérez et al., 2019)
	<i>Epsilonbacteraeota</i> <i>Campylobacterales</i> <i>Arcobacter</i>	4 (0.45% ± 0.6)	<i>Ctenochaetus striatus</i> (Ezzat et al., 2019) ; Apogonidae and Pomacentridae (Pratte et al., 2016) ; <i>Salmon salar</i> (Llewellyn et al., 2017)
	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i> <i>Caproiciproducens</i>	7 (0.13% ± 0.1)	<i>Pampus argenteus</i> (Zhang et al., 2019)
Herbivores	<i>Verrucomicrobia</i> <i>Opitutales</i> <i>Cerasicoccus</i>	3 (0.49% ± 0.5)	This study
Microvores	<i>Actinobacteria</i> <i>Coriobacteriales</i> <i>Cryptobacterium</i>	2 (1.22% ± 1.4)	This study
Detritivores	<i>Proteobacteria</i> <i>Rhodobacterales</i> <i>Dinoroseobacter</i>	10 (0.17% ± 0.1)	This study
	<i>Verrucomicrobia</i> <i>Verrucomicrobiales</i> <i>Luteolibacter</i>	6 (0.18% ± 0.2)	<i>Panaque nigrolineatus</i> (McDonald et al., 2019) ; <i>Phalloceros caudimaculatus</i> (Nolorbe-Payahua et al., 2019) ; <i>Cyprinus carpio</i> (Kakade et al., 2020)
	<i>Bacteroidetes</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>NS10_marine_group</i>	7 (0.22% ± 0.3)	<i>Salmon salar</i> (Llewellyn et al., 2017)

308

309

Table 3 : Spearman correlation results between the alpha diversity (Shannon entropy), the trophic level, the beta diversity (dispersion) and the abundance of *Staphylococcus* and *Vibrio* in the core microbiome of reef fish. Significant results ($p \leq 0.05$) are indicated in bold.

	<i>Staphylococcus</i>	<i>Vibrio</i>
Entropy	r = 0.07 ; p = 0.01	r = 0.006 ; p = 0.83
Trophic level	r = 0.03 ; p = 0.29	r = 0.15 ; p < 0.001
Beta dispersion (Bray-Curtis)	r = 0.10 ; p = 0.04	r = - 0.10 ; p = 0.05
Beta dispersion (Unweighted Unifrac)	r = 0.02 ; p = 0.69	r = - 0.13 ; p = 0.01
Beta dispersion (Weighted Unifrac)	r = 0.06 ; p = 0.28	r = - 0.06 ; p = 0.25

Influence of the diet on gut bacteriome functional diversity

To explore the functions associated with coral reef fish gut bacteriomes and the influence of diet on these later, gene categories were predicted using the algorithm Tax4fun2. Overall, we found 6 707 gene categories belonging to 5 910 known enzymes, from 55 Kegg pathways (level 2). The top 10 pathways, constituting 61% of the genes predicted, were involved in transport and catabolism; cellular processes and signaling mechanisms; translation; amino acid metabolism; metabolism of cofactors and vitamins; replication and repair; transcription, energy metabolism; folding, sorting and degradation; and finally, carbohydrate metabolism (**Figure 4**). The remaining 39% predicted genes were associated to pathways such as nucleotide metabolism, biosynthesis and biodegradation of secondary metabolites, sporulation, excretory system or environmental adaptation.

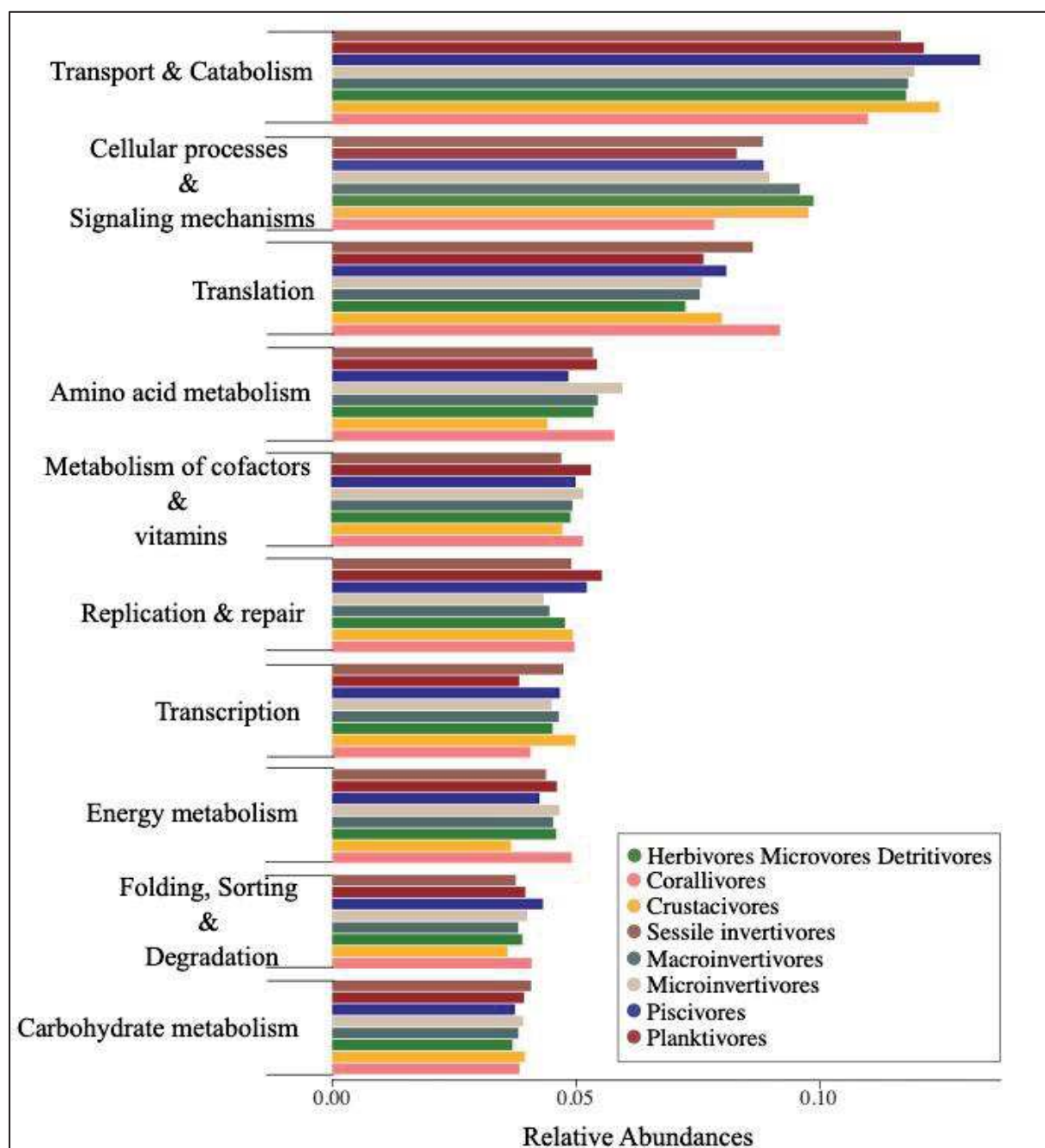


Figure 4 : Top 10 of metabolic pathways at level B related to the core gut microbiome of coral reef fishes in each predicted diets modelled by Parravicini *et al.*, 2020. Those pathways constitute 61% of the genes predicted by the Tax4Fun2 algorithm.

Sources of variation related to diet in the Bray- Curtis dissimilarity matrices calculated on KEGG pathway abundances (KO level) were explored by means of a PERMANOVA analysis and PCoA (**Figure 5.A**). Similarly to the taxonomic beta-diversity, the 8 dietary strategies represented a strong structuring factor for the gut bacteriome predicted functions

KEGG Orthologs (KO) (PERMANOVA for BC : $R^2 = 0.20$; $p = 0.001$). Concerning the predicted functions, here again, no discriminant KO was found using the LEfSe analysis ($|\text{LDA score}| > 2.0$). We obtained the same negative result when testing the level of the predicted metabolism pathway (*i.e.* level 2 of the Tax4Fun2 output). Nevertheless, we were able to detect at the trophic guild level, one KO assigned to omnivores, 8 KOs assigned to herbivores and finally 12 assigned to carnivores (**Figure 5.B**). Carnivores gut bacteriomes were characterized by an enrichment in KOs encoding for PTS (Phosphotransferase) system maltose component, ABC-2 type transport proteins, glutamate: GABA transporters, penicillin-binding protein, lysine N methylase, adenosylhomocysteine nucleosidase and alanine racemase. Herbivorous gut bacteriomes were for their part associated with encoding genes for bacterioferritin, two-component system proteins, biopolymer transport and formate hydrogenlyase transcriptional activator (**Figure 5.B**). Finally, we identified two discriminant metabolic pathways among carnivorous bacteriomes with amino acid metabolism ($|\text{LDA score}| = 2.5$) and Transcription ($|\text{LDA score}| = 3.5$) and one pathway enriched in herbivorous bacteriome with Cell motility and secretion ($|\text{LDA score}| = 3.2$) (**Supplemental Figure 4**).

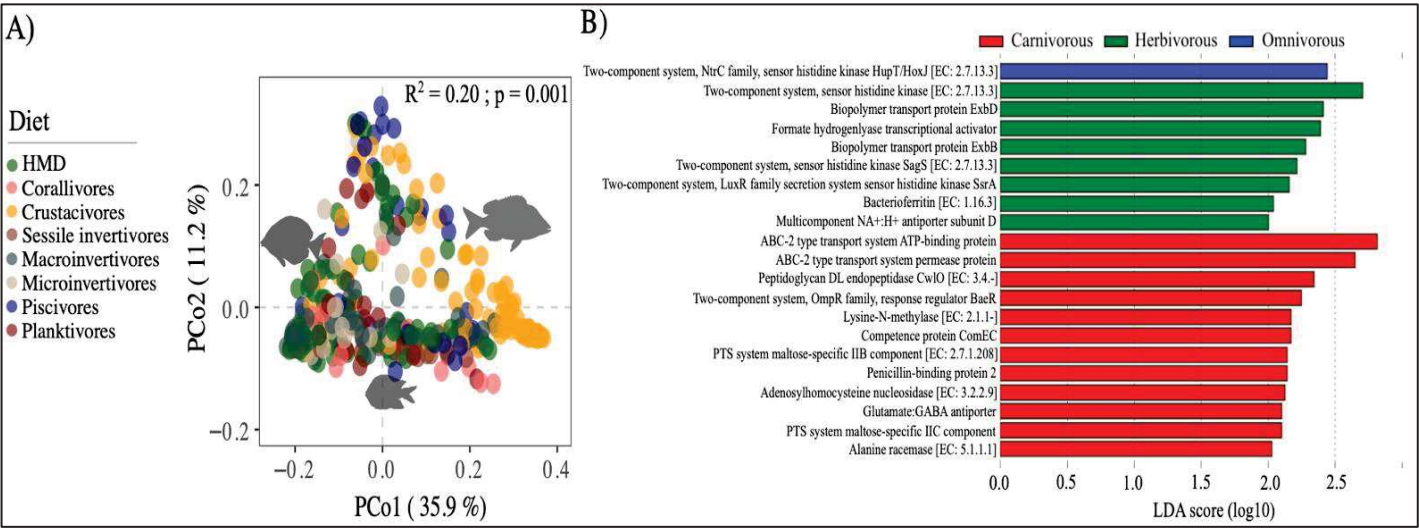


Figure 5 : Variability of the predicted functions obtain with Tax4Fun2 algorithm associated to the gut core microbiome in dietary classes. (A) Principal Coordinates Analysis on the Kegg Orthologs according to the diet predicted. PERMANOVA proceeded indicated that this effect explained significantly 20% of the variability of KOs constitution. **(B)** The LEfSe result obtained exhibited significant (LDA score ≥ 2.0) predicted genes associated to KOs at trophic guild scale (carnivore in red, herbivores in green and omnivores in blue).

347

348 *Description and comparison of carnivorous and herbivorous assigned functions*

349 Focusing on the specific predicted KEGG pathway related to degradation of certain
350 compounds such as carbohydrates, KO related to carbohydrate diacid regulator, carbohydrate-
351 specific outer membrane porin and in the RpiR family transcriptional implied in the
352 carbohydrate utilization regulator were significantly enriched in carnivores than omnivores and
353 herbivores in **Figure 6**. A similar pattern was observed for chitinolytic activities, with an
354 enrichment of KOs involved in the chitin metabolism within carnivores. This is particularly
355 true for the chitinase, the chitin binding protein and the chitin disaccharide deacetylase KOs
356 (**Figure 6**). Surprisingly, in contrast to terrestrial carnivores (Zhu *et al.*, 2018), we had not
357 found any signal of enriched genes coding for putative enzymes involved in uric acid
358 degradation in carnivores. In contrast, allantoinase, allantoin racemase, FAD-dependent urate

hydroxylase, ureidoglycolate lyase or ureidomalonnase KOs were significantly enriched in herbivorous gut bacteriomes compared to carnivorous bacteriomes (**Figure 6**).

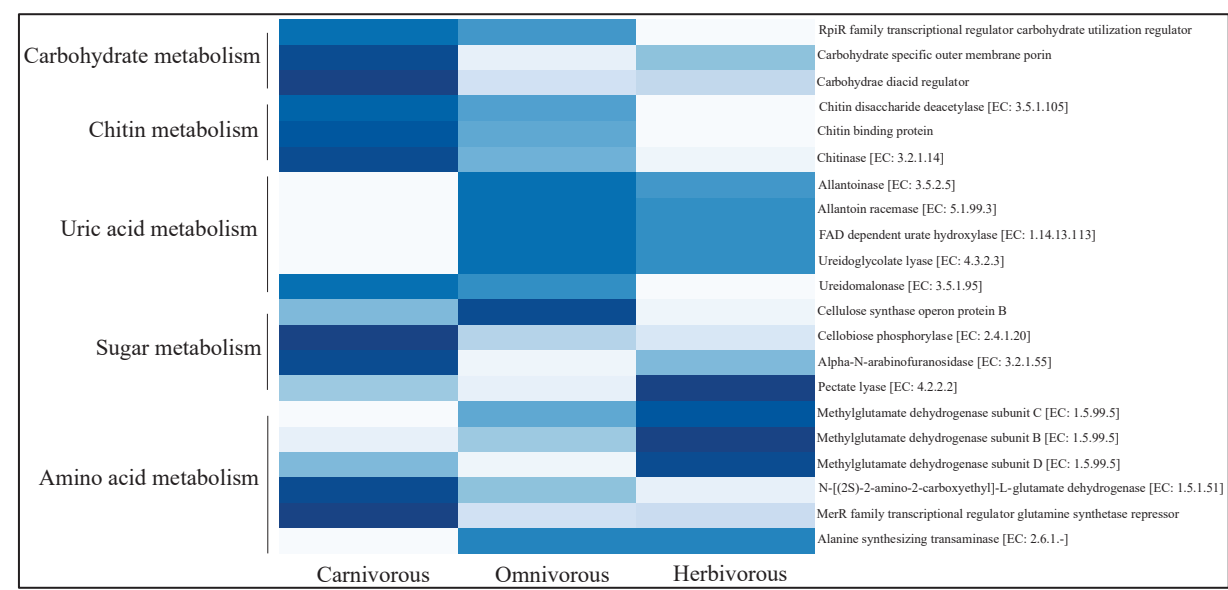


Figure 6 : Heatmap of potential functional genes predicted in the carbohydrate, chitin, uric acid, sugar and amino acid metabolisms. important for carnivores, omnivores and herbivores.

We found some genes coding for cellulase and hydrolase glycoside functions in the herbivorous bacteriome such as pectate lyase which was significantly in higher proportion than in carnivores. However, here again, the signal was not very strong concerning the other enzyme implied in this pathway. For instance, the alpha-N-arabinofuranosidase, the cellobiose phosphorylase and the cellulose synthase operon protein B are higher in carnivorous than herbivorous bacteriomes.

The enzymes implied in the synthesis and the catabolism of amino acid such as alanine-synthesizing transaminase [EC: 2.6.1.-], methyl glutamate dehydrogenase [EC: 1.5.99.5] are in higher proportion in herbivorous bacteriomes while peptidases, the MerR family transcriptional regulator, glutamine synthetase repressor and N-[(2S)-2-amino-2-carboxyethyl]-L-glutamate dehydrogenase [EC:1.5.1.51], folate and D-Glutamine and D-Glutamate metabolism are higher in carnivores (**Figure 6**).

Discussion

The role of the diet in shaping microbial richness and composition has already been described in numerous studies (Clements *et al.*, 2007; Givens *et al.*, 2015; Miyake *et al.*, 2015; Smriga *et al.*, 2010; Urrutia-Cordero *et al.*, 2015). However, we unraveled here a novel pattern in which alpha and beta diversity correlated with the trophic level of a large panel of dietary strategies (Figure 2 ; Figure 3 ; Supplemental Figure 3), confirming broad comparative observations that show decreasing alpha diversity from herbivorous to carnivorous species (Ward *et al.*, 2009; Sullam *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2014). This pattern is consistent with the higher gut bacteriome diversity observed in terrestrial herbivores (Ley *et al.*, 2008a) and seems corroborate the general idea that increasing herbivory leads to gut microbiota diversification. In terrestrial herbivores, the gut bacteriome is thought to be a major factor leading to the evolution of vertebrate and insect-based herbivory (Choat and Clements, 1998; Floeter *et al.*, 2005). Marine algae differ however vastly from the complex and refractory biomass of vascular plants primarily due to the relatively lower cellulose contents in the cell walls. In addition, most algae lack or contain only small amounts of lignin (Martone *et al.*, 2009). Hence, the gut bacteriome of marine herbivores is expected to be phylogenetically and functionally less complex than the lignocellulose-degrading bacteriome of terrestrial herbivores. Still, to process the highly complex molecules from macroalgae (*i.e.* resistant starches), herbivorous fish have evolved physiological adaptations relatively similar to terrestrial herbivores with longer digestive tracts resulting in higher retention times and an enhancement of bacterial fermentation (Mounfort *et al.*, 2002; Clements *et al.*, 2007). A recent study showed that the longer length of the herbivorous markedly influences the gut microbiota diversity (Escalas *et al.*, 2021). Compared to the shorter gut of carnivores, herbivore guts offer a larger variety of physico-chemical niches that may support a higher microbial diversity and explain the pattern

observed here. Furthermore, the degradation of complex macroalgal compounds may demand phylogenetically and functionally more diversified bacterial communities than in the carnivorous diet. As a consequence, and unsurprisingly, enteric microbes significantly clustered into two main groups (**Figure 3.A**). On one side the HMD, corallivores, microinvertivores and planktivores fishes, and on the other side, the piscivores, crustacivores and macroinvertivores.

Herbivores exhibited a strong presence of *Alphaproteobacteria* and *Planctomycetes*. Within these Classes, we identify four taxonomic biomarkers: (i) *Asciidiaceihabitans* described as key taxa associated to the health of the yellowtail kingfish (Legrand *et al.*, 2018), (ii) *Labrenzia* described in the fireworm *Eunicella labiata* for its N-acetylglucosaminidase activity in chitinolytic metabolism (Raimundo *et al.*, 2021), (iii) *Fuerstia* which has never been described in gut microbiome but is associated with the reduction of nitrite and nitrate for the unicellular microalgae *Gambierdiscus* (Rambo *et al.*, 2020), (iv) *Actibacter* (*Flavobacteria*) specialist of the enteric bacteriome of marine animals which is present in the abalone (Hyun *et al.*, 2015), the Gilt-head bream *Sparus aurata* (Escalas *et al.*, 2021) and even the dolphin bottlenose *Tursiops truncatus* (Robles-Malagamba *et al.*, 2020).

Predictions made for carbohydrate and sugar metabolism, which are essential nutritional pathways for plant-based diet, indicated that the predicted genes coding for the RpiR family transcriptional regulator carbohydrate, the carbohydrate specific outer membrane porin, the carbohydrate diacid regulator, the Cellulose synthase operon protein B, the cellobiose phosphorylase and the alpha-N-arabinofuranose were surprisingly significantly higher in carnivores and omnivores than herbivores. Yet, their contributions were previously demonstrated to play a role in algal digestion (Ray *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2016). The functions are mainly associated to bacteria of the Order *Clostridiales* which were dominant in

crustacivores in our study (**Figure 1.B**). Nevertheless, the significantly stronger activity of pectate lyase in herbivores is in line with a precedent study made on the transcriptome of the gut microbiomes of herbivorous grass carp (Wu *et al.*, 2015). This enzyme is particularly important for herbivorous that depend on its function for the digestion of pectin, a major constituent of the plant cell wall (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014).

Similarly to previous studies (Wong *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016), *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Planctomycetes* and *Bacteroidetes* collectively constituted 80% of the core bacteriome of coral reef fish and were represented by different lineages depending on the diet classes (**Figure 1.A**).

Photobacterium, *Vibrio* and *Clostridium_sensu_stricto_1* were markedly assigned to Piscivorous and crustacivores suggesting their crucial role for the metabolism of large predators and particularly in the degradation of chitin compounds present in the majority of their prey (Ringø *et al.*, 2012). For their part, no functional role has been attributed yet to *Photobacterium* and *Vibrio*. Both are however known to be fish pathogen (Hendrikson and Zenoble, 1983; Pečur Kazazić *et al.*, 2019). Vibriosis is for example one of the most prevalent fish diseases caused by bacteria belonging the genus *Vibrio* affecting many marine and fresh water fishes (Hendrikson and Zenoble, 1983). Determining the contribution of potential pathogens to reef fish microbiome might be important for the understanding coral disease transmission. Indeed, several studies shed light on the role of corallivores (*e.g.* fish, worms, echinoderms) as microbial vector through predation (Aeby and Santavy, 2006; Chong-Seng *et al.*, 2011; Nicolet *et al.*, 2018; Ezzat *et al.*, 2020) or defecation (Ezzat *et al.*, 2019) and their potential consequences in coral disease or coral dysbiosis (Ezzat *et al.*, 2019). In contrast, the role of large predators as vectors of microbes, through direct contact or via the excretion of the feces, is not well understood. Yet, thanks to their ability to migrate for hundreds of kilometers

(e.g. some groupers, emperors, jacks) (Green *et al.*, 2015), they may have an important role in microbial connectivity between reefs. We found a strong presence of potential such as *Staphylococcus* and *Vibrio* pathogens in carnivorous fishes. These genera are frequently found in marine fishes such as *Lagodon rhomboides*, *Salmo salar* and *Lutjanus kasmira* (Givens *et al.*, 2015; Dehler *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2020). The abundance of *Staphylococcus* and *Vibrio* was correlated to the trophic position and to the microbial variability (**Table 3**), suggesting that the lower diversity of bacteria in higher trophic guilds may allow installation of opportunistic or even pathogen bacteria. *Staphylococcus* is a cutaneous pathogen involved in several fish diseases (i.e. *S. xylosus*) (Oh *et al.*, 2019). Its presence in the gut might be enhanced by a low entropy. *Vibrio* is a large Genus which contain both symbiotic mutualists (i.e. *Vibrio fischeri*) (Nyholm *et al.*, 2009) but also pathogens which are involved in several diseases (vibriosis) affecting corals and shellfish species (i.e. *Vibrio coralliitycus*) (Richards *et al.*, 2018; Muller *et al.*, 2020). Coral disease outbreaks and bleaching events are often inter-related phenomena which deeply threaten coral reef systems (Miller *et al.*, 2009; Aeby *et al.*, 2016; Ushijima *et al.*, 2020). Understanding the role of reef fish as pathogen reservoir in reefs remains substantial concerning the whole coral ecosystem conservation.

Analysis of the predicted gene contained in the enteric microbiome of reef fishes pinpointed the important role it plays for the nutrition. Carnivores were enriched in genes encoding for PTS (Phosphotransferase system) maltose component which carries out both catalytic and regulatory functions related to carbon, nitrogen, and phosphate metabolisms. The intracellular maltose is cleaved and converted into glucose-1-P and glucose, which are transformed into glycolytic intermediates (Deutscher *et al.*, 2014). We observed also an enrichment in genes encoding for glutamate: GABA transporters which transform the glutamate in GABA (γ -aminobutyric acid) and would be involved in the recycling of nitrogen

through glutamate metabolism. In addition, we found a significant enrichment of the alanine racemase which catalyzes the conversion of L-alanine to D-alanine, necessary for the bacterial growth by being an essential component in the biosynthesis of cell wall peptidoglycan. The important role of catabolic enzymes in amino acids found in carnivores are consistent with other studies demonstrating that carnivorous gut microbiomes facilitate the degradation of proteins in order to generate energy for its hosts (Muegge *et al.*, 2011).

On the other hand, chitin metabolism activity was strongly associated with carnivores. While chitin might be broken down by enzymes coded by host genes, microbes such as *Vibrio* (Raimundo *et al.*, 2021) and *Photobacterium* (Itoi *et al.*, 2006), of which relative contribution were 6 folds more important in carnivores than herbivores, may play a crucial role in its degradation (Sanders *et al.*, 2015; Suzuki, 2017). Chitin is a nutritional constituent for the fish feed and is evaluated to represent the second most abundant biomass in the world after cellulose (Ringø *et al.*, 2012) forming the major structural component of many marine organisms (*e.g.* crustaceans, molluscs, protozoans, coelenterates) (Rinaudo, 2006; Khoushab and Yamabhai, 2010). Such results are congruent with other terrestrial consumers of chitin-based preys such as myrmecophagous mammals (Delsuc *et al.*, 2014), insectivorous bats (Whitaker *et al.*, 2004; Strobel *et al.*, 2013) and nine-banded armadillos (Smith *et al.*, 1998).

Regarding the functions which are markedly related to carnivores, we did find an enrichment of amino acid metabolic functions in carnivorous diets (**Figure 6**), which is in accordance with a diet rich in purine and proteins (Zhu *et al.*, 2018). However, protein catabolism during digestion generates appreciable levels of ammonia in the digestive tract of the host, leading to toxically local effects (Rubino *et al.*, 2014) without enzymes such as glutamine synthase, glutamate dehydrogenase and alanine and aspartate aminotransferases (Turner and Bucking, 2019). These enzymes have also been conserved in gut bacteriome suggesting its contribution in the ammonia detoxification. We thus expected a stronger

presence of such predicted enzymes in carnivorous, as seen in terrestrial Carnivores (Zhu *et al.*, 2018). However, the contribution of these enzymes was not higher in carnivores than herbivores, suggesting that fish carnivores are not as dependent on bacterial activity for ammonia regulation, in contrast to their terrestrial counterpart (Zhu *et al.*, 2018). Our results are congruent with the finding of Turner and Bucking (2019) who demonstrated that removing the intestinal bacteria in fish impacted intestinal activities of the glutamine synthetase and aspartate aminotransferases only in herbivores and not in carnivores.

Conclusion

We demonstrated that the enteric microbiome of coral reef fish is highly variable, both in microbial diversity but also in microbial predicted functions. This variability was very dependent of the trophic structure where functional and unique taxa are related with the dietary strategies. The functional role of these rare taxa would be deepened with transcriptional study in order to understand their potential role in ecological processes. Reef fish may also be vector of opportunistic or even pathogenic bacteria which can be transmitted to the surrounding corals. Yet, this phenomenon which might have strong ecological impact on coral system functioning has received little attention so far. Describing the gut associated microbes of reef animals, such as corallivores or sessile invertivores which live in proximity of corals, remains essential to understand such a phenomenon.

Acknowledgements

This project was funded by a grant from the CNRS INSU EC2CO “Microbien” program project BIOMEVO, a grant from the CNRS international emerging actions (IEA) program project FISH μ BIOM, the Royal Society and an ERC grant (759457) to Lancaster University and from the Explorations de Monaco program project Megafauna.

Marie Charlotte Cheutin was supported by a Ph.D grand from the French Ministry of Higher Education and Research.

A research permit was issued by Seychelles Bureau of Standards (n° FST18132), the *Terres Antarctiques et Australes Françaises* (TAAF) (decree 2019-45 of the 1st april, 2019) and the Martinique government services (decision n°122). We thank the Seychelles Fishing Authority research team, the crew of the R/V Marion Dufresne II for logistical support, assistance in the field and with sample preparation (Andrew Souffre, Rodney Melanie, Achille Pascal, Marie-Corinne Balett, Stephanie Marie, Clara Belmont). We are grateful to three trap fishers who provided boat time and fisheries expertise, and assisted with sample collection. We are grateful to the genotoul sequencing platform in Toulouse (Occitanie, France), for providing the MiSeq Illumina sequencing.

Author contributions

JCA, MCC, TB and SV conceived the study. JR, CA, EM and SV conducted the fieldwork and MCC, JCA, CXR, JBJ, EM, ES, VM, CB, RG, ER, CA dissected the fish guts. MCC and CM extracted the DNA and prepared the DNA for sequencing. MCC, CXR and JCA analyzed the data. MCC and JCA wrote the first draft of the manuscript with input from SV, TB, JR, NG, TD and CH. All authors reviewed the manuscript and contributed to the final version.

5. Déterminants extérieurs

5. I – Réponse du microbiome à la transition d'un régime corallien à un régime de macroalgue : Manuscrit E

Les récifs coralliens sont particulièrement vulnérables face au changement climatique. Depuis les années 1970, les épisodes récurrents de blanchissement de masse ont déjà causé le déclin de la couverture corallienne globale sur Terre (Hughes, 2003; Wilkinson, 2004) et menacent d'extinction un tiers des espèces coralliennes (Carpenter *et al.*, 2008; Polidoro *et al.*, 2011). Avec celles-ci, le déclin des espèces de poissons coralliens est imminent (Pratchett *et al.*, 2011; Brooker *et al.*, 2014) engendrant ainsi la perte d'une grande diversité microbienne associée aux tissus externes (Chiarello *et al.*, 2018; Pratte *et al.*, 2018) et entériques que nous avons décrite précédemment.

Parmi les nombreuses perturbations générant le déclin global des écosystèmes récifaux, le réchauffement des températures de surface est responsable de sévères épisodes de blanchissement, dont les conséquences amènent souvent à la mort des coraux. Ces phénomènes, associés à la surexploitation des herbivores et au lessivage des produits phytosanitaires dans les récifs conduisent à une prolifération macroalgale étouffant les coraux (Mumby, 2006; Graham *et al.*, 2015) (**Figure 5.1.1**).

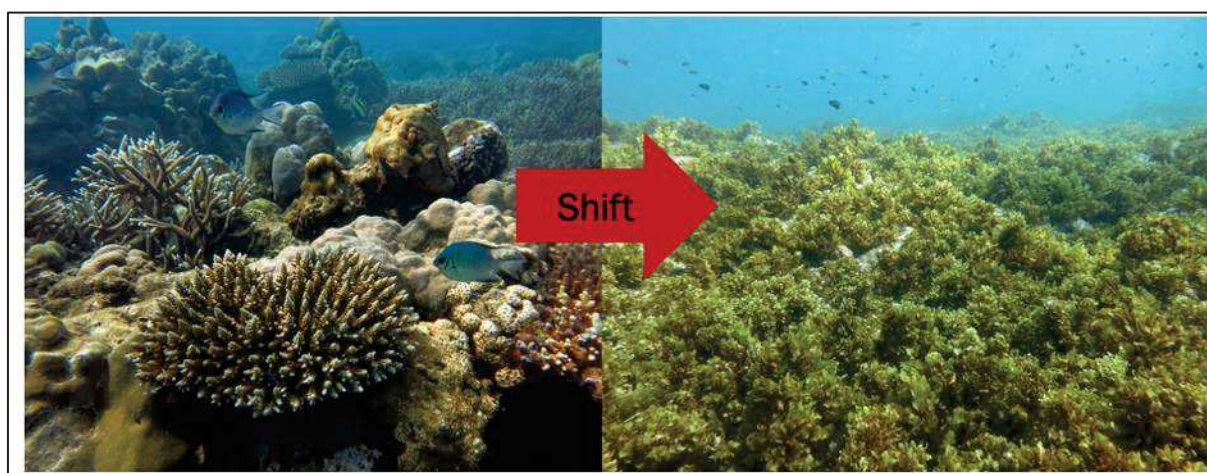


Figure 5.1.1 : Transition ("Shift") d'un récif corallien à un récif dominé par des macroalgues et du turf. Les photos ont été prises par Olivier Borde (Gauche) et Nick Graham (Droite).

L'impact de la prolifération des macroalgues sur les communautés microbiennes planctoniques et associées aux coraux, a déjà été démontré (Morrow *et al.*, 2013, 2017; Haas *et al.*, 2016). Il est alors envisageable de se demander quelle pourrait être l'influence d'une telle transition sur le microbiome entérique des poissons coralliens. Des phénomènes de dysbiose ont déjà été mis en évidence chez de nombreuses espèces sauvages subissant une dégradation de leur habitat (Amato *et al.*, 2013; Kohl *et al.*, 2014a). Cette dysbiose pourrait alors diminuer les performances fonctionnelles du microbiome, et rendre l'hôte plus fragile et vulnérable aux impacts sous-jacents (Chiarello *et al.*, 2020). Alors que les macroalgues prolifèrent de plus en plus dans les récifs coralliens, identifier les mécanismes et les conséquences d'un changement benthique sur les microbiomes des espèces récifales comme les poissons est essentiel pour comprendre leur résilience et l'impact que cela pourrait engendrer sur les services écosystémiques.

Objectif du chapitre et principaux résultats

L'objectif de ce chapitre vise à **comprendre les déterminants relatifs à un changement environnemental sur les assemblages entériques microbiens des poissons récifaux.**

De ce fait, je me suis donc demandée si :

L'augmentation de la dominance algale sur les couvertures coralliennes a-t-elle une influence sur le microbiome entérique des poissons coralliens?

Pour répondre à cette question, j'ai procédé à une analyse comparative des diversités taxonomique et fonctionnelle des microbiomes entériques associés aux poissons coralliens des îles Seychelles. Les récifs de cet archipel sont victimes de nombreux épisodes de blanchissement depuis 1980 (Faure *et al.*, 1984). Ces phénomènes ne cessent d'augmenter en périodicité (Wilkinson *et al.*, 1999; Graham *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2019; Gudka *et al.*, 2020) et provoquent des changements dramatiques des communautés benthiques avec une transition d'un régime corallien vers un régime dominé par les macroalgues (Graham *et al.*, 2015). Dans un premier temps, j'ai donc exploré la diversité, la richesse et la composition associées aux bactériomes des poissons et des macroalgues. Ensuite, j'ai analysé les

conséquences de cette transition sur la diversité, la variabilité et la composition des cores bactériens, à la fois au niveau taxonomique et au niveau fonctionnel.

Les principaux résultats découlant de cette étude sont que les bactériomes entériques, très spécifiques et bien différents des microbiomes épiphytes, ne sont pas influencés par la domination des macroalgues que ce soit au niveau de la diversité, de la richesse ou de la variabilité. Toutefois, j'ai pu observer un effet significatif de cette transition sur les compositions microbiennes, avec un effet noté plus fort chez les herbivores. Cette transition s'accompagnait d'un changement des communautés de poissons herbivores avec les *Siganidae* dominant les récifs colonisés par les macroalgues et les *Scarinae* dominant les récifs à couverture corallienne non colonisés. La prédominance des métabolismes fermenteurs chez les *Siganidae* suggère que cette transition écologique n'affecte pas seulement les compositions taxonomiques des bactériomes entériques mais a également le potentiel d'affecter les fonctions écosystémiques au travers des fonctions microbiennes.

Article

Microbial Shift in the Enteric Bacteriome of Coral Reef Fish Following Climate-Driven Regime Shifts

Marie-Charlotte Cheutin ^{1,*}, Sébastien Villéger ¹, Christina C. Hicks ², James P. W. Robinson ², Nicholas A. J. Graham ², Clémence Marconnet ¹, Claudia Ximena Ortiz Restrepo ¹, Yvan Bettarel ¹, Thierry Bouvier ¹ and Jean-Christophe Auguet ¹

- ¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, 34095 Montpellier, France; sebastien.villeger@cnrs.fr (S.V.); marconnet.clemence@gmail.com (C.M.); claudiaximeno@gmail.com (C.X.O.R.); yvan.bettarel@ird.fr (Y.B.); thierry.bouvier@cnrs.fr (T.B.); Jean-Christophe.AUGUET@cnrs.fr (J.-C.A.)
- ² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK; christina.hicks@lancaster.ac.uk (C.C.H.); james.robinson@lancaster.ac.uk (J.P.W.R.); nick.graham@lancaster.ac.uk (N.A.J.G.)
- * Correspondence: mccheutin@gmail.com

Citation: Cheutin, M.-C.; Villéger, S.; Hicks, C.C.; Robinson, J.P.W.; Graham, N.A.J.; Marconnet, C.; Ortiz Restrepo, C.X.; Bettarel, Y.; Bouvier, T.; Auguet, J.-C. Microbial Shift in the Enteric Bacteriome of Coral Reef Fish Following Climate-Driven Regime Shifts. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1711. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081711>

Academic Editor: Ulrich (Uli) Stingl

Received: 13 July 2021

Accepted: 6 August 2021

Published: 11 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Replacement of coral by macroalgae in post-disturbance reefs, also called a “coral-macroalgal regime shift”, is increasing in response to climate-driven ocean warming. Such ecosystem change is known to impact planktonic and benthic reef microbial communities but few studies have examined the effect on animal microbiota. In order to understand the consequence of coral-macroalgal shifts on the coral reef fish enteric bacteriome, we used a metabarcoding approach to examine the gut bacteriomes of 99 individual fish representing 36 species collected on reefs of the Inner Seychelles islands that, following bleaching, had either recovered to coral domination, or shifted to macroalgae. While the coral-macroalgal shift did not influence the diversity, richness or variability of fish gut bacteriomes, we observed a significant effect on the composition ($R^2 = 0.02$; $p = 0.001$), especially in herbivorous fishes ($R^2 = 0.07$; $p = 0.001$). This change is accompanied by a significant increase in the proportion of fermentative bacteria (*Rikenella*, *Akkermansia*, *Desulfovibrio*, *Brachyspira*) and associated metabolisms (carbohydrates metabolism, DNA replication, and nitrogen metabolism) in relation to the strong turnover of *Scarinae* and *Siganidae* fishes. Predominance of fermentative metabolisms in fish found on macroalgal dominated reefs indicates that regime shifts not only affect the taxonomic composition of fish bacteriomes, but also have the potential to affect ecosystem functioning through microbial functions.

Keywords: coral-macroalgal shift; coral reef fish; enteric bacteriome; microbial functions; barcoding

1. Introduction

Coral reefs have increasingly been subject to critical disturbances leading to a decrease of coral cover [1], a loss of coral habitat biodiversity [2], and to a reduction in associated ecosystem services [3,4]. Among the multiple stressors driving reef ecosystem decline, sea surface warming is responsible for severe bleaching events worldwide and the subsequent mortality of corals. In addition to climatic anomalies, overexploitation of herbivore fishes and nutrient discharges derived from land run-off can reduce coral cover and enhance the proliferation of macroalgae [5,6]. Indeed “coral-macroalgae regime shifts” are frequent in post-disturbance reefs [7,8]. Increase in macroalgal cover affects the resilience of coral reefs by reducing the survival and growth of adult corals [9], and/or preventing the recruitment of juvenile corals [10]. Macroalgae also produce secondary metabolites that can induce the growth of pathogenic and fouling microorganisms, caus-

ing a physiological deterioration of the coral tissues [11] and a dysbiosis in their microbiome [12]. This shift is not only dramatic for coral fitness, but it also impacts the assemblage composition and trophic structure of the entire coral habitat [13,14] and endangers associated ecosystem services (i.e., protection of coastal communities against storms, provision of protein through reef fisheries, and generation of tourism related incomes) [3,15,16].

Among coral reef biota, fishes play a well-known central role in coral-macroalgae regime shifts since the loss of herbivorous fishes through overfishing is considered as one of the causes of dominance by macroalgae [5]. Changes in composition and abundance of fish assemblages related to coral-macroalgae regime shifts are well understood, leaving gaps in knowledge about the impact of macroalgal dominance on other ecological traits of fishes, such as their microbiota. The great diversity of coral reef fishes, with more than 6000 species described [17], combined with the high diversity of their biological traits, provide specific ecological niches both on their skin and within their bodies, which ultimately promote the development of taxonomically and functionally original microbial lineages compared to the surrounding environment [18,19]. In a recent study, Chiarello et al. (2020) [19] showed with a conservative estimation that coral reef animal microbiota may account for up to 2.5% of Earth's prokaryotic diversity, representing a hotspot of microbial diversity.

While our understanding of some components of fish microbiota such as viruses, archaea, and protists remain limited, their bacteriome has been more extensively studied in the recent years [18–22]. Most of these bacteria reside in the intestinal tract where they form complex communities and provide a range of essential functions linked to development, immunity, health, protection against pathogen invasion, and even influence behavior [23–25]. However, the most obvious and important role is the contribution of the fish bacteriome to the degradation and assimilation of large and complex molecules [20,26,27]. Evidence has accumulated that the gut bacteriome is not just a random set of microorganisms, but rather a highly variable community depending upon intrinsic fish factors such as diet or genetic background and extrinsic environmental conditions [18,21,22,28,29]. Nonetheless, our understanding of fish bacteriome variability is still scarce compared to terrestrial animals and is even more rare concerning coral reef fishes [30,31]. For example, environmental degradation or modification, such as urban sprawl and captivity, are known to have dramatic consequences on the enteric microbiome by altering the diet of wild animals, and thus impacts host fitness as observed in black howler [32,33] and other vertebrates [34–36]. Whether this impact also takes place in marine animals, and particularly the fish enteric microbiome, is poorly documented. The influence of coral bleaching induced regime shifts on coral reef fish bacteriomes remains unresolved. Furthermore, the loss of the most vulnerable fishes (i.e., corallivores) may induce an erosion of reef prokaryotic richness and their related functions [19]. Such events are clearly case studies to address fish gut microbiome responses and plasticity to environmental degradation. Moreover, understanding which bacterial lineages and associated functions are lost, and if there is compensation by other lineages, it is essential to better understand the consequences of bleaching-induced regime shifts on the functioning of coral reef ecosystems in general.

Coral reefs in Seychelles are located in the northern gyre of the western Indian Ocean (WIO), and are periodically subject to high marine heat waves with extreme SST associated with both El Niño and the Indian Ocean Dipole [37]. Severe bleaching and consequent regime shift events have occurred since the early 1980s [38] with two mass bleaching events in 1998 and 2016 that caused >90% and 70% of cover coral loss, respectively [37,39–41]. Following the 1998 coral bleaching event, Seychelles coral reefs underwent divergent trajectories, either recovering to a live coral condition or undergoing regime shifts to fleshy brown macroalgal dominance [6]. Here, we use these alternate Seychelles coral reef conditions to investigate the consequences of coral-macroalgal phase shift on the diversity and the structure of fish gut bacteriomes. First, we explored the diversity, richness,

and composition associated with macroalgae and the enteric coral reef fish core bacteriomes. Second, we assessed the consequences of the regime shifts on the diversity, variability, and composition of the core bacteriomes at both taxonomic and functional levels.

2. Materials and Methods

2.1. Study Area and Sample Collection

Seven locations were sampled around Praslin and Mahe islands in January 2019, representing 4 recovering coral reefs (RCR), and 3 macroalgal dominated (mainly *Sargassum* and green turf algae) reefs (MSR) (Figure 1).

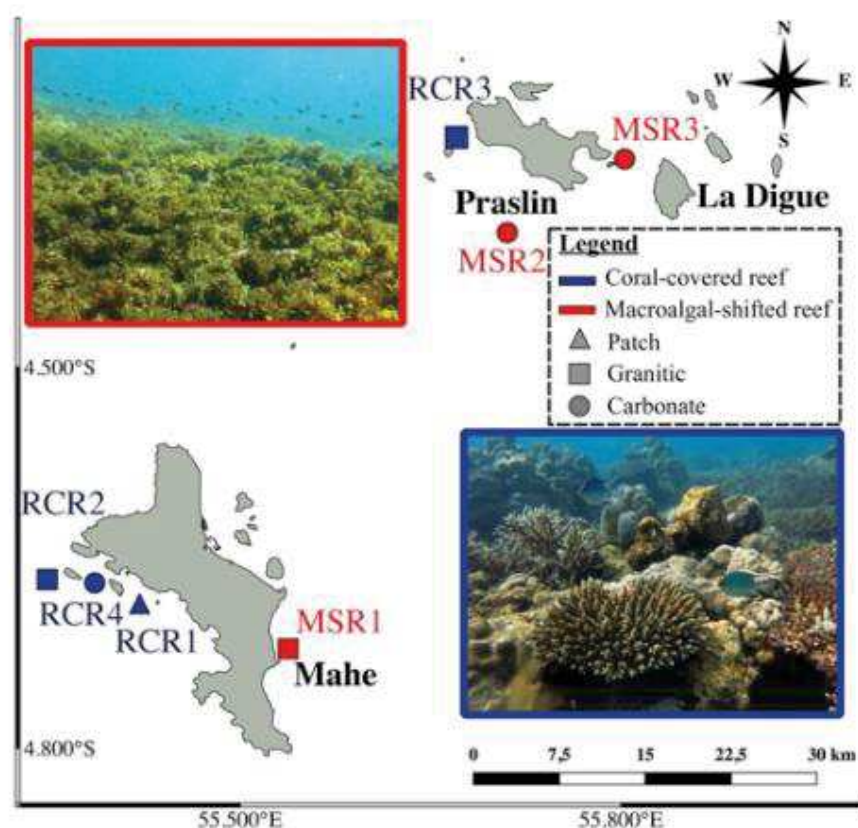


Figure 1. Sampling map of coral-dominated reefs (RCR1: RCR4 in blue) and macroalgae shifted reefs (MSR1: MSR3 in red) with their respective geomorphology (patch, carbonate or granitic). The pictures of coral-covered and macroalgae shifted reefs are represented respectively in blue squared (bottom right) and in red squared (top left). Photo credits: Nicholas A.J. Graham.

The recovering coral reefs had recovered their live coral following the 1998 coral bleaching event [6], but experienced 70% mortality in 2016, having a mean coral cover of 6% by 2017 [40]. Reef ecosystems of the Inner Seychelles support ecologically and phylogenetically diverse fish families. Species in the families *Siganidae*, *Lethrinidae*, *Lutjanidae*, *Acanthuridae*, *Scarinae*, *Mullidae*, *Labridae*, and *Haemulidae* together comprise >95% of total trap fishery catches [42]. Fish samples were collected using handlines and traps deployed from a small boat, using diverse baits (coconut, mackerel, seaweed). In order to take into account intraspecific variability of the gut bacteriome, up to 11 adult individuals of each species were sampled in each site. Immediately after capture, fishes were killed by cervical dislocation (following the European directive 2010/63/UE) and conserved on ice in coolers for dissection in the laboratory later the same day. The animal study was reviewed and approved by the Seychelles Fishing Authority (Memorandum of Understanding signed the 12 December 2018) and by the Lancaster University FST research Ethics review committee (approval number FST18132). At the laboratory (Seychelles Fishing Authority),

fishes were placed in trays, washed with 70% ethanol, and the whole intestinal tract of each fish was extracted using sterile dissection tools following the protocol of Clements et al. (2007) [43] and Miyake et al. (2015) [20]. Briefly, we squeezed out the gut content (taking care to avoid contamination by gut wall cells) into a 2 mL sterile Eppendorf tube by rolling a sterile 1 mL micropipette on the intestinal tract starting from segments posterior to the stomach (spanning the midgut and hindgut) or from the 75% most distal part of the gut for fishes lacking stomachs. Gut contents were immediately flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until ready for DNA extractions. A total of 99 fishes belonging to 36 species covering 19 genera and 9 families were sampled for their gut bacteriome (Table S1).

2.2. Fish Identification and Diet Type Definition

For all fishes, host taxonomic identification was performed using the reference book on reef fishes from the West Indian Sea [44]. Fish diet was described using categories as in Mouillot et al. (2014) [45], where Carnivores are separated into invertivores (MI) which mainly feed on mobile invertebrates (i.e., benthic species such as crustaceans) and piscivores (FC) (i.e., feeding on teleosts or cephalopods). Herbivores are divided into strict herbivores (H) eating fleshy macroalgae with browsing (*Siganidae*) and grazing (*Acanthuridae*) behaviors, and detritivores (HD) with scrappers (*Scarinae*), which bite dead pieces of coral and indirectly scrape away turf algae [46]. Finally, omnivorous fishes (OM) feed on both algae or cyanobacteria and small invertebrates (i.e., zooplankton such as copepods). We used a principal coordinates analysis (PCoA), based on Bray-Curtis dissimilarity, to illustrate their distribution through sampled sites (Figure S1). To assess the sources of variation (i.e., taxonomy and diet) in the Bray-Curtis matrix, we used a PERMANOVA analysis based on 1000 permutations [47] with the function *adonis*, in the *vegan* package [48].

2.3. DNA Extraction and 16S rDNA Gene Amplification

Total genomic DNA from 200 mg of homogenized intestinal contents and from swabs was extracted using the MagAttract PowerSoil® DNA kit according to the manufacturer instructions (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) with automated processing and the liquid handling system KingFisher Flex™ (ThermoScientific®, Waltham, MA, USA). Nucleic acids were eluted in molecular water (Merck Millipore™, Burlington, MA, USA) and quantified on a NanoDrop 8000™ spectrophotometer (ThermoScientific®, Wilmington, MA, USA). The V4-V5 region of the 16S rDNA gene was targeted with the universal primers 515F-Y(5'-GTGYCAGCMGCCGCGTAA-3') and 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') [49] coupled with platform specific Illumina adaptor sequences on the 5' ends. Each 25 µL PCR reaction was prepared with 12.5 µL Taq Polymerase Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs®, Ipswich, MA, USA), 0.5 µL forward primer (10 µM), 0.5 µL reverse primer (10 µM), 1 µL template DNA, 0.75 µL DMSO, and 9.75 µL molecular water. PCR amplifications involved the following protocol: An initial 98 °C denaturing step for 30 s following by 35 cycles of amplification (10 s denaturation at 98 °C; 1 min at 60 °C annealing; 1.5 min extension at 72 °C), and a final extension of 10 min at 72 °C. Amplification and primer specificity were verified by electrophoresis on a 2.0% agarose gel for confirmation of ~450 bp amplicon size. All samples were amplified in triplicate and equally pooled for a final product of 50 µL. Extraction of blank samples used as DNA extraction controls were also performed. None of them were successfully amplified with the primers used in this study. Each amplicon pool was sequenced using the 2 × 250 bp Miseq chemistry on an Illumina MiSeq sequencing platform at the INRA GeT-PlaGE platform (Toulouse, France).

2.4. Sequence Processing

All analyses were carried out with R software 3.6.2 (<https://www.r-project.org/>, accessed on 9 August 2021) [50] and are available on GitHub: <https://github.com/mccheutin/Seychelles.git>, accessed on 9 August 2021.

Sequence reads were processed using the DADA2 pipeline (v.1.12.1) in R [51], following the pipeline's tutorial (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>, accessed on 9 August 2021). Briefly, sequences were trimmed and filtered based on read quality profiles (maxN = 0; maxEE = (2, 2); truncQ = 2; and truncLen = (240, 240)), error correct, dereplicated and amplicon sequence variants (ASVs) were inferred [52]. Forward and reverse ASVs were merged and pooled in a count table where chimera were identified and removed. Taxonomy assignment was performed using the SILVA reference database (release 132) [53]. The ASVs count table, their taxonomy, and their sequences were organized in a phyloseq object using the phyloseq package (v.1.28.0) [54], on R. ASVs assigned to the kingdom Eukarya, Archaea, and to chloroplast, were removed before computing any further analysis. Bacterial genera known as potential kit contaminants were also removed from our datasets using the list described in Salter et al. (2014) [55]. Overall, 40 genera corresponding to 12% of the total reads were removed (Supplementary File 1). Our final dataset consisted of 1,042,080 sequences belonging to 5129 ASVs.

2.5. Defining the Core Bacteriome of Reef Organisms

As observed in many animal microbiomes [18,56], ASVs may span a range from permanent to transient inhabitants. Closely associated ASVs should be more considered when thinking about holobiont ecology [57] since these core taxa may have evolved in close association with their hosts for a long time period [58–60]. Here, core bacteriomes were independently identified by examining the species abundance distribution (SAD), patterns of each ASV, and by partitioning the SAD into core and satellite ASVs [61] for the gut (Figure S2A) and for the macroalgae (Figure S2B). For this purpose, the index of dispersion for each ASV was calculated as the ratio of the variance to the mean abundance (VMR) multiplied by the occurrence. This index was used to model whether lineages follow a Poisson distribution (i.e., stochastic distribution), falling between the 2.5% and 97.5% confidence interval of the χ^2 distribution [62]. Index values less than 1 mean that the ASV is under-dispersed compared to the Poisson distribution, so that it spreads uniformly and can be considered as a core ASV. Index values higher than 1 mean that the ASV is over-dispersed, i.e., the ASV is clustered and corresponds to a satellite ASV. Fish and macroalgae core bacteriomes consisted of 531,930 sequences (254 ASVs) and 109,550 sequences (310 ASVs), respectively. All analyses detailed below were performed on the core microbiome.

2.6. Inference of ASVs Habitat Preference

We used a BLASTn approach on the nr/nt database and the habitat-associated metadata to the closest ASV match to infer the habitat preference of the 254 ASVs constituting the enteric core bacteriome of reef fishes [22,28]. Only blast results with an identity >95% and a sequence coverage >95% were kept. Information concerning the isolation source contained in the GenBank fields "isolation source", "host", and "title" of each closest blast were extracted using a dedicated python script and parsed into "Animal", "Environment" (i.e., free living bacteria associated with sediment, soil or water), and "Other" habitat categories. For ASVs associated with animals, we further categorized the isolation sources into specific hosts (i.e., fish, marine invertebrates, terrestrial vertebrates, and unknown animals) and organ (i.e., gut, tissue, and other organs) categories (Supplementary File 2). In order to associate these habitat preferences to the phylogenetic affiliation of each ASV, core bacteriome ASVs were aligned against the silva.nr_v132 reference database using mothur v.1.35.1 ([63]; <https://mothur.org/>, accessed on 9 August 2021) before being imported into the ARB software ([64]; <http://www.arb-home.de/>, accessed on 9 August

2021) and loaded with the SILVA (v.138) reference database [53]. A base frequency filter was applied to exclude highly variable positions before adding sequences to the maximum parsimony backbone tree using the parsimony quick add marked tool implemented in ARB. The tree and the associated categories were drawn and visualized using the interactive Tree of Life (iTOL) web server ([65]; <https://itol.embl.de/>, accessed on 9 August 2021).

2.7. Computation of Alpha and Beta-diversity of Bacteriomes

In order to correct for the uneven sequencing depth among samples, 1041 sequences were randomly sub-sampled within each sample using the “rarefy_even_depth” function from the phyloseq R-package v.1.28 [54] (Figure S3A). Good’s coverage estimator [66] was 99.9 ± 0.1 indicating that the coverage was still excellent after rarefaction. Taxonomic diversity of each microbial community (fish gut or macroalgae swab) was measured using the richness (number of ASV) and the Shannon’s index H' , computed on ASV relative abundance, and later exponentially transformed to express it as effective number of species (ENS) [67]. Taxonomic dissimilarities between pairs of bacteriome samples were assessed using the Bray-Curtis dissimilarity computed on relative abundances of ASV.

2.8. Functional Diversity Predictions of Bacteriome

Using the 16S rRNA gene information, predictions of metabolic functions for Bacteria were performed using Tax4Fun2 v.1.1.5 [68] with a clustering threshold set at 99%, following the tutorial of the algorithm (<https://github.com/bwemheu/Tax4Fun2>, accessed on 9th August 2021). In order to account for all ASVs, the predicting functional profiles were then proceeded using the minimum blast identity to reference at 78%. Among the 7279 KOs predicted by Tax4Fun2, about 23% are involved in at least two different metabolic pathways (until 15 for some KOs) and 33% are unknown or hypothetical proteins. These KOs are thus not indicators of a particular function and are a source of an additional and false functional redundancy, hardly ever taken into account in the literature. To avoid this bias, we created a new functional table containing 3261 unique KOs, involved in only one metabolic pathway.

2.9. Statistical Tests

First, the gut and macroalgal bacteriomes were compared in richness and in composition by measuring the alpha and beta-diversity. In the same way, to understand the influence of the reef condition on the bacteriomes, we compared the same measures between reef conditions for both macroalgae and fishes. Since the effect of reef condition could have been masked by the effect of diet or phylogeny, we removed this by analyzing the dataset at different community levels (i.e., inside trophic guilds, family and species level). Only levels with at least a triplicate per reef condition were tested. Comparison of alpha diversity indices (richness and entropy) was achieved using a Kruskal-Wallis test (999 permutations) in the vegan R-package followed by a post-hoc Dunn test (999 perm, p -value corrected by Bonferroni’s method) in order to identify which group means differed. To determine beta-diversity changes, significant sources of variation in bacteriome Bray-Curtis dissimilarity matrices were assessed using permutational analysis of variance (PERMANOVA) with the adonis function from the vegan package.

ASV biomarkers of bacteriomes of macroalgae, carnivorous, and herbivorous fish were identified using the LEfSe algorithm [69]. The first analysis step was a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) sum-rank test allowing the detection of taxa with significant differential abundance. Biological consistency was subsequently investigated using a pairwise Wilcoxon test. Finally, linear discriminant analysis (LDA) was used to estimate the effect size of each differentially abundant taxon. Alpha values of 0.05 were used for KW and Wilcoxon tests and a threshold of 3 was used for logarithmic LDA scores. The same

analysis was used to identify functional biomarkers (i.e., KO) of the *Scarinae* and *Siganidae* bacteriomes.

3. Results

3.1. Sampling Size and Composition of Fish Catch Between Reef Conditions

The fish species distribution and sample size were highly variable among reefs. The sampling size of caught fish species was higher in recovering coral reefs (RCR), with 27 species sampled compared to 17 species in macroalgae shifted reefs (MSR). Fish community composition and fish diet behavior differed significantly between RCR and MSR (Figure S1A,B) with a higher abundance of the scrapers *Scarinae* in RCR while grazers *Siganidae* are more abundant in MSR (Table S1), conforming with the underwater visual census (UVC) data [42]. In contrast, carnivorous species, overall represented by the *Lethrinidae* and *Lutjanidae* families, were distributed in both reefs with 11 *Lethrinidae* in RCR and 15 in MSR and six *Lutjanidae* in RCR and eight in MSR. Only four species have been sampled in triplicate in both RCR and MSR (i.e., *Scarus ghobban*, *Lethrinus mahsena*, *Lethrinus enigmaticus*, and *Aprion virescens*) (Table S1).

3.2. Composition and Diversity of the Fish Core Gut Bacteriome

A total of 254 bacterial ASVs representing 63% of the total reads formed the core bacteriome of the 99 fish gut samples (Supplementary File 2). This core bacteriome was dominated by the *Proteobacteria* (dominated by the order *Vibrionales*) and the *Firmicutes* phyla (mainly constituted by the order *Clostridiales*) that represented collectively more than 67% of the sequences (Figure S4). Other less abundant phyla such as the *Bacteroidetes* (8%), *Fusobacteria* (8%), *Spirochaetes* (5%), *Planctomycetes* (3%), *Cyanobacteria* (3%), *Verrucomicrobia* (3%), and *Tenericutes* (2%) constituted the rest of the fish core bacteriome.

BLASTn analysis revealed that 70% (178) of the bacterial ASVs were closely related to sequences previously retrieved from animal microbiomes (Figure 2). In addition, 45% (115 ASV) belonged to the *Akkermansiaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Vibrionaceae*, *Rikenellaceae*, *Fusobacteriaceae*, and *Lachnospiraceae* families, and matched preferentially sequences previously reported in the intestinal tract of fish from the *Siganidae*, *Acanthuridae*, and *Scarinae* families (Figure 2, Supplementary File 2), indicating a certain degree of conservation for a significant part of the coral fish gut bacteriome.

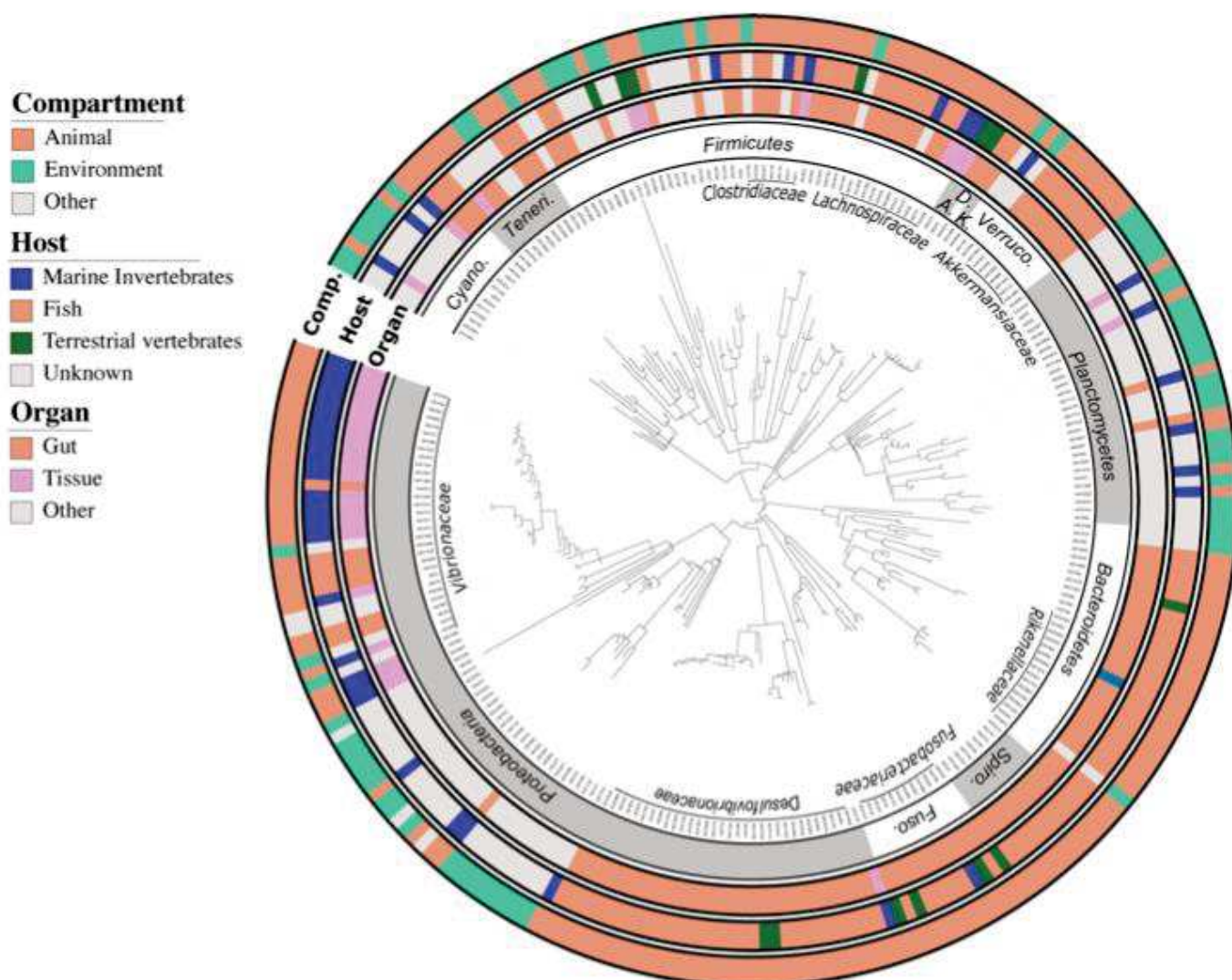


Figure 2. Maximum parsimony phylogenetic tree of the 254 ASVs from the fish gut core bacteriome. The 16S rRNA sequences were inserted into the original SILVA (release 138.1) tree using parsimony criteria with the Bacteria filter excluding highly variable positions. The inner ring represents the order level nomenclature following the taxonomy provided by default in the SILVA bacterial tree. The three outer rings depict the habitat preferences of each ASV described here as three categories (i.e., habitat, specific host, and organ) clustered from the environmental information associated with each closest blast. The tree was drawn using the web-based interface interactive tree of life (iTOL). Abbreviations: Cyano. = Cyanobacteria; Teneri. = Tenericutes; A. = Actinobacteria; D. = Deferribacteres; K. = Kiritimatiellaeota; Verruco. = Verrucomicrobia; Spiro. = Spirochaetes; Fuso. = Fusobacteria.

In addition to these fish gut specialists, 17% (44 ASV) of the core ASVs, mainly affiliated to the *Vibrionaceae*, *Pirellulaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Endozoicomonadaceae* families, were best related to sequences associated with other marine animal bacteriomes, such as corals or sponges, indicating that another significant part of the fish gut bacteriome maybe symbiotic generalists distributed among other marine organisms. The composition of fish core gut bacteriomes differed significantly (PERMANOVA $p = 0.001$; $R^2 = 0.07$) from macroalgae bacteriomes (Figure S5A) which were dominated by bacteria from the *Proteobacteria* (56%), *Bacteroidetes* (25%), and *Cyanobacteria* (10%) phyla. Both richness and diversity of fish core gut bacteriomes were half that of macroalgae bacteriomes (Figure S5B). Herbivore bacteriome shared 2.5 times more ASVs with the macroalgal bacteriome than the carnivore one (21 vs. 8) (Figure S6A), mainly belonging to the Orders *Bacteroidales* (i.e., *Rikenella*), and *Clostridiales* (i.e., *Lachnoclostridium*). Fish gut bacteriomes were also more variable in their composition than macroalgae bacteriomes as indicated by a significantly higher dispersion (Figure S5B).

3.3. Alteration of the Coral Reef Significantly Disrupts Herbivore but not Carnivore Bacteriomes

The reef condition explained a small but significant amount of the variability in bacteriome community composition among all fishes (Table 1; Figure 3A).

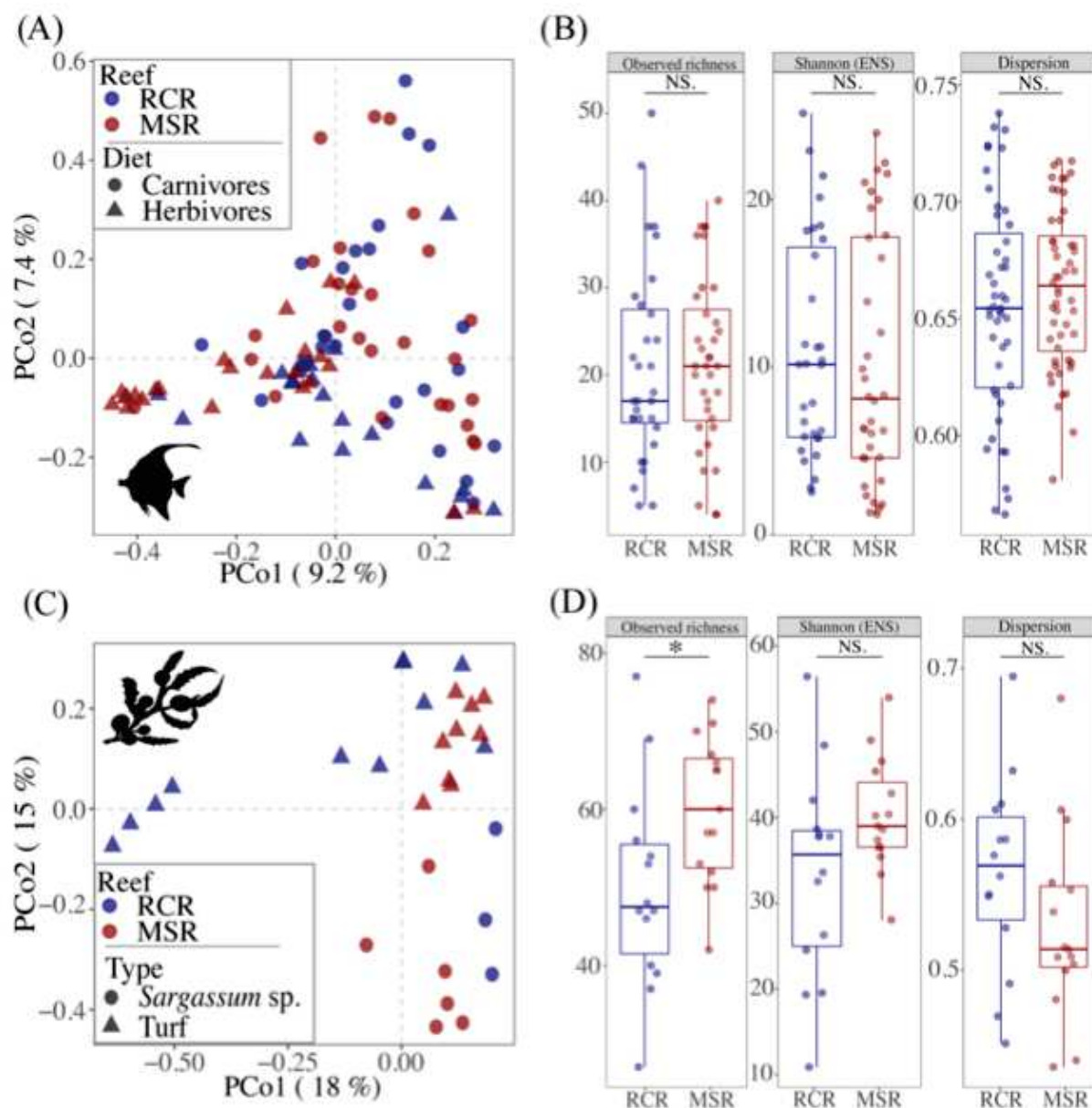


Figure 3. Comparison of the alpha and beta diversity of fish gut and macroalgae bacteriomes in function of the condition of the reef (i.e., coral covered vs. macroalgae shifted). (A and C) Principal coordinates analysis (PCoA) plots illustrating Bray–Curtis distances between pairs of bacteriome samples. Bacteriomes are colored according to the reef condition, while the shape represents (A) fish diet or (C) macroalgae type. (B and D) Boxplots representing the alpha diversity, expressed as the observed richness and the Shannon’s index H-exponentially transformed in effective number of species (ENS), and the dispersion (distance to the centroid for each sample type grouping) calculated for each bacteriome sample. Horizontal brackets indicate pairs which differ significantly: *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not (NS) with a Wilcoxon test.

Table 1. Results of PERMANOVA on the 29 core bacteriomes of macroalgae and 99 enteric core bacteriomes of reef fish (n = sampling size). For a relevant sampling size (If not “–”), diet, taxonomy and the reef condition (RCR vs. MSR) were tested (999 perms). Signif. codes for p -value: *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not (NS).

	Diet	Family	Genus	Species	Reef condition
Algae ($n = 29$)	–	–	–	$R^2 = 0.13$ (***)	$R^2 = 0.07$ (**)
Fish	$R^2 = 0.04$	$R^2 = 0.16$	$R^2 = 0.27$	$R^2 = 0.46$	$R^2 = 0.02$

(n = 99)	(***)	(***)	(***)	(***)	(***)
Herbivores		R2 = 0.14	R2 = 0.24	R2 = 0.43	R2 = 0.07
(n = 44)	—	(***)	(***)	(***)	(***)
<i>Scarinae</i>			R2 = 0.14		R2 = 0.09
(n = 22)	—	—	(**)	—	(**)
<i>S.ghobban</i>					R2 = 0.28
(n = 7)	—	—	—	—	(NS.)
<i>Siganidae</i>				R2 = 0.20	
(n = 17)	—	—	—	(**)	—
Carnivores		R2 = 0.10	R2 = 0.24	R2 = 0.44	R2 = 0.02
(n = 53)	—	(**)	(**)	(*)	(NS.)
<i>Lutjanidae</i>			R2 = 0.08	R2 = 0.34	R2 = 0.10
(n = 14)	—	—	(NS.)	(NS.)	(NS.)
<i>A.virescens</i>					R2 = 0.17
(n = 7)	—	—	—	—	(NS.)
<i>Lethrinidae</i>				R2 = 0.21	R2 = 0.05
(n = 26)	—	—	—	(NS.)	(NS.)
<i>L.mahsena</i>					R2 = 0.12
(n = 10)	—	—	—	—	(NS.)
<i>Lenigmaticus</i>					R2 = 0.17
(n = 6)	—	—	—	—	(NS.)

However, the reef condition neither appeared as a significant driver of variability, nor of bacteriome diversity between fish individuals (Figure 3B). Similarly, the ordination of macroalgae bacteriomes in a PCoA showed a clear separation between CCR and RCR (Figure 3C) which explained 7% of the variance in the community composition for macroalgae bacteriomes (Table 1). In addition, richness of macroalgae bacteriomes were 80% higher in MSR (Figure 3D). For fishes, diet was one of the main drivers of gut bacteriome composition as indicated by a PERMANOVA analysis (Table 1, Figure 3A). The gut bacteriome of herbivores (i.e., grazers, scrapers, browsers, and the two omnivorous *Cantherines pardalis*) was characterized by the enrichment of 12 biomarkers, genera belonging mainly to the *Desulfovibrionales*, *Bacteroidales*, and *Fusobacteriales*, while eight genera belonging mainly to the *Clostridiales* and *Vibrionales* appeared as biomarkers for carnivores (i.e., invertivores and piscivores) (Figure S6B).

The reef condition significantly affected the composition of gut bacteriome of herbivorous fishes ($R^2 = 0.07$; $p = 0.001$, Figure 4, Table 1).

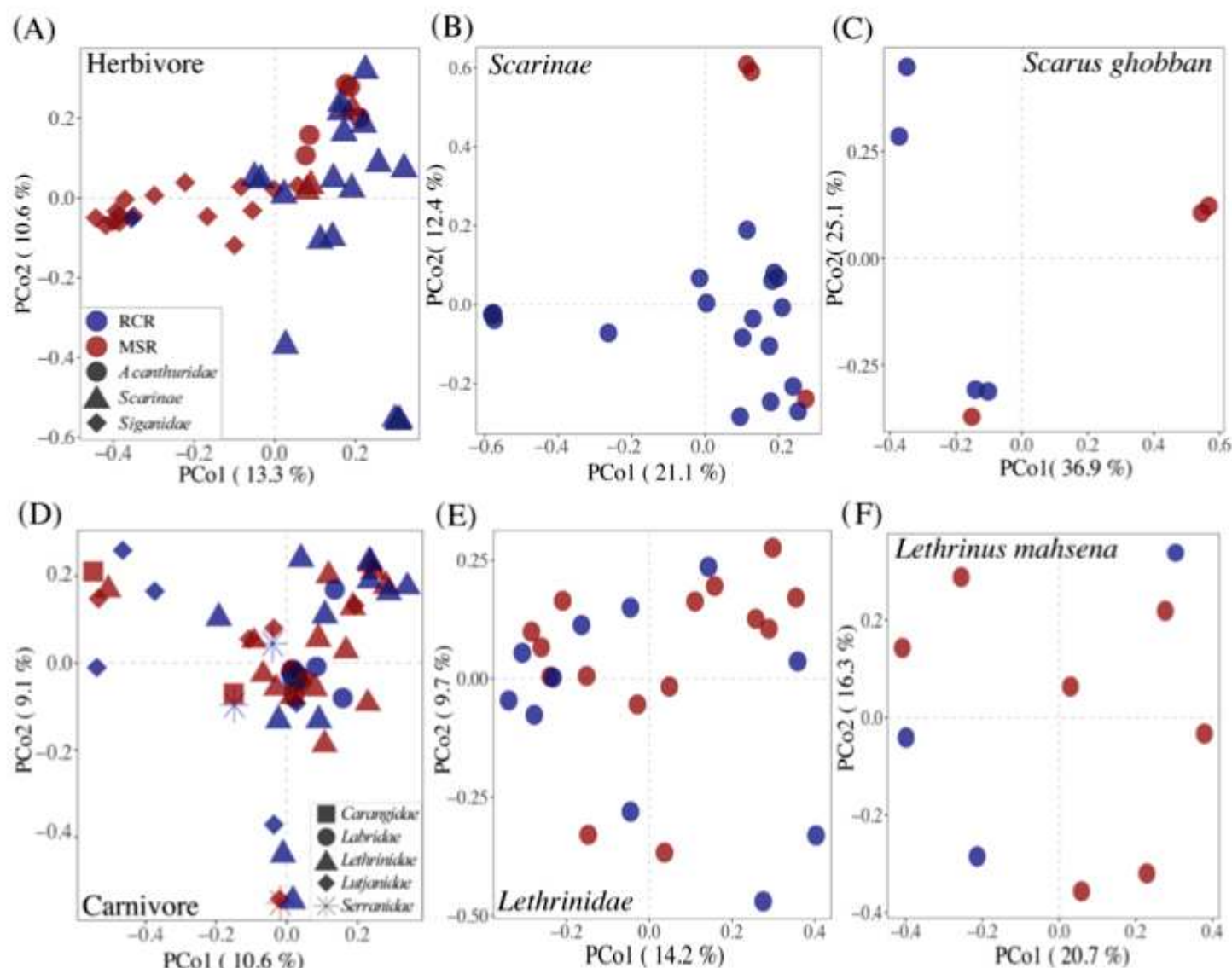


Figure 4. Principal coordinates analysis (PCoA) plots illustrating Bray-Curtis distances between pairs of bacteriome for (A) herbivorous fishes, (B) *Scarinae*, (C) *S. ghobban*, (D) carnivorous fishes, (E) *Lethrinidae*, and (F) *L. mahsena*. Bacteriomes are colored according to the reef condition: RCR in blue and MSR in red. See Figure S6 for the *Lutjanidae*, *A. virescens*, and *L. enigmaticus* results.

However, part of this effect may be driven by the strong fish species turnover among herbivores between coral and macroalgae dominated reefs. Indeed, 16 out of 17 of *Siganidae* and *Acanthuridae* fishes were distributed in MSR, while 19 out of 22 *Scarinae* fishes (mainly represented by *Scarus ghobban*) were present in RCR (Figure 4A). Fish phylogeny was a strong and significant determinant of bacteriome composition at the family ($R^2 = 0.14$; $p = 0.001$), genus ($R^2 = 0.24$; $p = 0.001$), and species ($R^2 = 0.43$; $p = 0.001$) levels. In order to exclude this effect, we analyzed the herbivore dataset at the family and species levels (for *Scarinae* and *Scarus ghobban*, the only herbivores distributed in both reef conditions). In this way, we corroborated the fact that gut bacteriome composition did differ as a result of reef condition (Figure 4B,C). This effect was marginal at the species level probably due to the low number of samples ($R^2 = 0.28$; $p = 0.078$, $N = 7$). Differences in the composition of herbivore core bacteriomes among reef conditions was driven by changes in the relative abundance of biomarkers of the *Scarinae* and *Siganidae* families (Figure 5).

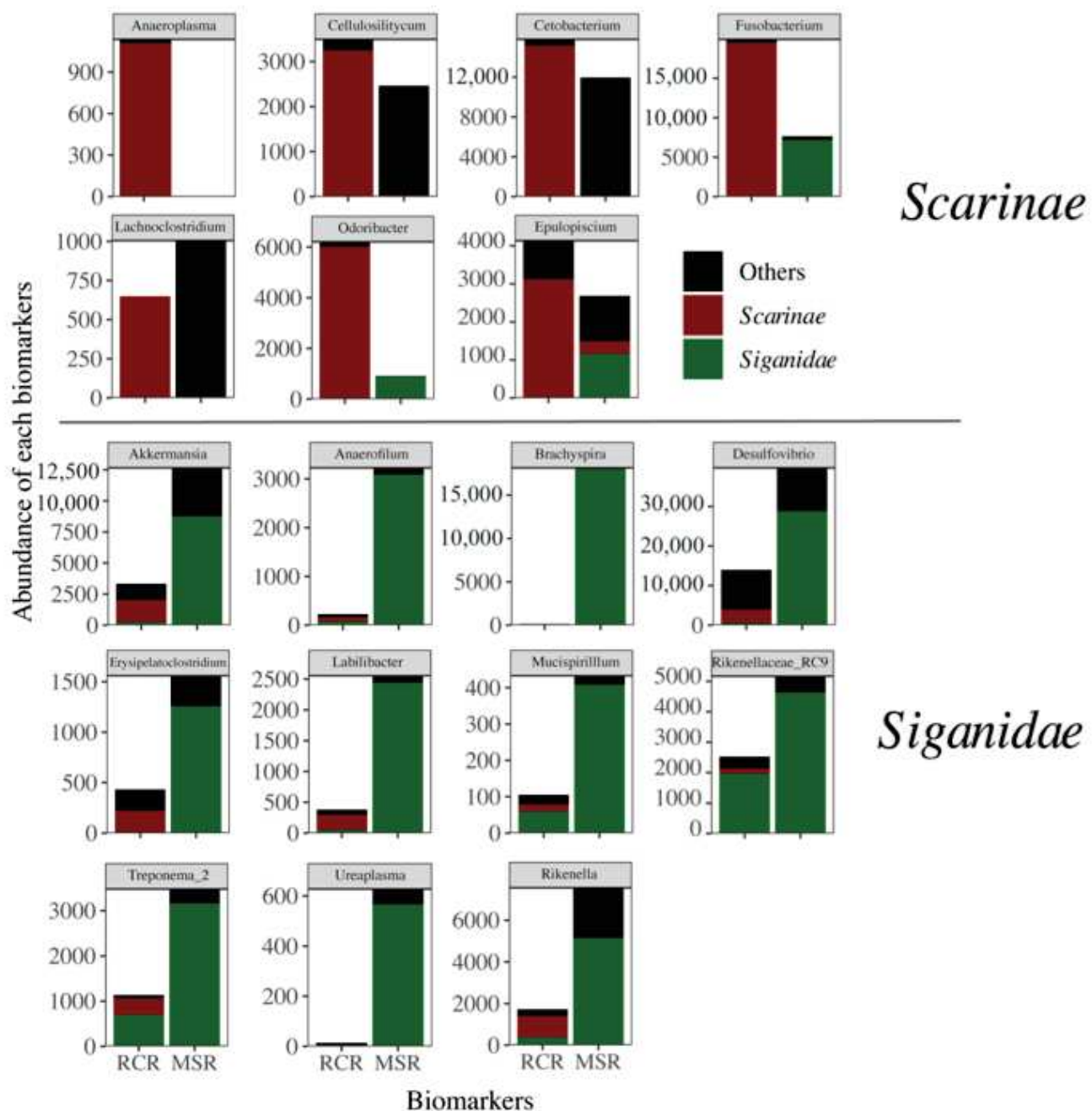


Figure 5. Abundance of each biomarker at Genus level related to *Scarinae* and *Siganidae* (delineated using a LEFSE approach) in RCR and MSR. Contribution of *Scarinae* (red), *Siganidae* (green), and other fish families (black) is indicated on each biomarker.

Bacteriome abundance in MSR was lower for six of the seven *Scarinae* biomarkers and one (i.e., *Anaeroplasmia*) was totally absent. *Fusobacterium* and *Odoribacter* biomarkers were only present in *Siganidae* in MSR (Figure 5). These biomarkers accounted for 0.8% on average of the *Scarinae* bacteriomes and 0.4% of the whole dataset. The decrease in *Scarinae* biomarkers was paralleled by a significant decrease in the abundance of 207 specific KOs (Kegg Orthologs) mainly involved in host lipid (i.e., fatty acids, butanoate, propanoate, and glycerophospholipid metabolisms) and glucose homeostasis (Figure 6).

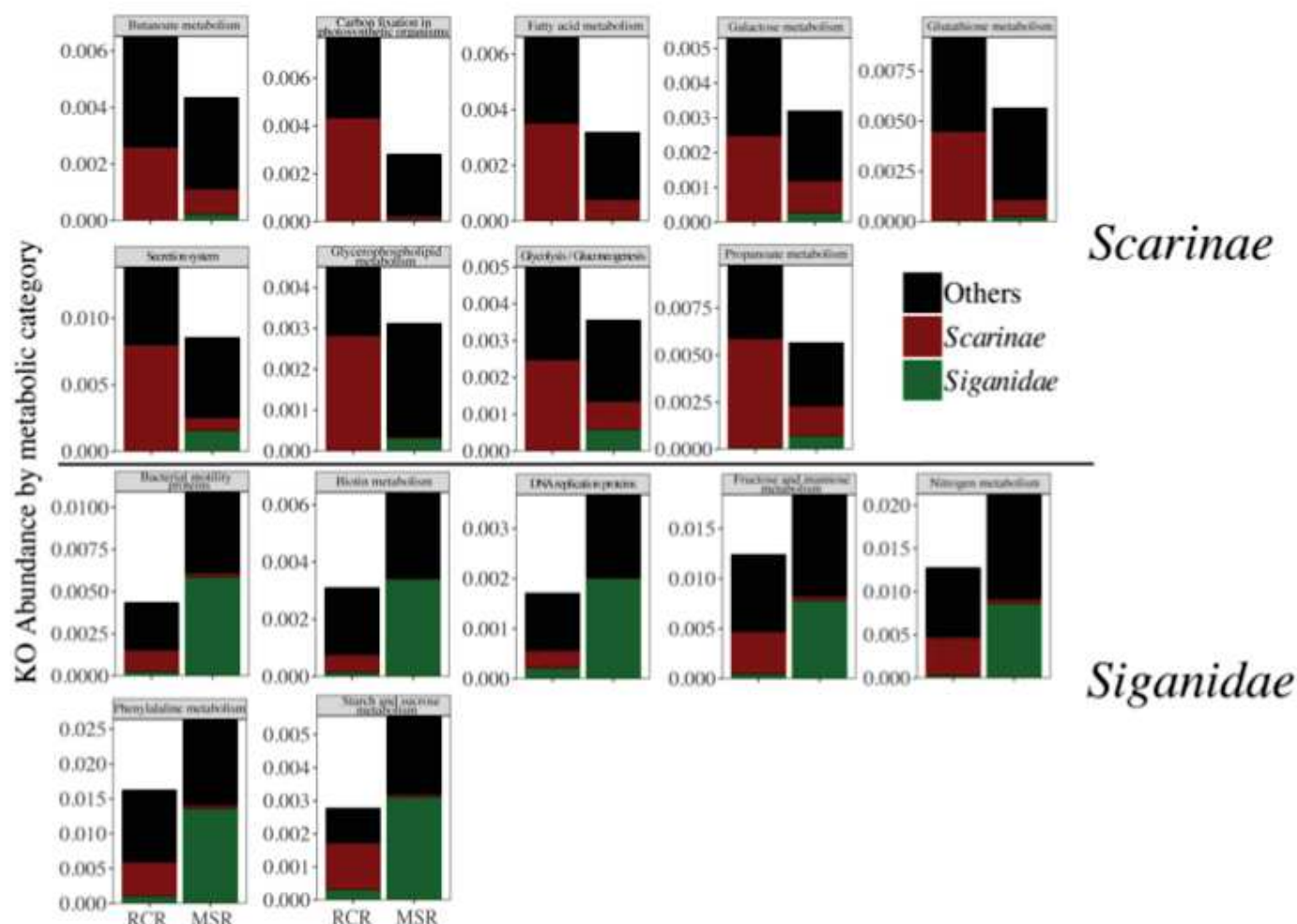


Figure 6. Abundance of each Kegg Ortholog (KO) merged by metabolic pathway, related to enteric bacteriomes of Scarinae (red), Siganidae (green), and other fish families (black) (delineated using a LefSe approach) in RCR and MSR.

In contrast, *Siganidae* biomarkers, all efficient anaerobes fermenters of plant and algal polysaccharides [30], showed a significant increase in MSR and one new appeared (i.e., *Brachyspira*), accounting for 5.9% on average of the *Siganidae* bacteriomes and 2.0% of the whole dataset. This increase came also with an increase in KOs notably involved in carbohydrates metabolism (starch, sucrose, fructose, and mannose), DNA replication, and nitrogen metabolism suggesting higher rates of fermentation and a stimulation of bacterial growth (Figure 6). Reef condition neither appeared as a significant driver of herbivore bacteriome variability, nor of bacteriome diversity (Figure S7).

Contrary to herbivores, we did not detect a significant effect of reef condition on any of the bacteriome diversity facets (i.e., alpha diversity, beta diversity, and variability) of carnivorous fishes (Table 1, Figure 4, Figure S8). The fish family was the only driver of difference in microbiome composition ($R^2 = 0.10$; $p = 0.007$).

4. Discussion

Macroalgal shifted reefs (MSR) are often considered degraded systems in which drastic changes to biotic communities occur, particularly reef fishes [70,71]. So far, the “microbial phase shift” [72] consecutive to a macroalgae regime shift has been studied only in free living microbial communities [73–76] and primary producer microbiomes [11,77,78]. Here, we pinpointed for the first time the influence of such a shift on the gut bacteriomes of Seychelles reef fishes.

The observations from Robinson et al. (2019) [42] indicated that biodiversity losses were more severe in shifted-reefs resulting in novel fish compositions. This conformed

with the different fish functions (e.g., browsing and grazing activities) found in MSR compared to recovering coral reefs (RCR) (Figure S1). Alterations to habitat directly affect coral-dependent fish species [79] such as coral dwellers [80,81] and corallivores [82], and promote the replacement of these highly specialized species by opportunistic species that live in areas of low relief and rubble [70,83–85]. In agreement, fish communities from MSR were characterized by a depletion in *Scarinae*, which are scavengers feeding the epilithic layers present on corals [46], and the dominance of browsers and grazers of the *Siganidae* and *Acanthuridae* families [20] (Figure S1, Table S1). By conditioning the availability of their nutritional resources, regime shifts influenced the occurrence of these two herbivorous fish families (Table S1). Among opportunistic species, invertivorous fishes are believed to benefit from a carbon flow cascade in which the important release of dissolved organic material in algae-dominated reefs stimulates microbial production ultimately fueling benthic invertebrate biomass [86,87]. In this study, invertivores, essentially represented by fishes from the *Lutjanidae* and *Lethrinidae* families, were however uniformly distributed among RCR and MSR.

Several lines of evidence indicate that microorganisms play an active role in the transition from coral dominance to fleshy algae through the DDAM positive feedback loop (dissolved organic carbon, disease, algae, microorganism) [88,89]. In this mechanism, exudation of labile organic matter by turf and macroalgae promotes an increase in microbial abundance and activity, as well as a change in the composition towards copiotrophic and potentially pathogenic microbial taxa, ultimately causing a physiological deterioration of the coral tissues [11] and a dysbiosis in their microbiome [90]. Except for a recent study [91], disruption of the planktonic microbial composition [73,75,76,92,93] and coral microbiomes [11,12,77,78,90] is a recurrent pattern in MSR. Accordingly, we observed here a significant difference in the composition of macroalgae bacteriomes between MSR and RCR accompanied with an increase in bacterial richness in MSR (Figure 3C,D). Macroalgae bacteriomes in MSR were enriched in *Alphaproteobacteria* (*Ahrensia* sp. and *Albimonas* sp.) and *Gammaproteobacteria* (*Leucothrix* sp.). Enrichment in *Gammaproteobacteria* and particularly from the *Leucothrix* genera, which contains filamentous species known to provoke massive invertebrate egg and larvae mortalities [94], agrees with the DDAM model predicting that a proliferation of macroalgae leads to an increase in copiotrophic microorganisms with the potential to create disease. Altogether, these results indicate a microbiolization [75] of the MSR studied here, although we did not assess microbial abundance in our sampling.

We showed that 45% of the ASVs composing the core fish gut bacteriomes corresponded to fish specialists, mainly belonging to the *Desulfovibrionaceae*, *Vibrionaceae*, *Akkermansiaceae*, *Fusobacteriaceae*, and *Lachnospiraceae* families, often retrieved in studies investigating the gut microbiome of coral fishes [21,22,28,30,95,96]. In addition, a significant part of core ASVs were symbiotic generalists shared among marine organisms indicating a potentially important connectivity of fish gut bacteriomes with their surrounding habitat and animal-associated microbial communities, through feeding activity and defecation. This suggests that perturbations of their habitat microbiome related to macroalgal regime shifts could translocate to their own microbiome. Indeed, although fish diet and taxonomy were major determinants of fish gut bacteriome composition, this latter differed significantly between RCR and MSR (Table 1, Figure 4). Shifts in the fish gut microbiome may reflect changes in diet in degraded habitats. While this has never been observed before in coral reef ecosystems, in disturbed continental areas where their nutritional resources were modified or even absent, the composition of black howler monkey enteric microbiomes responded to habitat perturbations [32,97]. Since macroalgae regime shifts represent an important modification of their main nutritional resources, we hypothesized a strong effect on herbivorous fish gut bacteriomes. In agreement, the reef condition explained a significant amount of the variance for herbivorous fish, while we failed to detect any significant effect for carnivorous fishes. One explanation may be related to the fact that carnivorous fishes seem to have a larger dietary niche width than obligate herbivores

[98] that would allow them to forage in adjacent healthy areas of the reef [99]. Our sampling strategy did not allow us to detect a significant effect of coral-macroalgal shift at the intra-species level. To overcome this limitation related to the high intra-specific variability observed in fish gut bacteriomes, future investigations should focus on species present in both MSR and CCR and with a significant increase in the number of individuals (more than 10) in each condition and species.

Rather than a dysbiosis, the significant response of herbivorous gut bacteriome composition to the condition of the reef reflected the loss or gain of specific bacterial taxa associated with the strong turnover of their hosts, particularly *Scarinae* and *Siganidae* fishes, between RCR and MSR (Figure 6). This result indicates a certain degree of conservation for a significant part of the coral reef fish gut bacteriome, but also agrees with a recent study showing that loss of the most vulnerable reef animals, and among them fishes, due to reef degradation would induce a significant loss of the reef prokaryotic richness [19]. While we did not observe an erosion of bacteriome diversity in MSR, nor an increase of bacteriome variability among individuals expected under the Anna Karenina principle [100], we did record a significant reduction or loss of *Scarinae* biomarkers and associated functional genes towards the prevalence of bacterial fermenters associated with *Siganidae*. In addition, we also observed a concomitant increase in abundance of KOs involved in carbohydrate metabolism (starch, sucrose, fructose, and mannose), DNA replication, and nitrogen metabolism, suggesting higher rates of fermentation and a stimulation of bacterial growth in MSR. Seaweeds such as *Sargassum* and turf algae are rich in sulfated polysaccharides and high carbohydrate food is well known to promote rates of gastrointestinal fermentation [101]. ASVs constituting *Siganidae* biomarkers were closely related to sequences previously retrieved from *Siganus canaliculatus* (Supplementary File 2). Indeed, bacteria from the genera *Desulfovibrio* (sulfate reducing bacteria), *Rikenella*, *Brachyspira* (anaerobic fermentative bacteria), and *Akkermansia* (mucin degrading bacteria) were found to be part of the core bacteriome of *Siganidae* [102,103], accounting for 5.9% on average of their bacteriomes and 2.0% of the whole dataset. These taxa may be of importance for host digestive function in MSR, in particular for the fermentation of sulfated algal polysaccharides. For example, members of the *Rikenella* genus are known to degrade celluloses into short chain fatty acids (SCFA) available for the host through microbial fermentation [30,104]. The prevalence of these fermentative bacteria is in line with the high fermentation rates observed within herbivorous fish hindguts [105], particularly in *Siganidae* [106] and further suggest a well-suited adaptation of *Siganidae* bacteriomes to the consumption of algae. We acknowledge that these predicted functions based on barcoding data should be corroborated by future transcriptional or proteomic studies that could address the consequence of coral-macroalgal shift on the fermentative activity of microbes associated with reef fish. Nonetheless, the predominance of fermentative metabolisms in MSR indicated that regime shifts not only affect the taxonomic composition of fish bacteriomes, but has the potential to also affect ecosystem functioning through microbial functions.

5. Conclusions

Identifying the mechanisms and consequences of bleaching-induced benthic regime shifts for reef microbiota is vital for understanding the resilience of these habitats to changing ocean conditions. Here, we showed that a “microbial phase shift” occurred following a macroalgae regime shift, which was translocated to the gut bacteriome of herbivore reef fishes affecting their composition and potentially their functional role in the reef ecosystem. This response reflected the loss or gain of specific bacterial taxa associated with the strong turnover of their hosts between RCR and MSR. A pattern that maybe reflects a long-term effect of regime shifts. The consequences of increasing recurrence of “coral-macroalgae regime shifts” on reef animal microbiota and reef functioning is an emerging field of reef ecology. Further work should investigate the repercussions of microbiota

dysbiosis consecutive to habitat degradation impacts on both host fitness and ecosystem functioning.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9081711/s1. Figure S1: PCoA illustrating similarity of fish catch composition and diets; Figure S2: Species abundance distribution (SAD) pattern of bacterial ASVs; Figure S3: Rarefaction curves for each fish gut and macroalgae bacteriomes; Figure S4: Treemaps of the constitutive phyla and their representative families; Figure S5: Beta and alpha diversity of fish gut and macroalgae bacteriomes; Figure S6: Venn diagram and polar histogram; Figure S7: Boxplots representing the alpha diversity; Figure S8: PCoA illustrating Bray-Curtis distances between pairs of bacteriome samples from the *Lutjanidae*, *A. virescens*, and *L. enigmaticus*; Table S1: Inventory of collected species; File S1: List of extraction kit contaminants; File S2: Blast results and the taxonomy.

Author Contributions: Conceptualization, M.-C.C., S.V., C.C.H., J.P.W.R., N.G.T.B., and J.-C.A.; data curation, J.P.W.R.; formal analysis, M.-C.C., C.M., J.-C.A.; funding acquisition, C.C.H., N.A.J.G., and J.-C.A.; investigation, M.-C.C., S.V., T.B., and J.-C.A.; methodology, M.-C.C. and J.-C.A.; project administration, S.V., T.B., J.P.W.R., N.A.J.G., and J.-C.A.; supervision, S.V., T.B., and J.-C.A.; writing—original draft, M.-C.C. and J.-C.A.; writing—review and editing, M.-C.C., S.V., C.C.H., J.P.W.R., N.A.J.G., C.X.O.R., Y.B., and T.B. All authors have reviewed the manuscript and contributed to the final version.

Funding: This project was funded by a grant from the CNRS INSU EC2CO “Microbien” program project BIOMEVO, a grant from the CNRS international emerging actions (IEA) program project FISHμBIOM, the Royal Society, and an ERC grant (759457) to Lancaster University. Marie Charlotte Cheutin was supported by a Ph.D grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by Lancaster University FST research Ethics review committee (approval number FST18132) and according to the guidelines of the MoU with the Seychelles Fishing Authority (signed the 12 December 2018). An agreement with Seychelles’ government over the transport of biological materials was signed with the Lancaster University (signed the 21st December 2019) and issued by UK DEFRA under the project ITMIP19.0048.

Data Availability Statement: Raw Illumina Miseq sequence data for each sample obtained in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under BioProject accession no. PRJNA674042.

Acknowledgments: We thank the Seychelles Fishing Authority research team for assistance in the field and with sample preparation (Andrew Souffre, Rodney Melanie, Achille Pascal, Marie-Corinne Balett, Stephanie Marie, Clara Belmont) and Dr Nathalie Bodin for assistance with study design and logistics. We are grateful to three trap fishers who provided boat time and fisheries expertise, and assisted with sample collection. We are grateful to the genotoul sequencing platform in Toulouse (Occitanie, France), for providing the MiSeq Illumina sequencing.

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

References

1. Hughes, T.P. Climate Change, Human Impacts, and the Resilience of Coral Reefs. *Science* **2003**, *301*, 929–933, doi:10.1126/science.1085046.
2. Jackson, J.B.C. Ecological extinction and evolution in the brave new ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11458–11465, doi:10.1073/pnas.0802812105.
3. Woodhead, A.J.; Hicks, C.C.; Norström, A.V.; Williams, G.J.; Graham, N.A.J. Coral reef ecosystem services in the Anthropocene. *Funct. Ecol.* **2019**, 1365–2435.13331, doi:10.1111/1365-2435.13331.
4. McWilliam, M.; Pratchett, M.S.; Hoogenboom, M.O.; Hughes, T.P. Deficits in functional trait diversity following recovery on coral reefs. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2020**, *287*, 20192628, doi:10.1098/rspb.2019.2628.
5. Mumby, P.J. The impact of exploiting grazers (Scaridae) on the dynamics of Caribbean coral reefs. *Ecol. Appl.* **2006**, *16*, 747–769, doi:10.1890/1051-0761(2006)016[0747:TIOEGS]2.0.CO;2.
6. Graham, N.A.J.; Jennings, S.; MacNeil, M.A.; Mouillot, D.; Wilson, S.K. Predicting climate-driven regime shifts versus rebound potential in coral reefs. *Nature* **2015**, *518*, 94–97, doi:10.1038/nature14140.
7. Norström, A.; Nyström, M.; Lokrantz, J.; Folke, C. Alternative states on coral reefs: Beyond coral–macroalgal phase shifts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2009**, *376*, 295–306, doi:10.3354/meps07815.

8. Cheal, A.J.; MacNeil, M.A.; Cripps, E.; Emslie, M.J.; Jonker, M.; Schaffelke, B.; Sweatman, H. Coral-macroalgal phase shifts or reef resilience: Links with diversity and functional roles of herbivorous fishes on the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* **2010**, *29*, 1005–1015, doi:10.1007/s00338-010-0661-y.
9. McCook, L.; Jompa, J.; Diaz-Pulido, G. Competition between corals and algae on coral reefs: A review of evidence and mechanisms. *Coral Reefs* **2001**, *19*, 400–417, doi:10.1007/s003380000129.
10. Hughes, T.P.; Rodrigues, M.J.; Bellwood, D.R.; Ceccarelli, D.; Hoegh-Guldberg, O.; McCook, L.; Moltschaniwskyj, N.; Pratchett, M.S.; Steneck, R.S.; Willis, B. Phase Shifts, Herbivory, and the Resilience of Coral Reefs to Climate Change. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 360–365, doi:10.1016/j.cub.2006.12.049.
11. Morrow, K.M.; Bromhall, K.; Motti, C.A.; Munn, C.B.; Bourne, D.G. Allelochemicals Produced by Brown Macroalgae of the Lobophora Genus Are Active against Coral Larvae and Associated Bacteria, Supporting Pathogenic Shifts to Vibrio Dominance. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, doi:10.1128/AEM.02391-16.
12. Morrow, K.M.; Liles, M.R.; Paul, V.J.; Moss, A.G.; Chadwick, N.E. Bacterial shifts associated with coral-macroalgal competition in the Caribbean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2013**, *488*, 103–117, doi:10.3354/meps10394.
13. Burkepille, D.E.; Hay, M.E. Herbivore vs. nutrient control of marine primary producers: Context-dependent effects. *Ecology* **2006**, *87*, 3128–3139, doi:10.1890/0012-9658(2006)87[3128:HVNCOM]2.0.CO;2.
14. Nyström, M.; Graham, N.A.J.; Lokrantz, J.; Norström, A.V. Capturing the cornerstones of coral reef resilience: Linking theory to practice. *Coral Reefs* **2008**, *27*, 795–809, doi:10.1007/s00338-008-0426-z.
15. Hughes, T.P.; Barnes, M.L.; Bellwood, D.R.; Cinner, J.E.; Cumming, G.S.; Jackson, J.B.C.; Kleypas, J.; van de Leemput, I.A.; Lough, J.M.; Morrison, T.H.; et al. Coral reefs in the Anthropocene. *Nature* **2017**, *546*, 82–90, doi:10.1038/nature22901.
16. Bellwood, D.R.; Pratchett, M.S.; Morrison, T.H.; Gurney, G.G.; Hughes, T.P.; Álvarez-Romero, J.G.; Day, J.C.; Grantham, R.; Grech, A.; Hoey, A.S.; et al. Coral reef conservation in the Anthropocene: Confronting spatial mismatches and prioritizing functions. *Biol. Conserv.* **2019**, *236*, 604–615, doi:10.1016/j.biocon.2019.05.056.
17. Bellwood, D.R.; Hughes, T.P.; Folke, C.; Nyström, M. Confronting the coral reef crisis. *Nature* **2004**, *429*, 827–833, doi:10.1038/nature02691.
18. Chiarello, M.; Auguet, J.C.; Bettarel, Y.; Bouvier, C.; Claverie, T.; Graham, N.A.J.; Rieuvilleneuve, F.; Sucré, E.; Bouvier, T.; Villéger, S. Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet. *Microbiome* **2018**, *6*, 1–14, doi:10.1186/s40168-018-0530-4.
19. Chiarello, M.; Auguet, J.-C.; Graham, N.A.J.; Claverie, T.; Sucré, E.; Bouvier, C.; Rieuvilleneuve, F.; Restrepo-Ortiz, C.X.; Bettarel, Y.; Villéger, S.; et al. Exceptional but vulnerable microbial diversity in coral reef animal surface microbiomes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2020**, *287*, 20200642, doi:10.1098/rspb.2020.0642.
20. Miyake, S.; Ngugi, D.K.; Stingl, U. Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes. *Mol. Ecol.* **2015**, *24*, 656–672, doi:10.1111/mec.13050.
21. Pratte, Z.A.; Besson, M.; Hollman, R.D.; Stewart, F.J. The gills of reef fish support a distinct microbiome influenced by host-specific factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, 1–15, doi:10.1128/AEM.00063-18.
22. Scott, J.J.; Adam, T.C.; Duran, A.; Burkepille, D.E.; Rasher, D.B. Intestinal microbes: An axis of functional diversity among large marine consumers. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2020**, *287*, 20192367, doi:10.1098/rspb.2019.2367.
23. Fischbach, M.A.; Segre, J.A. Signaling in Host-Associated Microbial Communities. *Cell* **2016**, *164*, 1288–1300, doi:10.1016/j.cell.2016.02.037.
24. Li, X.; Zhou, L.; Yu, Y.; Ni, J.; Xu, W.; Yan, Q. Composition of Gut Microbiota in the Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) Varies with Host Development. *Microb. Ecol.* **2017**, *74*, 239–249, doi:10.1007/s00248-016-0924-4.
25. Piazzon, M.C.; Caldach-Giner, J.A.; Fouz, B.; Estensoro, I.; Simó-Mirabet, P.; Puyalto, M.; Karalazos, V.; Palenzuela, O.; Sitjà-Bobadilla, A.; Pérez-Sánchez, J. Under control: How a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome* **2017**, *5*, 164, doi:10.1186/s40168-017-0390-3.
26. Ngugi, D.K.; Miyake, S.; Cahill, M.; Vinu, M.; Hackmann, T.J.; Blom, J.; Tietbohl, M.D.; Berumen, M.L.; Stingl, U. Genomic diversification of giant enteric symbionts reflects host dietary lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E7592–E7601, doi:10.1073/pnas.1703070114.
27. Butt, R.L.; Volkoff, H. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*, 6–8, doi:10.3389/fendo.2019.00009.
28. Sullam, K.E.; Essinger, S.D.; Lozupone, C.A.; O'Connor, M.P.; Rosen, G.L.; Knight, R.; Kilham, S.S.; Russell, J.A. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Mol. Ecol.* **2012**, *21*, 3363–3378, doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x.
29. de Bruijn, I.; Liu, Y.; Wiegertjes, G.F.; Raaijmakers, J.M. Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, 1–12, doi:10.1093/femsec/fix161.
30. Clements, K.D.; Angert, E.R.; Montgomery, W.L.; Choat, J.H. Intestinal microbiota in fishes: What's known and what's not. *Mol. Ecol.* **2014**, *23*, 1891–1898, doi:10.1111/mec.12699.
31. Neave, M.J.; Apprill, A.; Aeby, G.; Miyake, S.; Voolstra, C.R. Microbial Communities of Red Sea Coral Reefs. **2019**, 53–68, doi:10.1007/978-3-030-05802-9_4.

32. Amato, K.R.; Yeoman, C.J.; Kent, A.; Righini, N.; Carbonero, F.; Estrada, A.; Rex Gaskins, H.; Stumpf, R.M.; Yildirim, S.; Torralba, M.; et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *ISME J.* **2013**, *7*, 1344–1353, doi:10.1038/ismej.2013.16.
33. Kohl, K.D.; Amaya, J.; Passemant, C.A.; Dearing, M.D.; Mccue, M.D. Unique and shared responses of the gut microbiota to prolonged fasting: A comparative study across five classes of vertebrate hosts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *90*, 883–894, doi:10.1111/1574-6941.12442.
34. Borbón-García, A.; Reyes, A.; Vives-Flórez, M.; Caballero, S. Captivity shapes the gut microbiota of Andean bears: Insights into health surveillance. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–12, doi:10.3389/fmicb.2017.01316.
35. Clayton, J.B.; Vangay, P.; Huang, H.; Ward, T.; Hillmann, B.M.; Al-Ghalith, G.A.; Travis, D.A.; Long, H.T.; Van Tuan, B.; Van Minh, V.; et al. Captivity humanizes the primate microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 10376–10381, doi:10.1073/pnas.1521835113.
36. Schmidt, E.; Mykytczuk, N.; Schulte-Hostedde, A.I. Effects of the captive and wild environment on diversity of the gut microbiome of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *ISME J.* **2019**, *13*, 1293–1305, doi:10.1038/s41396-019-0345-8.
37. Gudka, M.; Obura, D.; Mbugua, J.; Ahamada, S.; Kloiber, U.; Holter, T. Participatory reporting of the 2016 bleaching event in the Western Indian Ocean. *Coral Reefs* **2020**, *39*, doi:10.1007/s00338-019-01851-3.
38. Faure, G.; Guillaume, M.; Payri, C.; Thomassin, B.; Vanpraet, M.; Vasseur, P. Massive bleaching and death of corals in the Mayotte Reef ecosystem (SW Indian-Ocean). *Comptes rendus l'académie des Sci. Série III-Sciences la vie-Life Sci.* **1984**, *299*, 637–642.
39. Wilkinson, C.; Lindén, O.; Cesar, H.; Hodgson, G.; Rubens, J.; Strong, A.E. Ecological and socioeconomic impacts of 1998 coral mortality in the Indian Ocean: An ENSO impact and a warning of future change? *Ambio* **1999**, *28*, 188–196.
40. Wilson, S.K.; Robinson, J.P.W.; Chong-Seng, K.; Robinson, J.; Graham, N.A.J. Boom and bust of keystone structure on coral reefs. *Coral Reefs* **2019**, *38*, 625–635, doi:10.1007/s00338-019-01818-4.
41. Graham, N.A.J.; Wilson, S.K.; Jennings, S.; Polunin, N.V.C.; Bijoux, J.P.; Robinson, J. Dynamic fragility of oceanic coral reef ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 8425–8429, doi:10.1073/pnas.0600693103.
42. Robinson, J.P.W.; Wilson, S.K.; Jennings, S.; Graham, N.A.J. Thermal stress induces persistently altered coral reef fish assemblages. *Glob. Chang. Biol.* **2019**, *25*, 2739–2750, doi:10.1111/gcb.14704.
43. Clements, K.D.; Pasch, I.B.Y.; Moran, D.; Turner, S.J. Clostridia dominate 16S rRNA gene libraries prepared from the hindgut of temperate marine herbivorous fishes. *Mar. Biol.* **2007**, *150*, 1431–1440, doi:10.1007/s00227-006-0443-9.
44. Taquet, M.; Delinguer, A. *Poissons de l'Océan Indien et de la Mer Rouge*; Quae.; Versailles, **2007**; ISBN 978-2-7592-0045-0.
45. Mouillot, D.; Villéger, S.; Parravicini, V.; Kulbicki, M.; Arias-González, J.E.; Bender, M.; Chabanet, P.; Floeter, S.R.; Friedlander, A.; Vigliola, L.; et al. Functional over-redundancy and high functional vulnerability in global fish faunas on tropical reefs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 13757–13762, doi:10.1073/pnas.1317625111.
46. Clements, K.D.; German, D.P.; Piché, J.; Tribollet, A.; Choat, J.H. Integrating ecological roles and trophic diversification on coral reefs: Multiple lines of evidence identify parrotfishes as microphages. *Biol. J. Linn. Soc.* **2017**, *120*, 729–751, doi:10.1111/bij.12914.
47. McArdle, B.H.; Anderson, M.J. Fitting multivariate models to community data: A comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* **2001**, *82*, 290–297, doi:10.1890/0012-9658(2001)082[0290:FMMTCD]2.0.CO;2.
48. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Michael, F.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Peter, S.; et al. *vegan: Community Ecology Package*. **2019**.
49. Parada, A.E.; Needham, D.M.; Fuhrman, J.A. Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 1403–1414, doi:10.1111/1462-2920.13023.
50. R Core Team R: A language and environment for statistical computing **2020**.
51. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
52. Glassman, S.I.; Martiny, J.B.H. Broad-scale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact. *mSphere* **2018**, *3*, e00148-18, <https://doi.org/10.1128/mSphere.00148-18>.
53. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 590–596, doi:10.1093/nar/gks1219.
54. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0061217.
55. Salter, S.J.; Cox, M.J.; Turek, E.M.; Calus, S.T.; Cookson, W.O.; Moffatt, M.F.; Turner, P.; Parkhill, J.; Loman, N.J.; Walker, A.W. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* **2014**, *12*, 87, doi:10.1186/s12915-014-0087-z.
56. Cariveau, D.P.; Elijah Powell, J.; Koch, H.; Winfree, R.; Moran, N.A. Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *ISME J.* **2014**, *8*, 2369–2379, doi:10.1038/ismej.2014.68.
57. Madhusoodanan, J. News Feature: Do hosts and their microbes evolve as a unit? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 14391–14394, doi:10.1073/pnas.1908139116.
58. Berg, R. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **1996**, *4*, 430–435, doi:10.1016/0966-842X(96)10057-3.
59. Martinson, V.G.; Danforth, B.N.; Minckley, R.L.; Rueppell, O.; Tingek, S.; Moran, N.A. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol. Ecol.* **2011**, *20*, 619–628, doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x.

60. Koch, H.; Abrol, D.P.; Li, J.; Schmid-Hempel, P. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Mol. Ecol.* **2013**, *22*, 2028–2044, doi:10.1111/mec.12209.
61. Magurran, A.E.; Henderson, P.A. Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature* **2003**, *422*, 714–716, doi:10.1038/nature01547.
62. Krebs, C.J. *Ecological Methodology*; Pearson; Addison-Wesley Educational Publishers: Menlo Park, 1999; ISBN 9780321021731.
63. Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, J.R.; Hartmann, M.; Hollister, E.B.; Lesniewski, R.A.; Oakley, B.B.; Parks, D.H.; Robinson, C.J.; et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7537–7541, doi:10.1128/AEM.01541-09.
64. Ludwig, W.; Strunk, O.; Westram, R.; Richter, L.; Meier, H.; Yadhukumar, A.; Buchner, A.; Lai, T.; Steppi, S.; Jacob, G.; et al. ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1363–1371, doi:10.1093/nar/gkh293.
65. Letunic, I.; Bork, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W242–W245, doi:10.1093/nar/gkw290.
66. Chao, A.; Lee, S.-M.; Chen, T.-C. A generalized Good's nonparametric coverage estimator. *Chin. J. Math.* **1988**, *16*, 189–199.
67. Jost, L. Entropy and diversity. *Oikos* **2006**, *113*, 363–375, doi:10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x.
68. Wemheuer, F.; Taylor, J.A.; Daniel, R.; Johnston, E.; Meinicke, P.; Thomas, T.; Wemheuer, B. Tax4Fun2: Prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. *Environ. Microbiome* **2020**, *15*, 11, doi:10.1186/s40793-020-00358-7.
69. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
70. Chong-Seng, K.M.; Mannering, T.D.; Pratchett, M.S.; Bellwood, D.R.; Graham, N.A.J. The influence of coral reef benthic condition on associated fish assemblages. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0042167.
71. Graham, N.A.J.; Robinson, J.P.W.; Smith, S.E.; Govinden, R.; Gendron, G.; Wilson, S.K. Changing role of coral reef marine reserves in a warming climate. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2000, doi:10.1038/s41467-020-15863-z.
72. Silveira, C.B.; Cavalcanti, G.S.; Walter, J.M.; Silva-Lima, A.W.; Dinsdale, E.A.; Bourne, D.G.; Thompson, C.C.; Thompson, F.L. Microbial processes driving coral reef organic carbon flow. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 575–595, doi:10.1093/femsre/fux018.
73. McDole, T.; Nulton, J.; Barott, K.L.; Felts, B.; Hand, C.; Hatay, M.; Lee, H.; Nadon, M.O.; Nosrat, B.; Salamon, P.; et al. Assessing Coral Reefs on a Pacific-Wide Scale Using the Microbialization Score. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43233, doi:10.1371/journal.pone.0043233.
74. Meirelles, P.M.; Amado-Filho, G.M.; Pereira-Filho, G.H.; Pinheiro, H.T.; De Moura, R.L.; Joyeux, J.C.; Mazzei, E.F.; Bastos, A.C.; Edwards, R.A.; Dinsdale, E.; et al. Baseline assessment of mesophotic reefs of the Vitória-Trindade Seamount Chain based on water quality, microbial diversity, benthic cover and fish biomass data. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130084, doi:10.1371/journal.pone.0130084.
75. Haas, A.F.; Fairouz, M.F.M.; Kelly, L.W.; Nelson, C.E.; Dinsdale, E.A.; Edwards, R.A.; Giles, S.; Hatay, M.; Hisakawa, N.; Knowles, B.; et al. Global microbialization of coral reefs. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16042, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.42.
76. Roach, T.N.F.; Abieri, M.L.; George, E.E.; Knowles, B.; Naliboff, D.S.; Smurthwaite, C.A.; Kelly, L.W.; Haas, A.F.; Rohwer, F.L. Microbial bioenergetics of coral-algal interactions. *PeerJ* **2017**, *2017*, 1–19, doi:10.7717/peerj.3423.
77. Haas, A.F.; Nelson, C.E.; Kelly, L.W.; Carlson, C.A.; Rohwer, F.; Leichter, J.J.; Wyatt, A.; Smith, J.E. Effects of coral reef benthic primary producers on dissolved organic carbon and microbial activity. *PLoS ONE* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0027973.
78. Vega Thurber, R.; Burkepile, D.E.; Correa, A.M.S.; Thurber, A.R.; Shantz, A.A.; Welsh, R.; Pritchard, C.; Rosales, S. Macroalgae Decrease Growth and Alter Microbial Community Structure of the Reef-Building Coral, *Porites astreoides*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44246, doi:10.1371/journal.pone.0044246.
79. Munday, P.L.; Jones, G.P.; Pratchett, M.S.; Williams, A.J. Climate change and the future for coral reef fishes. *Fish. Fish.* **2008**, *9*, 261–285, doi:10.1111/j.1467-2979.2008.00281.x.
80. Munday, P.; Jones, G.; Caley, M. Habitat specialisation and the distribution and abundance of coral-dwelling gobies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1997**, *152*, 227–239, doi:10.3354/meps152227.
81. Gardiner, N.; Jones, G. Habitat specialisation and overlap in a guild of coral reef cardinalfishes (Apogonidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2005**, *305*, 163–175, doi:10.3354/meps305163.
82. Pratchett, M.S. Dietary overlap among coral-feeding butterflyfishes (Chaetodontidae) at Lizard Island, northern Great Barrier Reef. *Mar. Biol.* **2005**, *148*, 373–382, doi:10.1007/s00227-005-0084-4.
83. Bellwood, D.R.; Hughes, T.P.; Hoey, A.S. Sleeping Functional Group Drives Coral-Reef Recovery. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 2434–2439, doi:10.1016/j.cub.2006.10.030.
84. Feary, D.; Almany, G.; Jones, G.; McCormick, M. Coral degradation and the structure of tropical reef fish communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2007**, *333*, 243–248, doi:10.3354/meps333243.
85. Silveira, C.B.; Silva-Lima, A.W.; Francini-Filho, R.B.; Marques, J.S.M.; Almeida, M.G.; Thompson, C.C.; Rezende, C.E.; Paranhos, R.; Moura, R.L.; Salomon, P.S.; et al. Microbial and sponge loops modify fish production in phase-shifting coral reefs. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 3832–3846, doi:10.1111/1462-2920.12851.
86. Alexander, B.E.; Liebrand, K.; Osinga, R.; van der Geest, H.G.; Admiraal, W.; Cleutjens, J.P.M.; Schutte, B.; Verheyen, F.; Ribes, M.; van Loon, E.; et al. Cell Turnover and Detritus Production in Marine Sponges from Tropical and Temperate Benthic Ecosystems. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109486, doi:10.1371/journal.pone.0109486.

87. Mueller, B.; de Goeij, J.M.; Vermeij, M.J.A.; Mulders, Y.; van der Ent, E.; Ribes, M.; van Duyl, F.C. Natural Diet of Coral-Excavating Sponges Consists Mainly of Dissolved Organic Carbon (DOC). *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90152, doi:10.1371/journal.pone.0090152.
88. Smith, J.E.; Shaw, M.; Edwards, R.A.; Obura, D.; Pantos, O.; Sala, E.; Sandin, S.A.; Smriga, S.; Hatay, M.; Rohwer, F.L. Indirect effects of algae on coral: Algae-mediated, microbe-induced coral mortality. *Ecol. Lett.* **2006**, *9*, 835–845, doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00937.x.
89. Barott, K.L.; Rohwer, F.L. Unseen players shape benthic competition on coral reefs. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 621–628, doi:10.1016/j.tim.2012.08.004.
90. Morrow, K.M.; Ritson-Williams, R.; Ross, C.; Liles, M.R.; Paul, V.J. Macroalgal Extracts Induce Bacterial Assemblage Shifts and Sublethal Tissue Stress in Caribbean Corals. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44859, doi:10.1371/journal.pone.0044859.
91. Beatty, D.; Clements, C.; Stewart, F.; Hay, M. Intergenerational effects of macroalgae on a reef coral: Major declines in larval survival but subtle changes in microbiomes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2018**, *589*, 97–114, doi:10.3354/meps12465.
92. Nelson, C.E.; Goldberg, S.J.; Wegley Kelly, L.; Haas, A.F.; Smith, J.E.; Rohwer, F.; Carlson, C.A. Coral and macroalgal exudates vary in neutral sugar composition and differentially enrich reef bacterioplankton lineages. *ISME J.* **2013**, *7*, 962–979, doi:10.1038/ismej.2012.161.
93. Meirelles, P.M.; Soares, A.C.; Oliveira, L.; Leomil, L.; Appolinario, L.R.; Francini-Filho, R.B.; De Moura, R.L.; De Barros Almeida, R.T.; Salomon, P.S.; Amado-Filho, G.M.; et al. Metagenomics of coral reefs under phase shift and high hydrodynamics. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–13, doi:10.3389/fmicb.2018.02203.
94. Aiken, D.E.; Waddy, S.L. Aquaculture. In *Biology of the Lobster*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1995; pp. 153–175.
95. Ghanbari, M.; Kneifel, W.; Domig, K.J. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture* **2015**, *448*, 464–475, doi:10.1016/j.aquaculture.2015.06.033.
96. Egerton, S.; Culloty, S.; Whooley, J.; Stanton, C.; Ross, R.P. The gut microbiota of marine fish. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 873, doi:10.3389/fmicb.2018.00873.
97. Barelli, C.; Albanese, D.; Donati, C.; Pindo, M.; Dallago, C.; Rovero, F.; Cavalieri, D.; Michael Tuohy, K.; Christine Haufler, H.; De Filippo, C. Habitat fragmentation is associated to gut microbiota diversity of an endangered primate: Implications for conservation. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14862, doi:10.1038/srep14862.
98. Hayden, B.; Palomares, M.L.D.; Smith, B.E.; Poelen, J.H. Biological and environmental drivers of trophic ecology in marine fishes—a global perspective. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11415, doi:10.1038/s41598-019-47618-2.
99. Green, A.L.; Maypa, A.P.; Almany, G.R.; Rhodes, K.L.; Weeks, R.; Abesamis, R.A.; Gleason, M.G.; Mumby, P.J.; White, A.T. Larval dispersal and movement patterns of coral reef fishes, and implications for marine reserve network design. *Biol. Rev.* **2015**, *90*, 1215–1247, doi:10.1111/brev.12155.
100. Zaneveld, J.R.; McMinds, R.; Thurber, R.V. Stress and stability: Applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17121, doi:10.1038/nmicrobiol.2017.121.
101. 100. Van Soest, J.P. *Nutritional ecology of the ruminant*; Cornell University Press: Ithaca, NY, USA, 1994.
102. 101. Jones, J.; DiBattista, J.D.; Stat, M.; Bunce, M.; Boyce, M.C.; Fairclough, D.V.; Travers, M.J.; Huggett, M.J. The microbiome of the gastrointestinal tract of a range-shifting marine herbivorous fish. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2000, doi:10.3389/fmicb.2018.02000.
103. 102. Zhang, X.; Wu, H.; Li, Z.; Li, Y.; Wang, S.; Zhu, D.; Wen, X.; Li, S. Effects of dietary supplementation of *Ulva pertusa* and non-starch polysaccharide enzymes on gut microbiota of *Siganus canaliculatus*. *J. Oceanol. Limnol.* **2018**, *36*, 438–449, doi:10.1007/s00343-017-6235-x.
104. 103. Miller, D.A.; Suen, G.; Bruce, D.; Copeland, A.; Cheng, J.-F.; Detter, C.; Goodwin, L.A.; Han, C.S.; Hauser, L.J.; Land, M.L.; et al. Complete Genome Sequence of the Cellulose-Degrading Bacterium *Cellulosilyticum lentocellum*. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 2357–2358, doi:10.1128/JB.00239-11.
105. 104. Mountfort, D.O.; Campbell, J.; Clements, K.D. Hindgut Fermentation in Three Species of Marine Herbivorous Fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1374–1380, doi:10.1128/AEM.68.3.1374-1380.2002.
106. Clements, K.D.; Choat, J.H. Fermentation in Tropical Marine Herbivorous Fishes. *Physiol. Zool.* **1995**, *68*, 355–378, doi:10.1086/physzool.68.3.30163774.

6. Conclusions et perspectives

6. I – Quel est l’inventaire microbien du tractus digestif des poissons coralliens ?

6. I. A – Un microbiome bactérien, très variable, spécifique du tractus entérique et du domaine marin.

Grâce à l'effort d'échantillonnage des campagnes *Megafauna* et aux Seychelles, j'ai pu décrire l'inventaire microbien du tractus digestif d'un large panel d'espèces de poissons coralliens. L'utilisation d'amorces universelles est réputée pour amplifier majoritairement les bactéries, sous estimant les autres domaines (*i.e. Eukarya, Archaea*). Ceci dit, j'ai tout de même essayé d'élargir la description du microbiome en prenant également en compte le domaine des Archées grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. Les résultats négatifs que j'ai obtenus, avec 13 combinaisons d'amorces différentes spécifiques aux Archées, ont finalement démontré que le microbiome entérique des poissons coralliens est essentiellement bactérien. Il reste encore de nombreuses questions quant aux domaines des Eucaryotes et des Virus que je n'ai pas abordés. Pourtant, les poissons sont de bons candidats d'études pour les parasites eucaryotes, multicellulaires et unicellulaires (Skovgaard *et al.*, 2009; Ñacari and Oliva, 2016; Scheifler *et al.*, 2019) qui sont à la fois impliqués dans la fitness de leurs hôtes mais également sur les interactions entre l'hôte et son environnement (*i.e.* changement de comportement), jouant alors un rôle essentiel dans les dynamiques de populations et sur le fonctionnement des écosystèmes (Lafferty *et al.*, 2008; Hatcher *et al.*, 2012). Avant l'essor des NGS et encore de nos jours, l'analyse parasitologique se faisait essentiellement à l'aide de techniques d'identification morphologique, où il peut être difficile de distinguer certaines espèces cryptiques et certains stades de développement (*i.e.* cystes, œufs et stades larvaires), rendant alors l'étude très chronophage (Trujillo-González *et al.*, 2015; Friedheim, 2016). A notre connaissance, les études faites sur les parasites, et plus généralement les eucaryotes, associés aux poissons coralliens n'ont pas été menées sur une grande diversité d'espèces mais pourrait apporter des connaissances nouvelles et offrir la découverte de nouvelles espèces. Au vue de la grande diversité des Bactéries associées au tractus digestif des poissons, la diversité de la virosphère, notamment les bactériophages (associés au bactériome), devrait être également considérablement élevée (Geoghegan *et al.*, 2018). Celle-ci joue un rôle déterminant dans la

structuration des communautés microbiennes grâce au contrôle top-down ainsi que dans le contrôle des populations hôtes (Geoghegan *et al.*, 2021).

Dans le **manuscrit A**, j'ai pu assigner les 2 080 ASVs constituant le core microbien des poissons coralliens et démontrer que ces séquences étaient à 32% spécifiques des milieux entériques. Parmi celles-ci, les séquences associées aux animaux terrestres ne représentaient que 25%, suggérant un fort degré de conservation au domaine marin. Ces séquences étaient principalement assignées à des clades (*i.e.* *Clostridiales*, *Vibrionales*, *Desulfovibrionales*), déjà décrits comme intimement liés au processus de digestion tant bien chez les poissons (Clements *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2012) que chez les animaux terrestres (Zhu *et al.*, 2011). Ces bactéries produisent des enzymes qui ne peuvent être synthétisées par l'hôte lui-même (*e.g.* *beta-glucanases*, *carbohydrases*, *cellulases* et *chitinases*), et sont donc d'un intérêt majeur pour l'hôte, notamment chez les herbivores et les détritivores (Merrifield and Rodiles, 2015). Le rôle de ces taxa core reste encore à confirmer avec des analyses de transcriptomique ou de protéomique.

Par ailleurs, 39% des séquences microbiennes qui correspondaient à une origine animale étaient communes aux invertébrés marins et pourraient suggérer que le core microbien est constitué de taxa généralistes du biome récifal. De ce même fait, j'ai démontré que le microbiome entérique des poissons était en connectivité avec l'environnement, qui peut servir de réservoir pour certains clades microbiens, comme c'est le cas de la bactérie géante *Epulopiscium*. A l'inverse, d'autres clades (43.8%), comme les *Oxyphotobacteria* (*Cyanobacteria*) ou les *Alphaproteobacteria* (*Proteobacteria*), s'apparentent à des échantillons d'origine environnementale suggérant que les poissons peuvent être des réservoirs de diversité planctonique. Sachant que certains grands prédateurs (*i.e.* empereurs, mérous) peuvent parcourir plusieurs centaines de kilomètres (Green *et al.*, 2015), ils pourraient avoir un rôle majeur sur la dispersion et la distribution géographique de ces communautés microbiennes (Trousselier *et al.*, 2017).

En plus de servir de réservoir microbien, le tractus entérique des poissons peut constituer un hot-spot de diversité microbienne. La majorité des ASVs (99%) ont de faibles occurrences, en étant présent dans < 50 individus (**Figure 6.1.1**). En moyenne, un ASV est partagé par seulement 3 individus, reflétant la grande variabilité et originalité des microbiotes entériques. Ces séquences sont donc uniques, et pourraient avoir un rôle bénéfique pour l'hôte où pour les processus écologiques impliqués dans les fonctionnements récifaux. Une étude récente a démontré que la faune récifale (*i.e.* poissons et invertébrés) représentait un hot-spot

de diversité procaryotes, constituant 2.5% de la diversité procaryote sur Terre (Chiarello *et al.*, 2020). Cette étude s'est concentrée uniquement sur le microbiote cutané. En utilisant l'estimation de Louca *et al.* (2019), la diversité de procaryotes sur Terre serait estimée entre 0.8 - 1.6 millions OTUs (avec un seuil de similarité à 97%). Son équivalent en ASV serait 3.4 fois plus élevé (Louca *et al.*, 2016) et correspondrait donc à une diversité de 2.72 - 5.44 millions d'ASVs. En comparant les ASVs core résultant de ma thèse, ils constitueraient donc 0.038 - 0.076% de cette diversité globale. Ce chiffre peut paraître négligeable mais il est important de rappeler que la diversité d'espèces hôte étudiée dans ma thèse ne représentait que 1,2 - 1,6% de la diversité des poissons coralliens sur Terre (en considérant que le nombre d'espèces de poissons coralliens décrit se situe entre 6 000 et 8 000 espèces (Kulbicki *et al.*, 2013)). Au vu de la grande variabilité entre les individus, la diversité de procaryotes portée par l'ensemble des poissons devrait donc être considérable.

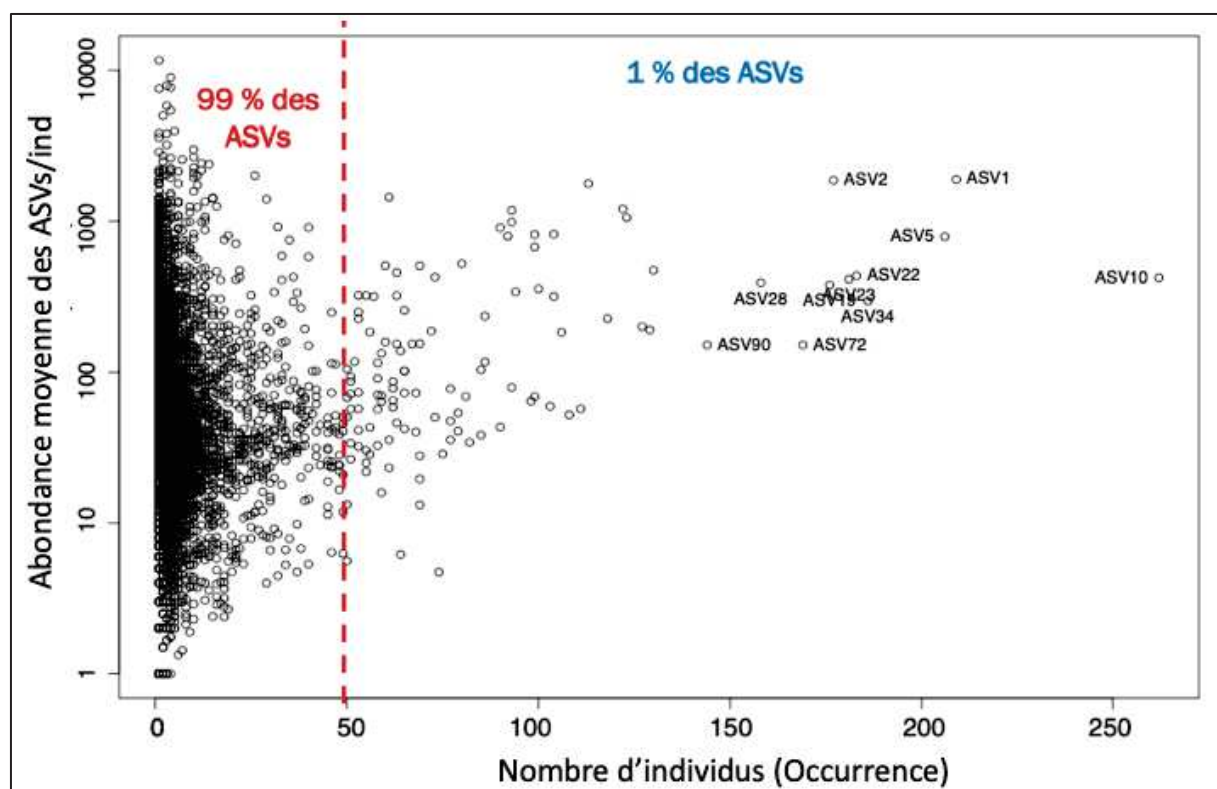


Figure 6.1.1 : Distribution des ASVs chez les poissons coralliens. La plupart des ASVs sont originaux en étant présents chez peu d'individus (faible occurrence). En moyenne, un ASV est distribué chez seulement 3 individus. Le 1% d'ASVs présents à forte occurrence constitue des taxa caractéristiques des tractus digestifs (*i.e.* *Clostridiales*, *Vibrionales*).

6. I. B – Les poissons n'émettent pas de méthane

Dans le **manuscrit B**, j'ai pu mettre en évidence l'absence quasi-totale d'archées dans le microbiome entérique des poissons. Le faible taux de succès des études qui se sont concentrées sur ce domaine, ainsi que les tests que j'ai pu effectuer, avec 13 combinaisons d'amorces spécifiques différentes, accompagnés d'une analyse par détection en qPCR, m'ont poussée à conclure que les archées sont en présence trace dans le microbiome entérique des poissons. Les résultats similaires notés chez l'iguane marin qui ne contient pas d'archées méthanogènes au contraire de ses pairs terrestres m'avaient laissé supposer que l'absence d'archées pouvait être liée au domaine marin. Le meilleur taux de détection des archées constaté chez les espèces de poissons dulçaquicoles comparé aux espèces marines a également renforcé mon hypothèse. Bien qu'aucune archée n'ait été décrite chez les tortues ou les dugongs pourtant herbivores, il est important de noter que cette tendance ne semble pas s'appliquer à tout le domaine marin. Plusieurs études ont révélé la présence d'archées méthanogènes dans le tractus digestifs des Cétacées (Sanders *et al.*, 2015; Erwin *et al.*, 2017; Glaeser *et al.*, 2021). Bien que 2,6 fois moins abondantes que les Bactéries (Glaeser *et al.*, 2021), elles sont majoritairement représentées par des méthanogènes de l'Ordre des *Methanomicrobia* et des *Methanomasiliicoccales*, déjà décrits dans le tractus intestinal de nombreux animaux notamment les mammifères terrestres (Borrel *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2017; Söllinger and Urich, 2019). Par ailleurs, des flux conséquents de méthane ont été détectés provenant de la macrofaune benthique où cette dernière contribuerait à 9.8% des émissions de méthane de la mer Baltique (Bonaglia *et al.*, 2017). C'est également le cas des fermes aquacoles de crevettes où il a été démontré qu'elles pourraient être de considérables hot-spot d'émissions de méthane avec une estimation de 63.68 Tg CO₂-eq par an (Yang *et al.*, 2018). Cependant, la salinité des bassins était négativement corrélée aux flux de méthane mesurés, renforçant de surcroît mon hypothèse que le domaine marin pouvait agir comme un répresseur des émissions de méthane d'origine biologique.

Ma dernière expérience faite *in vivo* chez des Saupes et des Sardines juvéniles de Méditerranée a également démontré que les poissons n'émettaient vraisemblablement pas de méthane. Avec la demande en protéine croissante et l'accroissement des fermes de poissons aquacoles, ainsi que la tropicalisation des mers qui favorisent les traits herbivores, mes résultats s'avèrent être réconfortants quant à l'émission nulle de méthane issue des poissons marins.

Ceci-dit, il serait intéressant de réitérer cette expérience avec d'autres espèces, notamment dulçaquicoles, chez qui la présence d'archées méthanogènes a été notée (Ni *et al.*,

2014; Xia *et al.*, 2014; Youngblut *et al.*, 2020). Un système plus adapté pour l'incubation serait également à revoir. Dans mon expérience, je devais éviter l'hypoxie des poissons qui étaient enfermés dans les sacs hermétiques. J'ai donc dû adapter la période d'incubation à un temps raisonné (1h). Pour éviter ce biais, Martin Dessart et moi, avons songé à construire un mésocosme hermétique où nous pouvions avoir un contrôle des conditions abiotiques (*i.e.* luminosité ; température) et permettre un flux permanent d'eau de mer filtrée qui permettrait d'oxygéner en continu le mésocosme (**Figure 6.1.2**). Le méthane étant un composé extrêmement volatile, il passerait en phase gazeuse du mésocosme, partie qui serait peu volumineuse pour permettre que le méthane s'y concentre et y soit précisément mesuré (**Figure 6.1.2**).

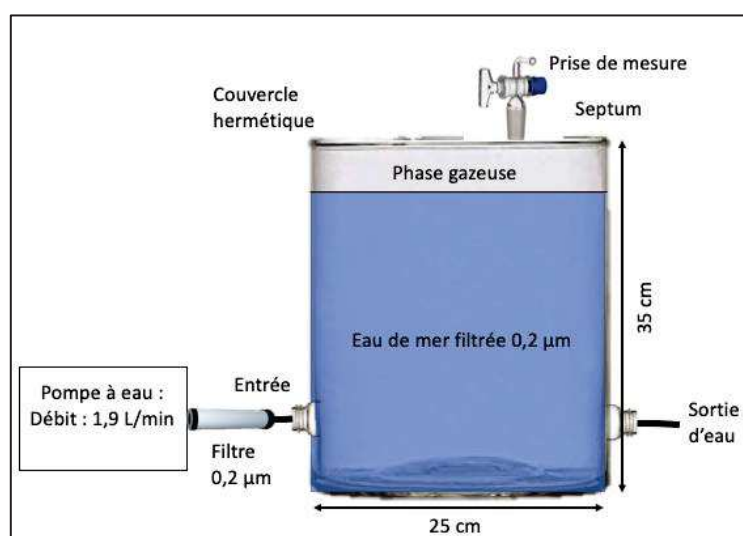


Figure 6.1.2 : Schéma d'un mésocosme pour servir de chambre de mesure pour les gaz émis par les poissons. Les molécules volatiles seraient directement concentrées dans la phase gazeuse hermétique qui serait connectée à un septum permettant une prise de mesure. Ce mésocosme permettrait d'incuber des poissons sur une période plus longue que la précédente expérience que j'avais faite.

Ceci dit, au vu des résultats négatifs obtenus sur la présence d'archées méthanogènes chez les poissons marins, je n'ai finalement pas réitéré l'expérience en mésocosme, et me suis plutôt appliquée à comprendre pourquoi les poissons marins étaient dépourvus d'archées méthanogènes.

L'importance relative des divers groupes trophiques est dépendante de la disponibilité des composés organiques ou inorganiques, susceptibles d'intervenir en tant qu'accepteurs d'électrons (Atlas, 1984). Le domaine marin étant riche en sulfate SO_4^{2-} , notamment dans les eaux tropicales où la température favorise ses fortes concentrations, je me suis concentrée sur

la voie de la sulfato-réduction comme accepteur final des processus de fermentation (Bryant, 1979) (**Figure 6.1.3**). Mon hypothèse suggérait que la méthanogénèse était totalement absente dû à la compétition des bactéries sulfato-réductrices (BSR) pour l'utilisation de certains substrats communs comme le dihydrogène (**Figure 6.1.3**).

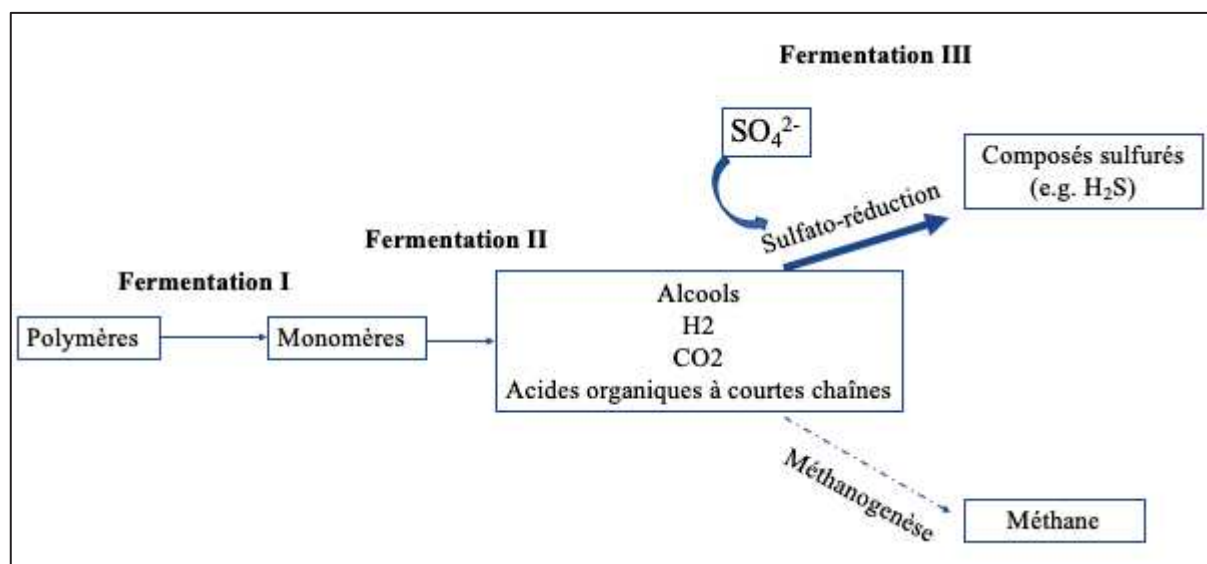


Figure 6.1.3 : Processus simplifié de la chaîne détritque anaérobie en 3 étapes. Les polymères issus de l'alimentation sont hydrolysés en monomères par une première fermentation. Les monomères sont ensuite transformés en alcools, dihydrogène, CO₂ et acides organiques à courtes chaînes (e.g. acétate, formate). La présence en sulfate SO₄²⁻ dans le milieu marin (i.e. eau de mer, algues) favorise la sulfato-réduction comme processus de fermentation des seconds produits, à l'instar de la méthanogénèse.

En utilisant les résultats issus du bactériome et par détection PCR, j'ai démontré que les BSR étaient en effet plus abondantes que les méthanogènes dans les tractus entériques des poissons coralliens. L'analyse prédictive des fonctions associées aux ASVs démontrent également cette tendance où la contribution des gènes codants pour les enzymes impliquées dans la sulfato-réduction pouvait atteindre 0.20% de la contribution fonctionnelle relative totale chez certains individus. Mes conclusions rejoignent celles de Hong *et al.*, (2011) sur les iguanes marins chez qui la sulfato-réduction étaient également favorisée et s'imposait sur les processus de méthanogénèse.

A la vue de ces résultats, il s'agirait désormais de comprendre le rôle des microbiomes entériques associés aux poissons marins dans le cycle du soufre. Nous ne savons pas quels seraient les produits finaux de ces processus de sulfato-réduction, ni leur impact sur l'environnement. La sulfato-réduction est déjà décrite comme étant un processus de

fermentation majeure dans le tractus digestif des animaux (Wang, 2012) où la formation de dihydrogène sulfuré (H₂S) peut être à la fois bénéfique dans les fonctions physiologiques de son hôte mais lui être également toxique, à lui et à l'environnement (Miller *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2018). La présence du genre *Desulfovibrio* sp., qui représentait 44% des BSR présentes dans le microbiome entérique des poissons coralliens, est également un genre dominant chez les mammifères, notamment chez l'humain, la vache et le rat, et est l'un des principaux responsables de la formation d'H₂S (Shah *et al.*, 2020). Aucune étude n'a porté d'attention sur sa production et effet chez les poissons marins. L'importance des BSR dans le microbiome entérique des poissons coralliens que j'ai pu mettre en lumière devrait soulever de nouvelles questions quant à leur rôle et influence à la fois sur leur hôte, mais également sur l'environnement.

6. II- Quels sont les déterminants intrinsèques expliquant la structure du microbiome ?

6. II. A – La phylogénie

La connaissance des microbiomes coralliens est minime en termes d'espèces hôtes étudiées. En utilisant un large panel d'espèces dont certaines ont divergé il y a plus de 150 Ma, j'ai pu tester la phylogénie sur les structures de leurs microbiomes entériques. A la différence des vertébrés chez qui le régime alimentaire est un des déterminants majeurs des compositions microbiennes (Youngblut *et al.*, 2019), j'ai démontré dans le **manuscrit C** que l'effet espèce était le déterminant le plus fort, étant 13 fois plus important que le régime alimentaire qui avait la même influence que la région.

En analysant comment les microbiomes se structuraient entre les différentes espèces et en fonction de leur phylogénie, j'ai pu mettre en évidence la forte relation phylosymbiotique entre le microbiome entérique et les poissons coralliens. Ce signal était également supporté par la comparaison topologique des arbres qui démontrait une congruence significative entre l'arbre phylogénétique des poissons et le dendrogramme des dissimilarités des microbiomes. Autrement dit, plus les espèces sont proches phylogénétiquement, plus fortes sont leurs similarités microbiennes.

Plusieurs études avaient pourtant démontré le contraire mais n'avaient pris en compte qu'un nombre restreint d'espèces (Givens *et al.*, 2015) ou s'étaient concentrées sur une seule

famille (Escalas *et al.*, 2021). Chez le microbiome cutané des poissons coralliens, il semblait subsister également un signal de phylosymbiose, mais beaucoup moins fort (Chiarello *et al.*, 2018). Mes résultats semblent donc corroborer l'hypothèse que les microbiomes entériques ont plus de tendance à suivre des assemblages phylosymbiotiques que les microbiomes exposés directement à l'environnement (Mazel *et al.*, 2018).

Le signal de phylosymbiose détecté était aussi fort que celui observé chez les vertébrés terrestres (Groussin *et al.*, 2017 ; Song *et al.*, 2019) chez qui la transmission verticale est souvent évoquée comme force héréditaire pour l'établissement de la phylosymbiose. Ce n'est pourtant pas le cas chez les poissons qui acquièrent leurs premiers symbiotes *via* l'environnement (Sylvain *et al.*, 2017 ; Llewellyn *et al.*, 2014), bien que certaines espèces (*e.g.* *Pomacentridae*, *Syngnathidae*) puissent prendre soin de leur œufs et influencer les premières colonisations du chorion (Beemelmans *et al.*, 2019) ou transmettre leur microorganismes *via* des mécanismes trans-ovariens (Brock and Bullis, 2001). Nos résultats supportent donc que l'établissement de la phylosymbiose peut également subvenir par des transmissions microbiennes horizontales (Lim and Borderstein, 2020).

Les mécanismes régissant ces assemblages phylosymbiotiques chez les poissons coralliens restent toutefois à élucider. Il a été montré chez les vertébrés terrestres (*e.g.* ruminants, primates) que les hôtes qui partagent une histoire évolutive similaire ont en effet des traits physiologiques, des comportements et une écologie similaire, qui vont collectivement sélectionner les mêmes ensembles microbiens environnementaux (Mazel *et al.*, 2018; Amato, 2019; Moran *et al.*, 2019; Cholewińska *et al.*, 2020). Parmi ces processus, la radiation des niches trophiques pourrait être liée à des processus de co-diversification du microbiome. Cela pourrait être le cas pour de nombreux clades microbiens chez qui j'ai pu démontrer un signal de phylosymbiose exclusif aux herbivores (*Epulopiscium*, *Vibrionales*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*) ou aux carnivores (*Clostridium sensu stricto 1*, *Tenericutes*). Par ailleurs, j'ai relevé que 99,5% des unités taxonomiques conservées (CTUs) au sein des poissons sont également associées au régime alimentaire. Bien que le régime alimentaire explique moins la variabilité des microbiomes entériques, des perspectives d'analyses quant à la relation entre le régime alimentaire, la phylogénie et la structuration du microbiome entérique expliqueraient une potentielle co-diversification entre l'hôte et son microbiome.

Parmi ces CTUs, j'ai pu retrouver de nouveau la bactérie géante *Epulopiscium*. Cette bactérie mérite d'être investiguée de façon plus approfondie. Le genre *Epulopiscium* présente une grande diversité morphologique et phylogénétique avec une grande polyplœdie (*e.g.* elle

peut contenir 600 000 copies de génome/cellule) (Fishelson *et al.*, 1985; Mendell *et al.*, 2008; Miyake *et al.*, 2016). Son rôle exact n'est pas encore élucidé mais elle semblerait impliquée dans des processus de dégradation des polysaccharides de macroalgues grâce à ces enzymes hydrolases (*e.g.* beta-agarase, alginate lyase, carrageenase) (Ngugi *et al.*, 2017). Bien qu'elle ait été toujours assignée aux herbivores et particulièrement aux poissons chirurgiens (Clements *et al.*, 1989), elle est présente dans 95% de mes échantillons, tant bien chez les herbivores que chez les carnivores. J'ai d'ailleurs pu détecter deux groupes génétiquement distincts entre les *Acanthuridae* et les autres espèces. Une étude faite chez les *Acanthuridae* a déjà observé l'existence de deux types d'*Epulopiscium* morphologiquement et génétiquement distincts (Miyake *et al.*, 2016). Dans cette étude, un groupe était distribué chez les *Acanthurus* sp., *Zebrasoma* sp., *Ctenochaetus* sp. et l'autre chez les *Naso* sp., séparés des *Acanthurus* sp. il y a 50 Ma (**Figure 6.2.1**). Dans le manuscrit C, j'évoque notamment le fait qu'elle soit particulièrement symbiotique au sein des herbivores, et particulièrement aux *Acanthuridae*. L'appartenance de toutes ces séquences au core microbien que j'ai décrit, suggère une potentielle synergie entre cette bactérie géante et les autres microorganismes. La compréhension de son évolution, au travers divers organismes (*i.e.* vertébrés vs invertébrés, marins vs terrestres) et compartiments (*i.e.* sédiment, eau de mer, algues) est une des perspectives de continuité de cette thèse. Cette bactérie pourrait être un bon modèle pour étudier les mécanismes évolutifs à l'échelle de la bactérie et tester l'hypothèse de co-évolution au travers différentes espèces et localités.

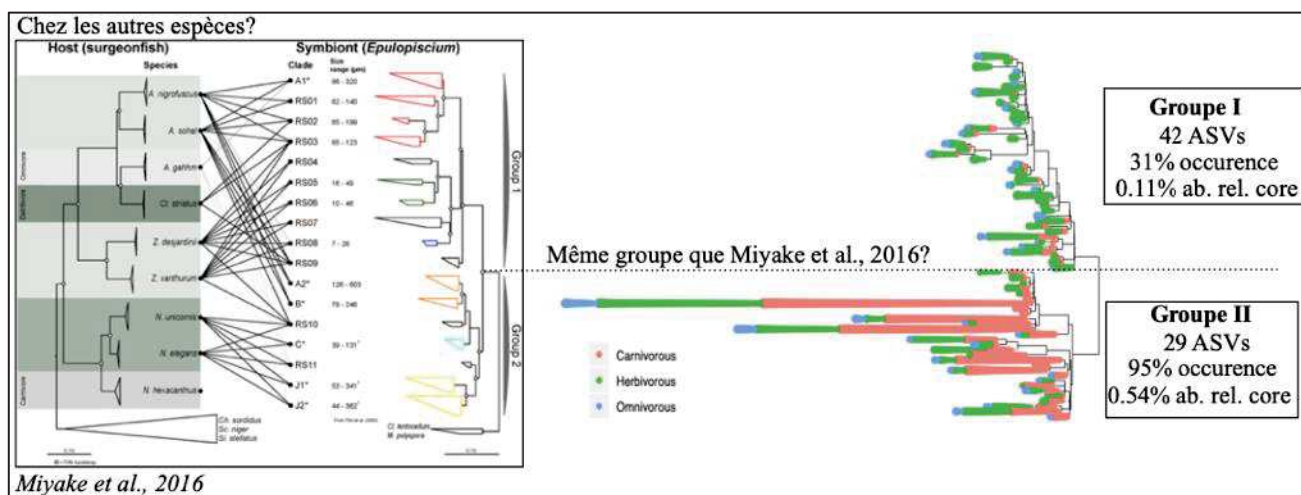


Figure 6.2.1 : Deux groupes phylogénétiquement et morphologiquement distincts d'*Epulopiscium*. Les forces déterminantes qui influencent la distribution et l'évolution de cette bactérie chez les poissons coralliens et, plus largement, dans le règne animal, sont encore à élucider. Il se peut que cette bactérie ne soit pas seulement symbionte des *Acanthuridae* mais plutôt généraliste des poissons coralliens. L'existence de ces deux groupes distincts, qui semblent être distribués de façon spécifique chez les *Acanthuridae* et chez les autres espèces, peut suggérer des rôles distincts apportés à leurs hôtes avec une co-évolution propre à chaque groupe.

6. II. B – Le régime alimentaire

Dans le **manuscrit D** j'ai démontré que, bien que le régime alimentaire soit un déterminant moins puissant que l'effet espèce, il pouvait influencer significativement certains clades microbiens. Le but de ce chapitre était d'analyser les microbiomes le long d'un gradient détaillé de différentes stratégies trophiques pour explorer la relation entre la typicité des régimes alimentaires et des clades microbiens « biomarqueurs » ainsi que des fonctions associées propres. J'ai également montré la grande variabilité microbienne existante entre les différentes stratégies carnivores. Ces derniers sont bien documentés chez les espèces terrestres (An et al., 2017; Zhu et al., 2018; Greene et al., 2018; Guo et al., 2020) mais très peu chez les poissons coralliens (Gao et al., 2020) alors qu'ils représentent la guildes trophique la plus diversifiée.

Grâce à un échantillonnage riche en carnivores, j'ai pu observer la présence de nouveaux taxa uniques qui n'avaient jamais été associés aux poissons coralliens. Bien qu'uniques dans la contribution globale du core microbien, ces derniers pourraient renfermer des fonctions essentielles à leurs hôtes et aux processus écologiques des récifs (Trousselier et

al., 2017). Cependant, ces taxa sont les plus vulnérables face aux perturbations environnementales et pourraient être voués à disparaître avec la perte croissante de la mégafaune marine (Graham *et al.*, 2006; Pinsky *et al.*, 2019). Nous l'avons vu dans le **manuscrit A**, les poissons pourraient être des vecteurs microbiens de taxa uniques bénéfiques dans les récifs. Des études récentes ont notamment démontré que les poissons corallivores (*i.e.* poissons perroquets, poissons papillons) pouvaient représenter une voie de transmission microbienne au travers des coraux avec des espèces bénéfiques comme les *Symbiodinium* et les *Oceanospirillum* (Ezzat *et al.*, 2019; Grupstra *et al.*, 2021) mais également opportunistes comme les *Rhodobacteraceae* (Ezzat *et al.*, 2019). Dans ce manuscrit, j'ai pu justement mettre en évidence la charge importante de bactéries opportunistes comme les *Staphylococcus* et les *Vibrio*. J'ai démontré qu'une corrélation existait entre cette charge et la position trophique de l'hôte, l'entropie et la variabilité microbienne, suggérant alors qu'une faible diversité retrouvée chez les hauts niveaux trophiques pourraient permettre l'installation de ce type de bactéries. Les coraux sont sous la menace de nombreuses perturbations environnementales (*e.g.* changement climatique, pollution) qui sont souvent corrélée avec des maladies microbiennes (Munday *et al.*, 2008). Le genre *Vibrio* est justement l'un des genres responsables de phénomène épidémiologique des vibrioses chez les bivalves et les coraux scléactiniaires (Richards *et al.*, 2018; Muller *et al.*, 2020). Comprendre leur rôle dans la dispersion de bactéries bénéfiques, pathogènes et opportunistes est alors essentiel dans les problématiques de conservation des récifs coralliens.

Le core microbiome est associé à certaines fonctions bénéfiques pour l'hôte, influencées par ses stratégies alimentaires. Ceci-dit, je m'attendais à retrouver un signal plus distinct entre les différentes classes alimentaires et même entre les différentes guildes trophiques, notamment entre carnivores et herbivores. Par exemple, les résultats de stage de Manon Audax sur le microbiome entérique des poissons récifaux de Mayotte ont permis de détecter une contribution significativement plus importante des gènes microbiens codant pour les cellulases chez les herbivores (Audax, 2018), ce que je n'ai pu retrouver dans mon jeu de données. En effet, les gènes fonctionnels que j'ai pu distinguer entre les guildes trophiques étaient majoritairement associés aux voies métaboliques générale pour le fonctionnement cellulaire des bactéries, et non aux processus de digestion de l'hôte, bien que les voies métaboliques associées aux acides aminées furent fortement liées aux carnivores. Ceci-dit, il semblerait que les hôtes carnivores ne soient pas dépendants des fonctions digestives portées par leur microbiome entérique. Par ailleurs, ces résultats pourraient être dû à la forte

redondance fonctionnelle chez les espèces microbiennes créant ainsi un signal parasite. En effet, la grande quantité de taxa ainsi que la présence de taxa rares rend difficile l'identification de groupes microbiens ou fonctionnels spécifiques à chaque stratégie alimentaire. Pour pallier à ce biais, de futures analyses d'apprentissage comme le « random forest » pourraient compléter ce travail pour cibler des groupes microbiens permettant de prédire un certain type de régime alimentaire (Breiman, 2001; Knights *et al.*, 2011).

6. III – Y a-t-il une influence d'un changement de récif corallien à un récif à dominance algale sur le microbiome?

Dans ce dernier chapitre visant à étudier l'effet d'une perturbation environnementale sur le microbiome entérique des poissons, j'ai pu démontrer, dans le **manuscrit E**, que la transition d'une couverture corallienne vers une colonisation par les macroalgues modifiaient significativement les compositions bactériennes associées aux tractus entériques des poissons. Cet effet est d'autant plus important chez les herbivores chez qui une dominance de bactéries fermentatives a été observée chez les *Siganidae*, famille dominante dans les récifs colonisés par les macroalgues. La transition des récifs d'une couverture corallienne à une dominance de macroalgues s'avère devenir le futur de nos récifs coralliens (Munday *et al.*, 2008). Cette transition implique deux conséquences notables.

La première est le bénéfice écologique apporté aux poissons herbivores dits « brouteurs », qui disposent alors d'une abondante ressource alimentaire. Ceux-ci sont donc favorisés et peuvent prospérer dans ce nouvel écosystème à l'instar des poissons dépendants des structures coralliennes. La modification de ces populations hôtes va donc s'accompagner d'une modification des microbiomes associés, comme je l'ai démontré dans cette étude. Ces phénomènes influencent donc la distribution des holobiontes et les phénotypes qui découlent de chaque entité. L'hologénome permettra une expression de gènes qui va découler de cette interaction hôte/microorganismes/environnement. Cette expression de caractères phénotypiques au travers de l'holobionte s'appelle le phénotype étendu (Dawkins, 1984). Par exemple, dans mon étude, les microbiomes des poissons coralliens herbivores bénéficient d'une disponibilité de substrat (*i.e.* macroalgue) abondante et vont permettre la dégradation des molécules complexes *via* leurs enzymes digestives. Nous l'avons vu précédemment dans les **manuscrits B et C**, ces molécules seront dégradées à travers plusieurs processus de fermentation syntrophiques impliqués dans la nutrition de l'hôte et qui permettront le maintien d'un microbiome stable. Ce phénotype étendu est alors observable au niveau de l'holobionte, où les hôtes peuvent prospérer grâce à la disponibilité des ressources et au niveau du récif, où le développement des algues est contrôlé par la prédation (Mumby *et al.*, 2006) (**Figure 6.3.1**). D'un point de vue écologique, les holobiontes herbivores ont un rôle dominant dans le contrôle des macroalgues et favorisent ainsi la résilience des coraux. Le rôle du microbiome dans cette interaction est majeur et devrait être pris en compte comme trait fonctionnel propre (Scott *et al.*, 2020).

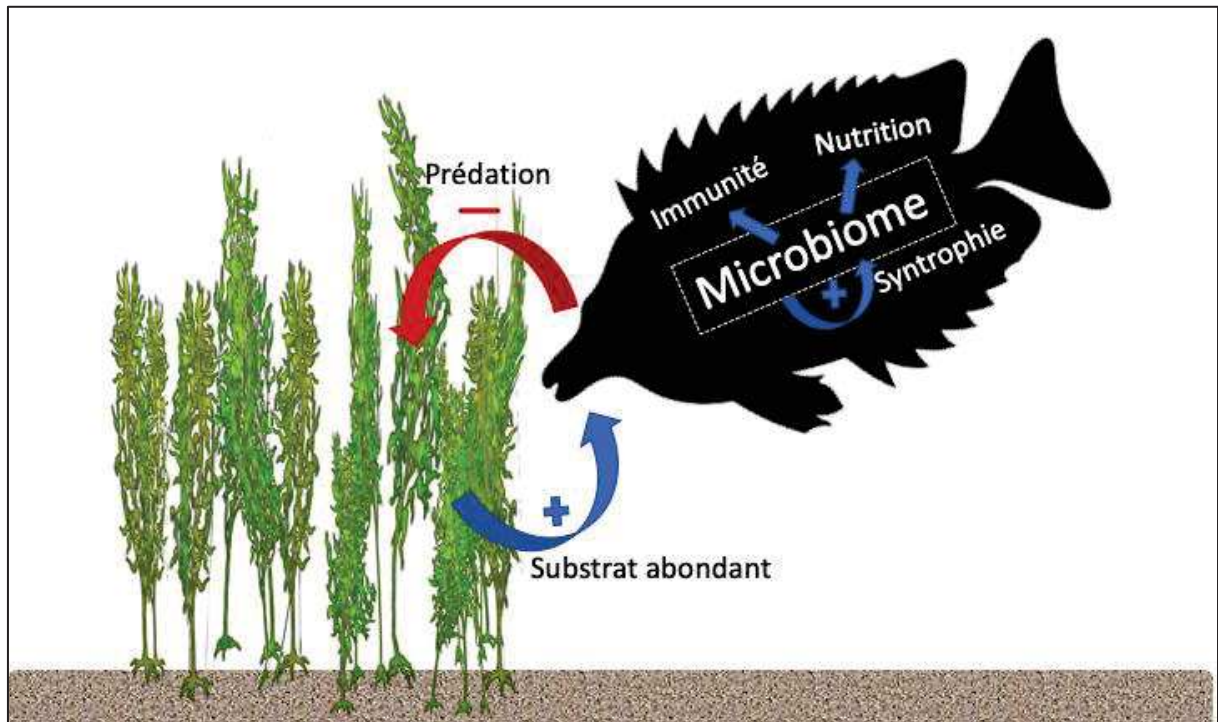


Figure 6.3.1 : Le phénotype étendu chez les herbivores. Leur microbiome est adapté pour dégrader les macroalgues à travers de multiples processus de fermentation incluant plusieurs clades microbiens (*i.e.* syntrophie). Grâce aux rôles du microbiome dans les processus digestifs, les herbivores peuvent dégrader l'abondance macroalgale de plus en plus dominante dans les récifs coralliens. Par ce biais, cet holobionte contrôle, par la prédation, le développement de celles-ci et peuvent ainsi favoriser la résilience des coraux.

La deuxième conséquence de cette transition est le phénomène de microbialisation, que j'ai déjà évoqué dans l'introduction 1.II.D et dans le **manuscrit E**. Rapidement, les algues non consommées par les herbivores vont favoriser le développement de clades microbiens copiotrophes (Haas *et al.*, 2010, 2016; Wild *et al.*, 2010; Haas and Wild, 2010). Nombre de ces bactéries sont des pathogènes opportunistes qui, en créant des zones hypoxiques, vont impacter la santé des coraux à l'instar du développement des macroalgues (Nelson *et al.*, 2013c; Haas *et al.*, 2013). Dans notre étude, nous n'avons pu vérifier si cette boucle DDAM (*DOC, Disease, Algae, Microorganism* en anglais) (Haas *et al.*, 2016) était déjà mise en place et si les poissons étaient physiologiquement impactés par cet effet. Ceci-dit, il serait intéressant d'expérimenter en laboratoire, l'effet de cette transition, sur un nombre conséquent d'individus d'une même espèce, afin de pouvoir vérifier si cet effet est notoire au niveau du microbiome de l'hôte. En effet, notre effectif, dépendant des pêches, était trop faible par type de récif ($n = 3$ pour *Scarus ghobban* dans les récifs à couverture macroalgale) pour pouvoir observer un tel effet. Un

effectif de 10 par type de récif aurait été une base pour pallier l'effet de la forte variabilité intra-spécifique observée chez les poissons.

Par ailleurs, les phénomènes de microbialisation sont d'autant plus forts lorsqu'ils sont couplés aux impacts humains (Halpern *et al.*, 2008; McDole *et al.*, 2012). Les perturbations environnementales peuvent également impliquer une pollution liée à l'anthropisation, phénomène récurrent dans les îles tropicales. Certaines d'entre elles possèdent une population conséquente et subissent un tourisme de masse sans être adaptées à la gestion de leurs déchets et de leurs eaux usées. C'est notamment le cas des Seychelles où peu de ménages sont raccordés au système collectif des eaux usées. D'autres sont considérées comme prêtes, comme par exemple les îles Éparses où seuls les militaires et les scientifiques peuvent y accéder. Grâce à notre échantillonnage, il serait donc envisageable de tester l'effet du niveau d'anthropisation sur les microbiomes entériques des poissons coralliens en comparant les bactéries pathogènes potentiellement associées aux humains (PHPB, *Potential Human Pathogenic Bacteria* en anglais) comme les *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Corynebacterium* ou *Aeromonas*, le long d'un gradient de pressions anthropiques. Le gradient d'anthropisation étant décroissant entre les Seychelles, la Martinique et les Éparses, nous nous attendrions à ce que la charge en PHPB soit également décroissante le long de ces îles.

7. Références bibliographiques

-A-

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J. and Versalovic, J.** (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine* **6**, 237ra65-237ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.
- Abbott, A.** (2016). Scientists bust myth that our bodies have more bacteria than human cells. *Nature*. doi: 10.1038/nature.2016.19136.
- Abdul Razak, S., Griffin, M. J., Mischke, C. C., Bosworth, B. G., Waldbieser, G. C., Wise, D. J., Marsh, T. L. and Scribner, K. T.** (2019). Biotic and abiotic factors influencing channel catfish egg and gut microbiome dynamics during early life stages. *Aquaculture* **498**, 556–567. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.073.
- Aeby, G. and Santavy, D.** (2006). Factors affecting susceptibility of the coral *Montastraea faveolata* to black-band disease. *Marine Ecology Progress Series* **318**, 103–110. doi: 10.3354/meps318103.
- Aeby, G., Callahan, S., Cox, E., Runyon, C., Smith, A., Stanton, F., Ushijima, B. and Work, T.** (2016). Emerging coral diseases in Kāneʻohe Bay, Oʻahu, Hawaiʻi (USA): two major disease outbreaks of acute *Montipora* white syndrome. *Diseases of Aquatic Organisms* **119**, 189–198. doi: 10.3354/dao02996.
- Akinyemi, A. A. and Buoro, O. O.** (2011). Occurrence of Bacteria Found in Gills, Skin, Buccal Cavity of *Lutjanus agennes*, *Pseudolithus elongatus* and *Sphyrna barracuda* from Lagos Lagoon, Nigeria. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* **6**, 555–562. doi: 10.3923/jfas.2011.555.562.
- Al-Harbi, A. H. and Naim Uddin, M.** (2004). Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture* **229**, 37–44. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00388-0.
- Allen, G.** (2016). Rebalancing the global methane budget. *Nature* **538**, 46–48. doi: 10.1038/538046a.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Amann, R. I. and Ludwig, W.** (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. **59**, 143–169.
- Amato, K. R.** (2019). Missing Links: the Role of Primates in Understanding the Human Microbiome. *mSystems* **4**,. doi: 10.1128/mSystems.00165-19.
- Amato, K. R., Yeoman, C. J., Kent, A., Righini, N., Carbonero, F., Estrada, A., Rex Gaskins, H., Stumpf, R. M., Yildirim, S., Torralba, M., Gillis, M., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A. and Leigh, S. R.** (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *ISME Journal* **7**, 1344–1353. doi: 10.1038/ismej.2013.16.
- Amato, K. R., Metcalf, J. L., Song, S. J., Hale, V. L., Clayton, J., Ackermann, G., Humphrey, G., Niu, K., Cui, D., Zhao, H., Schrenzel, M. D., Tan, C. L., Knight, R. and Braun, J.** (2016). Using the gut microbiota as a novel tool for examining colobine primate GI health. *Global Ecology and Conservation* **7**, 225–237. doi: 10.1016/j.gecco.2016.06.004.
- An, C., Okamoto, Y., Xu, S., Eo, K. Y., Kimura, J. and Yamamoto, N.** (2017). Comparison of fecal microbiota of three captive carnivore species inhabiting Korea. *Journal of*

- Veterinary Medical Science* **79**, 542–546. doi: 10.1292/jvms.16-0472.
- Andlid, T., Juarez, R.-V. and Gustafsson, L.** (1995). Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microbial Ecology* **30**,. doi: 10.1007/BF00171938.
- Angert, E. R., Clements, K. D. and Pace, N. R.** (1993). The largest bacterium. *Nature* **362**, 239–241. doi: 10.1038/362239a0.
- Antwis, R. E., Edwards, K. L., Unwin, B., Walker, S. L. and Shultz, S.** (2019). Rare gut microbiota associated with breeding success, hormone metabolites and ovarian cycle phase in the critically endangered eastern black rhino. *Microbiome* **7**, 27. doi: 10.1186/s40168-019-0639-0.
- Arango, R. A., Schoville, S. D., Currie, C. R. and Carlos-Shanley, C.** (2021). Experimental Warming Reduces Survival, Cold Tolerance, and Gut Prokaryotic Diversity of the Eastern Subterranean Termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Frontiers in Microbiology* **12**,. doi: 10.3389/fmicb.2021.632715.
- Archibald, J. M.** (2015). Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology* **25**, R911–R921. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.055.
- Arechavala-Lopez, P., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J., Fernandez-Jover, D., Martinez-Rubio, L., Lopez-Jimenez, J. A. and Martinez-Lopez, F. J.** (2011). Direct interaction between wild fish aggregations at fish farms and fisheries activity at fishing grounds: a case study with Boops boops. *Aquaculture Research* **42**, 996–1010. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02683.x.
- ABhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R. and Meinicke, P.** (2015). Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data: Fig. 1. *Bioinformatics* **31**, 2882–2884. doi: 10.1093/bioinformatics/btv287.
- Atlas, R. M.** (1984). *Microbiology, Fundamentals and Applications*. MacMillan Publishing Company, New York, NY.
- Attardo, G. M., Lohs, C., Heddi, A., Alam, U. H., Yildirim, S. and Aksoy, S.** (2008). Analysis of milk gland structure and function in *Glossina morsitans*: Milk protein production, symbiont populations and fecundity. *Journal of Insect Physiology* **54**, 1236–1242. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.06.008.
- Audax, M.** (2018). *Biodiversité des microbiomes du tractus intestinal des poissons coralliens : variabilité, structuration et évolution - Rapport de stage de Master I*. Montpellier.
- Auguet, J. C., Barberan, A. and Casamayor, E. O.** (2010). Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal* **4**, 182–190. doi: 10.1038/ismej.2009.109.
- Azad, M. B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Sears, M. R., Becker, A. B., Scott, J. A. and Kozyrskyj, A. L.** (2013). Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **9**, 15. doi: 10.1186/1710-1492-9-15.

-B-

- Bachmann, H.** (1901). *L'année biologique : comptes-rendus annuels des travaux de biologie générale*. ed. Yves Delage Elsevier, Paris.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F. and Gordon, J. I.** (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15718–15723. doi: 10.1073/pnas.0407076101.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. and Gordon, J. I.** (2005). Host-

- Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* **307**, 1915–1920. doi: 10.1126/science.1104816.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen, K., Dahlgren, J. and Wang, J. (2015).** Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe* **17**, 690–703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.
- Bahram, M., Anslan, S., Hildebrand, F., Bork, P. and Tedersoo, L. (2019).** Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify diverse and novel archaeal taxa from the environment. *Environmental Microbiology Reports* **11**, 487–494. doi: 10.1111/1758-2229.12684.
- Bai, S. and Hou, G. (2020).** Microbial communities on fish eggs from *Acanthopagrus schlegelii* and *Halichoeres nigrescens* at the XuWen coral reef in the Gulf of Tonkin. *PeerJ* **8**, e8517. doi: 10.7717/peerj.8517.
- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K. and Ray, A. K. (2002).** Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* **10**, 109–121. doi: 10.1023/A:1021355406412.
- Baker, B. J., De Anda, V., Seitz, K. W., Dombrowski, N., Santoro, A. E. and Lloyd, K. G. (2020).** Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nature Microbiology* **5**, 887–900. doi: 10.1038/s41564-020-0715-z.
- Banerjee, G. and Ray, A. K. (2017).** Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis* **72**, 1–11. doi: 10.1007/s13199-016-0441-8.
- Bar-On, Y. M., Phillips, R. and Milo, R. (2018).** The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 6506–6511. doi: 10.1073/pnas.1711842115.
- Barelli, C., Albanese, D., Donati, C., Pindo, M., Dallago, C., Rovero, F., Cavalieri, D., Michael Tuohy, K., Christine Hauffe, H. and De Filippo, C. (2015).** Habitat fragmentation is associated to gut microbiota diversity of an endangered primate: Implications for conservation. *Scientific Reports* **5**, 1–12. doi: 10.1038/srep14862.
- Barott, K. L. and Rohwer, F. L. (2012).** Unseen players shape benthic competition on coral reefs. *Trends in Microbiology* **20**, 621–628. doi: 10.1016/j.tim.2012.08.004.
- Bates, J. M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K. N., Cheesman, S. E. and Guillemin, K. (2006).** Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology* **297**, 374–386. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.006.
- Bates, J. M., Akerlund, J., Mittge, E. and Guillemin, K. (2007).** Intestinal Alkaline Phosphatase Detoxifies Lipopolysaccharide and Prevents Inflammation in Zebrafish in Response to the Gut Microbiota. *Cell Host & Microbe* **2**, 371–382. doi: 10.1016/j.chom.2007.10.010.
- Becker, M. H., Richards-Zawacki, C. L., Gratwicke, B. and Belden, L. K. (2014).** The effect of captivity on the cutaneous bacterial community of the critically endangered Panamanian golden frog (*Atelopus zeteki*). *Biological Conservation* **176**, 199–206. doi: 10.1016/j.biocon.2014.05.029.
- Becker, C. G., Longo, A. V., Haddad, C. F. B. and Zamudio, K. R. (2017).** Land cover and forest connectivity alter the interactions among host, pathogen and skin microbiome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **284**, 20170582. doi: 10.1098/rspb.2017.0582.
- Beemelmans, A., Poirier, M., Bayer, T., Kuenzel, S. and Roth, O. (2019).** Microbial embryonal colonization during pipefish male pregnancy. *Scientific Reports* **9**, 3. doi: 10.1038/s41598-018-37026-3.

- Bellwood, D. R. and Choat, J. H.** (1990). A functional analysis of grazing in parrotfishes (family Scaridae): the ecological implications. *Environmental Biology of Fishes* **28**, 189–214. doi: 10.1007/BF00751035.
- Bellwood, D. R., Hughes, T. P., Folke, C. and Nyström, M.** (2004). Confronting the coral reef crisis. *Nature* **429**, 827–833. doi: 10.1038/nature02691.
- Bellwood, D. R., Renema, W. and Rosen, B. R.** (2012). Biodiversity hotspots, evolution and coral reef biogeography: a review. In *Biotic Evolution and Environmental Change in Southeast Asia..The Systematics Association Special Volume Series*, 82 . (ed. Gower, D. J., Johnson, K. G., Richardson, J. E., Rosen, B. R., Rüber, L., and Williams, S. T.), pp. 216–245. Cambridge University Press, New York, NY.
- Bellwood, D. R., Goatley, C. H. R., Brandl, S. J. and Bellwood, O.** (2014a). Fifty million years of herbivory on coral reefs: fossils, fish and functional innovations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**, 20133046. doi: 10.1098/rspb.2013.3046.
- Bellwood, D. R., Hoey, A. S., Bellwood, O. and Goatley, C. H. R.** (2014b). Evolution of long-toothed fishes and the changing nature of fish–benthos interactions on coral reefs. *Nature Communications* **5**, 3144. doi: 10.1038/ncomms4144.
- Bellwood, D. R., Goatley, C. H. R. and Bellwood, O.** (2017). The evolution of fishes and corals on reefs: form, function and interdependence. *Biological Reviews* **92**, 878–901. doi: 10.1111/brv.12259.
- Bellwood, D. R., Pratchett, M. S., Morrison, T. H., Gurney, G. G., Hughes, T. P., Álvarez-Romero, J. G., Day, J. C., Grantham, R., Grech, A., Hoey, A. S., Jones, G. P., Pandolfi, J. M., Tebbett, S. B., Techera, E., Weeks, R. and Cumming, G. S.** (2019). Coral reef conservation in the Anthropocene: Confronting spatial mismatches and prioritizing functions. *Biological Conservation* **236**, 604–615. doi: 10.1016/j.biocon.2019.05.056.
- Bennett, G., Malone, M., Sauter, M. L., Cuozzo, F. P., White, B., Nelson, K. E., Stumpf, R. M., Knight, R., Leigh, S. R. and Amato, K. R.** (2016). Host age, social group, and habitat type influence the gut microbiota of wild ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *American Journal of Primatology* **78**, 883–892. doi: 10.1002/ajp.22555.
- Benton, M., Donoghue, P. and Asher, R.** (2009). Calibrating and constraining molecular clocks. In *The timetree of Life* (ed. Hedges, S. B. and Kumar, S.), pp. 35–86. Oxford University Press, Oxford.
- Berg, R.** (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* **4**, 430–435. doi: 10.1016/0966-842X(96)10057-3.
- Bergh, Ø., Børsheim, K. Y., Bratbak, G. and Heldal, M.** (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**, 467–468. doi: 10.1038/340467a0.
- Berlow, M., Phillips, J. N. and Derryberry, E. P.** (2021). Effects of Urbanization and Landscape on Gut Microbiomes in White-Crowned Sparrows. *Microbial Ecology* **81**, 253–266. doi: 10.1007/s00248-020-01569-8.
- Bestion, E., Jacob, S., Zinger, L., Di Gesu, L., Richard, M., White, J. and Cote, J.** (2017). Climate warming reduces gut microbiota diversity in a vertebrate ectotherm. *Nature Ecology & Evolution* **1**, 0161. doi: 10.1038/s41559-017-0161.
- Bevins, C. L. and Salzman, N. H.** (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 356–368. doi: 10.1038/nrmicro2546.
- Biscarini, F., Palazzo, F., Castellani, F., Masetti, G., Grotta, L., Cichelli, A. and Martino, G.** (2018). Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. *PLOS ONE* **13**, e0205670. doi: 10.1371/journal.pone.0205670.
- Bletz, M. C., Archer, H., Harris, R. N., McKenzie, V. J., Rabemananjara, F. C. E.,**

- Rakotoarison, A. and Vences, M.** (2017). Host Ecology Rather Than Host Phylogeny Drives Amphibian Skin Microbial Community Structure in the Biodiversity Hotspot of Madagascar. *Frontiers in Microbiology* **8**, doi: 10.3389/fmicb.2017.01530.
- Bogdanowicz, D. and Giaro, K.** (2013). On a matching distance between rooted phylogenetic trees. *International Journal of Applied Mathematics and Computer Science* **23**, 669–684. doi: 10.2478/amcs-2013-0050.
- Bonaglia, S., Brüchert, V., Callac, N., Vicenzi, A., Chi Fru, E. and Nascimento, F. J. A.** (2017). Methane fluxes from coastal sediments are enhanced by macrofauna. *Scientific Reports* **7**, 13145. doi: 10.1038/s41598-017-13263-w.
- Bonin, A. S. and Boone, D. R.** (2006). The Order Methanobacteriales. In *The Prokaryotes* (ed. Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., and Stackebrandt, E.), pp. 231–243. New York, NY.
- Borrel, G., Parisot, N., Harris, H. M., Peyretailade, E., Gaci, N., Tottey, W., Bardot, O., Raymann, K., Gribaldo, S., Peyret, P., O'Toole, P. W. and Brugère, J.-F.** (2014). Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* **15**, 679. doi: 10.1186/1471-2164-15-679.
- Borrel, G., McCann, A., Deane, J., Neto, M. C., Lynch, D. B., Brugère, J. F. and O'Toole, P. W.** (2017). Genomics and metagenomics of trimethylamine-utilizing Archaea in the human gut microbiome. *ISME Journal* **11**, 2059–2074. doi: 10.1038/ismej.2017.72.
- Borrel, G., Brugère, J. F., Gribaldo, S., Schmitz, R. A. and Moissl-Eichinger, C.** (2020). The host-associated archaeome. *Nature Reviews Microbiology* **18**, 622–636. doi: 10.1038/s41579-020-0407-y.
- Bouillon, S., Koedam, N., Raman, A. and Dehairs, F.** (2002). Primary producers sustaining macro-invertebrate communities in intertidal mangrove forests. *Oecologia* **130**, 441–448. doi: 10.1007/s004420100814.
- Boulanger, Y., Lallier, R. and Cousineau, G.** (1977). Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. *Canadian Journal of Microbiology* **23**, 1161–1164. doi: 10.1139/m77-174.
- Bourne, D. G., Morrow, K. M. and Webster, N. S.** (2016). Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. *Annual Review of Microbiology* **70**, 317–340. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095440.
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C. and Derôme, N.** (2013). Network Analysis Highlights Complex Interactions between Pathogen, Host and Commensal Microbiota. *PLoS ONE* **8**, e84772. doi: 10.1371/journal.pone.0084772.
- Bowman, J. S. and Ducklow, H. W.** (2015). Microbial Communities Can Be Described by Metabolic Structure: A General Framework and Application to a Seasonally Variable, Depth-Stratified Microbial Community from the Coastal West Antarctic Peninsula. *PLOS ONE* **10**, e0135868. doi: 10.1371/journal.pone.0135868.
- Bredon, M., Dittmer, J., Noël, C., Moumen, B. and Bouchon, D.** (2018). Lignocellulose degradation at the holobiont level: teamwork in a keystone soil invertebrate. *Microbiome* **6**, 162. doi: 10.1186/s40168-018-0536-y.
- Breiman, L.** (2001). Random forests. *Machine Learning* **45**, 32.
- Bright, M. and Sorgo, A.** (2005). Ultrastructural reinvestigation of the trophosome in adults of *Riftia pachyptila* (Annelida, Siboglinidae). *Invertebrate Biology* **122**, 347–368. doi: 10.1111/j.1744-7410.2003.tb00099.x.
- Brock, J. A. and Bullis, R.** (2001). Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp. *Aquaculture* **197**, 137–159. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00585-3.
- Brooker, R. M., Munday, P. L., Brandl, S. J. and Jones, G. P.** (2014). Local extinction of a coral reef fish explained by inflexible prey choice. *Coral Reefs* **33**, 891–896. doi:

10.1007/s00338-014-1197-3.

- Brooks, A. W., Kohl, K. D., Brucker, R. M., van Opstal, E. J. and Bordenstein, S. R.** (2016). Phyllosymbiosis: Relationships and Functional Effects of Microbial Communities across Host Evolutionary History. *PLOS Biology* **14**, e2000225. doi: 10.1371/journal.pbio.2000225.
- Brown, B. E.** (1997). Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* **16**, S129–S138. doi: 10.1007/s003380050249.
- Brown, J. H. and Kodric-Brown, A.** (1977). Turnover Rates in Insular Biogeography: Effect of Immigration on Extinction. *Ecology* **58**, 445–449. doi: 10.2307/1935620.
- Brown, L., Cox, W. and Levine, R.** (1997). Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms* **29**, 213–218. doi: 10.3354/dao029213.
- Brown, R. M., Wiens, G. D. and Salinas, I.** (2019). Analysis of the gut and gill microbiome of resistant and susceptible lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* **86**, 497–506. doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.079.
- Brucker, R. M. and Bordenstein, S. R.** (2012). The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities. *Evolution* **66**, 349–362. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01454.x.
- Brucker, R. M. and Bordenstein, S. R.** (2013). The Hologenomic Basis of Speciation: Gut Bacteria Cause Hybrid Lethality in the Genus *Nasonia*. *Science* **341**, 667–669. doi: 10.1126/science.1240659.
- Brugère, J.-F., Borrel, G., Gaci, N., Tottey, W., O'Toole, P. W. and Malpuech-Brugère, C.** (2014). Archaeobiotics. *Gut Microbes* **5**, 5–10. doi: 10.4161/gmic.26749.
- Brune, A. and Friedrich, M.** (2000). Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 263–269. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00087-4.
- Bruno, J. F., Sweatman, H., Precht, W. F., Selig, E. R. and Schutte, V. G. W.** (2009). Assessing evidence of phase shifts from coral to macroalgal dominance on coral reefs. *Ecology* **90**, 1478–1484. doi: 10.1890/08-1781.1.
- Bryant, M. P.** (1979). Microbial methane production: theoretical aspects. *Journal of Animal Science* **48**, 193–201.
- Burkepile, D. E. and Hay, M. E.** (2008). Herbivore species richness and feeding complementarity affect community structure and function on a coral reef. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 16201–16206. doi: 10.1073/pnas.0801946105.
- Burkepile, D. E. and Hay, M. E.** (2011). Feeding complementarity versus redundancy among herbivorous fishes on a Caribbean reef. *Coral Reefs* **30**, 351–362. doi: 10.1007/s00338-011-0726-6.
- Burns, A. R., Stephens, W. Z., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J. F., Guillemin, K. and Bohannan, B. J.** (2016). Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *The ISME Journal* **10**, 655–664. doi: 10.1038/ismej.2015.142.
- Burns, A. R., Miller, E., Agarwal, M., Rolig, A. S., Milligan-Myhre, K., Seredick, S., Guillemin, K. and Bohannan, B. J. M.** (2017). Interhost dispersal alters microbiome assembly and can overwhelm host innate immunity in an experimental zebrafish model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 11181–11186. doi: 10.1073/pnas.1702511114.

- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P. D. and Bäckhed, F. (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metabolism* **22**, 658–668. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.026.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. and Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**,. doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J. and Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal* **11**, 2639–2643. doi: 10.1038/ismej.2017.119.
- Campbell, L. J., Hammond, S. A., Price, S. J., Sharma, M. D., Garner, T. W. J., Birol, I., Helbing, C. C., Wilfert, L. and Griffiths, A. G. F. (2018). A novel approach to wildlife transcriptomics provides evidence of disease-mediated differential expression and changes to the microbiome of amphibian populations. *Molecular Ecology* **27**, 1413–1427. doi: 10.1111/mec.14528.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N. and Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 4516–4522. doi: 10.1073/pnas.1000080107.
- Carda-Diéguez, M., Mira, A. and Fouz, B. (2014). Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiology Ecology* **87**, 451–459. doi: 10.1111/1574-6941.12236.
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G. M., Tilman, D., Wardle, D. A., Kinzig, A. P., Daily, G. C., Loreau, M., Grace, J. B., Larigauderie, A., Srivastava, D. S. and Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* **486**, 59–67. doi: 10.1038/nature11148.
- Cariveau, D. P., Elijah Powell, J., Koch, H., Winfree, R. and Moran, N. A. (2014). Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *The ISME Journal* **8**, 2369–2379. doi: 10.1038/ismej.2014.68.
- Carpenter, K. E., Abrar, M., Aeby, G., Aronson, R. B., Banks, S., Bruckner, A., Chiriboga, A., Cortes, J., Delbeek, J. C., DeVantier, L., Edgar, G. J., Edwards, A. J., Fenner, D., Guzman, H. M., Hoeksema, B. W., Hodgson, G., Johan, O., Licuanan, W. Y., Livingstone, S. R., Lovell, E. R., Moore, J. A., Obura, D. O., Ochavillo, D., Polidoro, B. A., Precht, W. F., Quibilan, M. C., Reboton, C., Richards, Z. T., Rogers, A. D., Sanciangco, J., Sheppard, A., Sheppard, C., Smith, J., Stuart, S., Turak, E., Veron, J. E. N., Wallace, C., Weil, E. and Wood, E. (2008). One-Third of Reef-Building Corals Face Elevated Extinction Risk from Climate Change and Local Impacts. *Science* **321**, 560–563. doi: 10.1126/science.1159196.
- Carthey, A. J. R., Blumstein, D. T., Gallagher, R. V., Tetu, S. G. and Gillings, M. R. (2019). Conserving the holobiont. *Functional Ecology* 764–776. doi: 10.1111/1365-2435.13504.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V. J., Gasol, J. M., Joint, I., Rodriguez-Valera, F. and Pedros-Alio, C. (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* **4**, 338–348. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00297.x.
- Casey, J. M., Meyer, C. P., Morat, F., Brandl, S. J., Planes, S. and Parravicini, V. (2019).

- Reconstructing hyperdiverse food webs: Gut content metabarcoding as a tool to disentangle trophic interactions on coral reefs. *Methods in Ecology and Evolution* **10**, 1157–1170. doi: 10.1111/2041-210X.13206.
- Castro-Sanguino, C. and Sánchez, J. A.** (2012). Dispersal of symbiodinium by the stoplight parrotfish *Sparisoma viride*. *Biology Letters* **8**, 282–286. doi: 10.1098/rsbl.2011.0836.
- Cavicchioli, R.** (2011). Archaea--timeline of the third domain. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 51–61. doi: 10.1038/nrmicro2482.
- CBD secretariat** (2010). *Secretariat of the Convention on Biological Diversity (CBD), Global biodiversity outlook 3*. Montreal.
- Ceccarelli, D. M., Jones, G. P. and McCook, L. J.** (2001). Territorial damselfishes as determinants of the structure of benthic communities on coral reefs. *Oceanography and marine biology: an annual review* **39**, 355–389.
- Chandler, J. A., Morgan Lang, J., Bhatnagar, S., Eisen, J. A. and Kopp, A.** (2011). Bacterial Communities of Diverse Drosophila Species: Ecological Context of a Host–Microbe Model System. *PLoS Genetics* **7**, e1002272. doi: 10.1371/journal.pgen.1002272.
- Chang, C.-W., Huang, B.-H., Lin, S.-M., Huang, C.-L. and Liao, P.-C.** (2016). Changes of diet and dominant intestinal microbes in farmland frogs. *BMC Microbiology* **16**, 33. doi: 10.1186/s12866-016-0660-4.
- Chao, A.** (1984). Non parametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**, 265–270. doi: 10.2307/4615964.
- Chao, A., Lee, S.-M. and Chen, T.-C.** (1988). A generalized Good's nonparametric coverage estimator. *Chinese Journal of Mathematics* **16**,.
- Chen, Y. R., Jing, Q. L., Chen, F. L., Zheng, H., Chen, L. D. and Yang, Z. C.** (2021). Desulfovibrio is not always associated with adverse health effects in the Guangdong Gut Microbiome Project. *PeerJ* **9**, 1–15. doi: 10.7717/peerj.12033.
- Cheutin, M.-C., Villéger, S., Hicks, C., Robinson, J. P. W., Graham, N. A. J., Marconnet, C., Ortiz Restrepo, C. X., Bettarel, Y., Bouvier, T. and Auguet, J.-C.** (2021). Microbial shift in the enteric bacteriome of coral reef fish following climate-driven regime shifts. *Frontiers in Marine Science*.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J. and Wang, X.** (2009). Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances* **27**, 236–255. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.002.
- Chiarello, M., Villéger, S., Bouvier, C., Bettarel, Y. and Bouvier, T.** (2015). High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiology Ecology* **91**, 1–12. doi: 10.1093/femsec/fiv061.
- Chiarello, M., Auguet, J. C., Bettarel, Y., Bouvier, C., Claverie, T., Graham, N. A. J., Rieuvilleneuve, F., Sucré, E., Bouvier, T. and Villéger, S.** (2018). Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet. *Microbiome* **6**, 1–14. doi: 10.1186/s40168-018-0530-4.
- Chiarello, M., Auguet, J.-C., Graham, N. A. J., Claverie, T., Sucré, E., Bouvier, C., Rieuvilleneuve, F., Restrepo-Ortiz, C. X., Bettarel, Y., Villéger, S. and Bouvier, T.** (2020). Exceptional but vulnerable microbial diversity in coral reef animal surface microbiomes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**, 20200642. doi: 10.1098/rspb.2020.0642.
- Cho, I. and Blaser, M. J.** (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* **13**, 260–270. doi: 10.1038/nrg3182.
- Choat, J. H. and Clements, K. D.** (1998). Vertebrate herbivores in marine and terrestrial environments: a nutritional ecology perspective. *Annual Review of Ecology and*

- Systematics* **29**, 375–403. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.375.
- Cholewińska, P., Czyż, K., Nowakowski, P. and Wyrostek, A.** (2020). The microbiome of the digestive system of ruminants – a review. *Animal Health Research Reviews* **21**, 3–14. doi: 10.1017/S1466252319000069.
- Chong-Seng, K. M., Cole, A. J., Pratchett, M. S. and Willis, B. L.** (2011). Selective feeding by coral reef fishes on coral lesions associated with brown band and black band disease. *Coral Reefs* **30**, 473–481. doi: 10.1007/s00338-010-0707-1.
- Chu, H. and Mazmanian, S. K.** (2013). Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nature Immunology* **14**, 668–675. doi: 10.1038/ni.2635.
- Clayton, J. B., Vangay, P., Huang, H., Ward, T., Hillmann, B. M., Al-Ghalith, G. A., Travis, D. A., Long, H. T., Tuan, B. Van, Minh, V. Van, Cabana, F., Nadler, T., Toddes, B., Murphy, T., Glander, K. E., Johnson, T. J. and Knights, D.** (2016). Captivity humanizes the primate microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 10376–10381. doi: 10.1073/pnas.1521835113.
- Clements, K. D.** (1991). Endosymbiotic communities of two herbivorous labroid fishes, *Oodax cyanomelas* and *O. pullus*. *Marine Biology* **109**, 223–229. doi: 10.1007/BF01319390.
- Clements, K. D. and Choat, J. H.** (1995). Fermentation in Tropical Marine Herbivorous Fishes. *Physiological Zoology* **68**, 355–378. doi: 10.1086/physzool.68.3.30163774.
- Clements, K. D. and Choat, J. H.** (1997). Comparison of herbivory in the closely-related marine fish genera *Girella* and *Kyphosus*. *Marine Biology* **127**, 579–586. doi: 10.1007/s002270050048.
- Clements, K. D., Sutton, D. C. and Choat, J. H.** (1989). Occurrence and characteristics of unusual protistan symbionts from surgeonfishes (Acanthuridae) of the Great Barrier Reef, Australia. *Marine Biology* **102**, 403–412. doi: 10.1007/BF00428493.
- Clements, K. D., Pasch, I. B. Y., Moran, D. and Turner, S. J.** (2007). Clostridia dominate 16S rRNA gene libraries prepared from the hindgut of temperate marine herbivorous fishes. *Marine Biology* **150**, 1431–1440. doi: 10.1007/s00227-006-0443-9.
- Clements, K. D., Raubenheimer, D. and Choat, J. H.** (2009). Nutritional ecology of marine herbivorous fishes : ten years on. 79–92. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01524.x.
- Clements, K. D., Angert, E. R., Montgomery, W. L. and Choat, J. H.** (2014). Intestinal microbiota in fishes: What’s known and what’s not. *Molecular Ecology* **23**, 1891–1898. doi: 10.1111/mec.12699.
- Clements, K. D., German, D. P., Piché, J., Tribollet, A. and Choat, J. H.** (2017). Integrating ecological roles and trophic diversification on coral reefs: multiple lines of evidence identify parrotfishes as microphages. *Biological Journal of the Linnean Society* **120**, 729–751. doi: 10.1111/bij.12914.
- Cmelik, S. H. W., Bursell, E. and Slack, E.** (1969). Composition of the gut contents of third-instar tsetse larvae (*Glossina morsitans* Westwood). *Comparative Biochemistry and Physiology* **29**, 447–453.
- Coker, D. J., Wilson, S. K. and Pratchett, M. S.** (2014). Importance of live coral habitat for reef fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **24**, 89–126. doi: 10.1007/s11160-013-9319-5.
- Colston, T. J. and Jackson, C. R.** (2016). Microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life: what is known and unknown. *Molecular ecology* **25**, 3776–3800. doi: 10.1111/mec.13730.
- Conrad, R.** (2009). The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental microbiology reports* **1**, 285–92. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x.
- Costa, S., Lopes, I., Proença, D. N., Ribeiro, R. and Morais, P. V.** (2016). Diversity of

- cutaneous microbiome of *Pelophylax perezii* populations inhabiting different environments. *Science of The Total Environment* **572**, 995–1004. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.230.
- Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B. J. M. and Relman, D. A.** (2012). The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. *Science* **336**, 1255–1262. doi: 10.1126/science.1224203.
- Côté, I. ., Gill, J. ., Gardner, T. . and Watkinson, A. .** (2005). Measuring coral reef decline through meta-analyses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 385–395. doi: 10.1098/rstb.2004.1591.
- Cowan, Z.-L., Ling, S. D., Caballes, C. F., Dworjanyn, S. A. and Pratchett, M. S.** (2020). Crown-of-thorns starfish larvae are vulnerable to predation even in the presence of alternative prey. *Coral Reefs* **39**, 293–303. doi: 10.1007/s00338-019-01890-w.
- Cowman, P. F. and Bellwood, D. R.** (2013). The historical biogeography of coral reef fishes: Global patterns of origination and dispersal. *Journal of Biogeography* **40**, 209–224. doi: 10.1111/jbi.12003.
- Currie, C. R.** (2006). Coevolved Crypts and Exocrine Glands Support Mutualistic Bacteria in Fungus-Growing Ants. *Science* **311**, 81–83. doi: 10.1126/science.1119744.

-D-

- Dawkins, R.** (1984). *The Extended Phenotype: The gene as a Unit of Selection*, Oxford Uni. Oxford University Press, Oxford.
- de Bruijn, I., Liu, Y., Wiegertjes, G. F. and Raaijmakers, J. M.** (2018). Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiology Ecology* **94**, 1–12. doi: 10.1093/femsec/fix161.
- de Macario, E. C. and Macario, A. J. L.** (2009). Methanogenic archaea in health and disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology* **299**, 99–108.
- Dehler, C. E., Secombes, C. J. and Martin, S. A. M.** (2017). Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports* **7**,. doi: 10.1038/s41598-017-13249-8.
- DeLong, E. F.** (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 5685–5689. doi: 10.1073/pnas.89.12.5685.
- Delsuc, F., Metcalf, J. L., Wegener Parfrey, L., Song, S. J., González, A. and Knight, R.** (2014). Convergence of gut microbiomes in myrmecophagous mammals. *Molecular Ecology* **23**, 1301–1317. doi: 10.1111/mec.12501.
- Deplancke, B., Hristova, K. R., Oakley, H. A., McCracken, V. J., Aminov, R., Mackie, R. I. and Gaskins, H. R.** (2000). Molecular Ecological Analysis of the Succession and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in the Mouse Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2166–2174. doi: 10.1128/AEM.66.5.2166-2174.2000.
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M. and Relman, D. A.** (2007). An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature* **449**, 811–818. doi: 10.1038/nature06245.
- Deutscher, J., Aké, F. M. D., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E. and Joyet, P.** (2014). The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **78**, 231–256. doi: 10.1128/MMBR.00001-14.

- Dhanasiri, A. K. S., Brunvold, L., Brinchmann, M. F., Korsnes, K., Bergh, Ø. and Kiron, V.** (2011). Changes in the Intestinal Microbiota of Wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. Upon Captive Rearing. *Microbial Ecology* **61**, 20–30. doi: 10.1007/s00248-010-9673-y.
- Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Rodríguez, J. M., Xaus, J. and Olivares, M.** (2007). Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *Journal of Applied Microbiology* **102**,. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03102.x.
- Dierckens, K., Rekecki, A., Laureau, S., Sorgeloos, P., Boon, N., Van den Broeck, W. and Bossier, P.** (2009). Development of a bacterial challenge test for gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Environmental Microbiology* **11**, 526–533. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01794.x.
- Ding, J., Zhu, D., Hong, B., Wang, H. T., Li, G., Ma, Y. B., Tang, Y. T. and Chen, Q. L.** (2019). Long-term application of organic fertilization causes the accumulation of antibiotic resistance in earthworm gut microbiota. *Environment International* **124**, 145–152. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.017.
- Dinsdale, E. A., Pantos, O., Smriga, S., Edwards, R. A., Angly, F., Wegley, L., Hatay, M., Hall, D., Brown, E., Haynes, M., Krause, L., Sala, E., Sandin, S. A., Thurber, R. V., Willis, B. L., Azam, F., Knowlton, N. and Rohwer, F.** (2008). Microbial Ecology of Four Coral Atolls in the Northern Line Islands. *PLoS ONE* **3**, e1584. doi: 10.1371/journal.pone.0001584.
- Doane, M. P., Morris, M. M., Papudeshi, B., Allen, L., Pande, D., Haggerty, J. M., Johri, S., Turnlund, A. C., Peterson, M., Kacev, D., Nosal, A., Ramirez, D., Hovel, K., Ledbetter, J., Alker, A., Avalos, J., Baker, K., Bhide, S., Billings, E., Byrum, S., Clemens, M., Demery, A. J., Lima, L. F. O., Gomez, O., Gutierrez, O., Hinton, S., Kieu, D., Kim, A., Loaiza, R., Martinez, A., McGhee, J., Nguyen, K., Parlan, S., Pham, A., Price-Waldman, R., Edwards, R. A. and Dinsdale, E. A.** (2020). The skin microbiome of elasmobranchs follows phyllosymbiosis, but in teleost fishes, the microbiomes converge. *Microbiome* **8**, 1–15. doi: 10.1186/s40168-020-00840-x.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. and Knight, R.** (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 11971–11975. doi: 10.1073/pnas.1002601107.
- Donaldson, G. P., Lee, S. M. and Mazmanian, S. K.** (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 20.
- Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R. G. and Edrington, T. S.** (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* **8**, 125. doi: 10.1186/1471-2180-8-125.
- Dray, S., Péliissier, R., Couteron, P., Fortin, M.-J., Legendre, P., Peres-Neto, P. R., Bellier, E., Bivand, R., Blanchet, F. G., De Cáceres, M., Dufour, A.-B., Heegaard, E., Jombart, T., Munoz, F., Oksanen, J., Thioulouse, J. and Wagner, H. H.** (2012). Community ecology in the age of multivariate multiscale spatial analysis. *Ecological Monographs* **82**, 257–275. doi: 10.1890/11-1183.1.
- Dubilier, N., Bergin, C. and Lott, C.** (2008). Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 725–740. doi: 10.1038/nrmicro1992.
- Dubos, R. J.** (1959). *Mirage of health: utopias, progress, and biological change*. Rutgers University Press, New Brunswick.
- Dunning Hotopp, J. C.** (2011). Horizontal gene transfer between bacteria and animals. *Trends in Genetics* **27**, 157–163. doi: 10.1016/j.tig.2011.01.005.

Duperron, S. (2017). *Microbial Symbioses*. Elsevier Ltd.

Duperron, S., Gaudron, S. M., Rodrigues, C. F., Cunha, M. R., Decker, C. and Olu, K. (2013). An overview of chemosynthetic symbioses in bivalves from the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **10**, 3241–3267. doi: 10.5194/bg-10-3241-2013.

-E-

Easson, C. G. and Thacker, R. W. (2014). Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Frontiers in Microbiology* **5**, 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2014.00532.

Eckburg, P. B. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* **308**, 1635–1638. doi: 10.1126/science.1110591.

Edinger, E. N., Jompa, J., Limmon, G. V., Widjatmoko, W. and Risk, M. J. (1998). Reef degradation and coral biodiversity in indonesia: Effects of land-based pollution, destructive fishing practices and changes over time. *Marine Pollution Bulletin* **36**, 617–630. doi: 10.1016/S0025-326X(98)00047-2.

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C. and Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology* **9**, 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2018.00873.

Elfil, M., Kamel, S., Kandil, M., Koo, B. B. and Schaefer, S. M. (2020). Implications of the Gut Microbiome in Parkinson's Disease. *Movement Disorders* **35**, 921–933. doi: 10.1002/mds.28004.

Erlandson, S., Wei, X., Savage, J., Cavender-Bares, J. and Peay, K. (2018). Soil abiotic variables are more important than Salicaceae phylogeny or habitat specialization in determining soil microbial community structure. *Molecular Ecology* **27**, 2007–2024. doi: 10.1111/mec.14576.

Erwin, P. M., Rhodes, R. G., Kiser, K. B., Keenan-Bateman, T. F., McLellan, W. A. and Pabst, D. A. (2017). High diversity and unique composition of gut microbiomes in pygmy (Kogia breviceps) and dwarf (K. sima) sperm whales. *Scientific Reports* **7**, 7205. doi: 10.1038/s41598-017-07425-z.

Escalas, A., Auguet, J. C., Avouac, A., Seguin, R., Gradel, A., Borrossi, L. and Villéger, S. (2021). Ecological Specialization Within a Carnivorous Fish Family Is Supported by a Herbivorous Microbiome Shaped by a Combination of Gut Traits and Specific Diet. *Frontiers in Marine Science* **8**,. doi: 10.3389/fmars.2021.622883.

Ezzat, L., Lamy, T., Maher, R. L., Munsterman, K. S., Landfield, K., Schmeltzer, E. R., Gaulke, C. A., Burkepille, D. E. and Thurber, R. V. (2019). Surgeonfish feces increase microbial opportunism in reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series* **631**, 81–97. doi: 10.3354/meps13119.

Ezzat, L., Lamy, T., Maher, R. L., Munsterman, K. S., Landfield, K. M., Schmeltzer, E. R., Clements, C. S., Vega Thurber, R. L. and Burkepille, D. E. (2020). Parrotfish predation drives distinct microbial communities in reef-building corals. *Animal Microbiome* **2**, 1–15. doi: 10.1186/s42523-020-0024-0.

-F-

Failler, P., Pètre, É. and Maréchal, J.-P. (2010). Valeur économique totale des récifs coralliens, mangroves et herbiers de la Martinique. *Études caribéennes*. doi: 10.4000/etudescaribeennes.4410.

- Fall, T., Lundholm, C., Örtqvist, A. K., Fall, K., Fang, F., Hedhammar, Å., Kämpe, O., Ingelsson, E. and Almqvist, C. (2015). Early Exposure to Dogs and Farm Animals and the Risk of Childhood Asthma. *JAMA Pediatrics* **169**, e153219. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.3219.
- FAO (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAOSTAT Statistical Database*.
- FAO (2020). Food and Agricultural Organization of the United States. *FAOSTAT Statistical Database*.
- Faure, G., Guillaume, M., Payri, C., Thomassin, B., Vanpraet, M. and Vasseur, P. (1984). Massive bleaching and death of corals in the Mayotte Reef ecosystem (SW Indian-Ocean). *Comptes rendus de l'académie des sciences Série III-Sciences de la vie - Life sciences* **299**, 637–642.
- Faust, K. and Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 538–550. doi: 10.1038/nrmicro2832.
- Feely, R. A. (2004). Impact of Anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ System in the Oceans. *Science* **305**, 362–366. doi: 10.1126/science.1097329.
- Feldhaar, H. (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology* **36**, 533–543. doi: 10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x.
- Feng, W., Zhang, J., Jakovlić, I., Xiong, F., Wu, S., Zou, H., Li, W., Li, M. and Wang, G. (2019). Gut segments outweigh the diet in shaping the intestinal microbiota composition in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *AMB Express* **9**, 44. doi: 10.1186/s13568-019-0770-0.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. and Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* **69**, 1–10. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.001.
- Ferrari, J. and Vavre, F. (2011). Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366**, 1389–1400. doi: 10.1098/rstb.2010.0226.
- Ferree, P. M., Frydman, H. M., Li, J. M., Cao, J., Wieschaus, E. and Sullivan, W. (2005). Wolbachia Utilizes Host Microtubules and Dynein for Anterior Localization in the *Drosophila* Oocyte. *PLoS Pathogens* **1**, e14. doi: 10.1371/journal.ppat.0010014.
- Fidopiastis, P. M., Bezdek, D. J., Horn, M. H. and Kandel, J. S. (2006). Characterizing the resident, fermentative microbial consortium in the hindgut of the temperate-zone herbivorous fish, *Hermosilla azurea* (Teleostei: Kyphosidae). *Marine Biology* **148**, 631–642. doi: 10.1007/s00227-005-0106-2.
- Filipa-Silva, A., Parreira, R., Nunes, M. and Crespo, M. T. B. (2021). Virological screening of wild and farmed fish species: Application of innovative Taqman multiplex real-time PCR protocols. *Aquaculture* **540**, 736693. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736693.
- Fillol, M., Auguet, J. C., Casamayor, E. O. and Borrego, C. M. (2016). Insights in the ecology and evolutionary history of the Miscellaneous Crenarchaeotic Group lineage. *ISME Journal* **10**, 665–677. doi: 10.1038/ismej.2015.143.
- Fischbach, M. A. and Sonnenburg, J. L. (2011). Eating For Two: How Metabolism Establishes Interspecies Interactions in the Gut. *Cell Host & Microbe* **10**, 336–347. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.002.
- Fishelson, L., Montgomery, W. L. and Myrberg, A. (1985). A Unique Symbiosis in the Gut of Tropical Herbivorous Surgeonfish (Acanthuridae: Teleostei) from the Red Sea. *Science* **229**, 49–51. doi: 10.1126/science.229.4708.49.
- Flint, J. F., Drzymalski, D., Montgomery, W. L., Southam, G. and Angert, E. R. (2005). Nocturnal Production of Endospores in Natural Populations of Epulopiscium -Like Surgeonfish Symbionts. *Journal of Bacteriology* **187**, 7460–7470. doi:

10.1128/JB.187.21.7460-7470.2005.

- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P. and Duncan, S. H.** (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **9**, 577–589. doi: 10.1038/nrgastro.2012.156.
- Floeter, S. R., Behrens, M. D., Ferreira, C. E. L., Paddock, M. J. and Horn, M. H.** (2005). Geographical gradients of marine herbivorous fishes: patterns and processes. *Marine Biology* **147**, 1435–1447. doi: 10.1007/s00227-005-0027-0.
- Fontaine, S. S., Novarro, A. J. and Kohl, K. D.** (2018). Environmental temperature alters the digestive performance and gut microbiota of a terrestrial amphibian. *Journal of Experimental Biology*. doi: 10.1242/jeb.187559.
- Foster, K. R. and Wenseleers, T.** (2006). A general model for the evolution of mutualisms. *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 1283–1293. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.01073.x.
- Foti, M., Sorokin, D. Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., Kuenen, J. G. and Muyzer, G.** (2007). Diversity, Activity, and Abundance of Sulfate-Reducing Bacteria in Saline and Hypersaline Soda Lakes. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 2093–2100. doi: 10.1128/AEM.02622-06.
- Frago, E., Dicke, M. and Godfray, H. C. J.** (2012). Insect symbionts as hidden players in insect–plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **27**, 705–711. doi: 10.1016/j.tree.2012.08.013.
- Frago, E., Mala, M., Weldegergis, B. T., Yang, C., McLean, A., Godfray, H. C. J., Gols, R. and Dicke, M.** (2017). Symbionts protect aphids from parasitic wasps by attenuating herbivore-induced plant volatiles. *Nature Communications* **8**, 1860. doi: 10.1038/s41467-017-01935-0.
- François, A., Grebert, D., Rhimi, M., Mariadassou, M., Naudon, L., Rabot, S. and Meunier, N.** (2016). Olfactory epithelium changes in germfree mice. *Scientific Reports* **6**, 24687. doi: 10.1038/srep24687.
- French, B. J., Lim, Y. W., Zgliczynski, B. J., Edwards, R. A., Rohwer, F. and Sandin, S. A.** (2020). Decoding diversity in a coral reef fish species complex with restricted range using metagenomic sequencing of gut contents. *Ecology and Evolution* **10**, 3413–3423. doi: 10.1002/ece3.6138.
- Friedheim, S.** (2016). Comparison of Species Identification Methods: DNA Barcoding versus Morphological Taxonomy. *Horizons* **1**, 13.
- Friedrich, M. W., Schmitt-Wagner, D., Lueders, T. and Brune, A.** (2001). Axial Differences in Community Structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the Highly Compartmentalized Gut of the Soil-Feeding Termite *Cubitermes orthognathus*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4880–4890. doi: 10.1128/AEM.67.10.4880-4890.2001.
- Froese, R. and Pauly, D.** (2021). FishBase.
- Funkhouser, L. J. and Bordenstein, S. R.** (2013). Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLoS Biology* **11**, e1001631. doi: 10.1371/journal.pbio.1001631.

-G-

- Gaci, N., Borrel, G., Tottey, W., O'Toole, P. W. and Brugère, J. F.** (2014). Archaea and the human gut: New beginning of an old story. *World Journal of Gastroenterology* **20**, 16062–16078. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16062.
- Gadoin, E., Desnues, C., Monteil-Bouchard, S., Bouvier, T., Auguet, J. C., Roque D'Orbcastel, E. and Bettarel, Y.** (2021). Fishing for the virome of tropical tuna. *Viruses*

- 13, 1–8. doi: 10.3390/v13071291.
- Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T. M., Krogdahl, Å., Bakke, A. M., Merrifield, D. L. and Sørum, H.** (2016). A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Scientific Reports* **6**, 30893. doi: 10.1038/srep30893.
- Galand, P. E., Pereira, O., Hochart, C., Auguet, J. C. and Debroas, D.** (2018). A strong link between marine microbial community composition and function challenges the idea of functional redundancy. *The ISME Journal* **12**, 2470–2478. doi: 10.1038/s41396-018-0158-1.
- Gallet, A., Koubbi, P., Léger, N., Scheifler, M., Ruiz-Rodriguez, M., Suzuki, M. T., Desdevises, Y. and Duperron, S.** (2019). Low-diversity bacterial microbiota in Southern Ocean representatives of lanternfish genera *Electrona*, *Protomyctophum* and *Gymnoscopelus* (family *Myctophidae*). *PLoS ONE* **14**, 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0226159.
- Gantner, S., Andersson, A. F., Alonso-Sáez, L. and Bertilsson, S.** (2011). Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* **84**, 12–18. doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.001.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J. and Van Immerseel, F.** (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews* **33**, 718–738. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x.
- Ganz, H. H., Doroud, L., Firl, A. J., Hird, S. M., Eisen, J. A. and Boyce, W. M.** (2017). Community-Level Differences in the Microbiome of Healthy Wild Mallards and Those Infected by Influenza A Viruses. *mSystems* **2**,. doi: 10.1128/mSystems.00188-16.
- Gao, Y.-M., Zou, K.-S., Zhou, L., Huang, X.-D., Li, Y.-Y., Gao, X.-Y., Chen, X. and Zhang, X.-Y.** (2020). Deep Insights into Gut Microbiota in Four Carnivorous Coral Reef Fishes from the South China Sea. *Microorganisms* **8**, 426. doi: 10.3390/microorganisms8030426.
- Gatesoupe, F. J.** (2007). Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* **267**, 20–30. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.005.
- Gaulke, C. A., Arnold, H. K., Humphreys, I. R., Kembel, S. W., O'dwyer, J. P. and Sharpton, T. J.** (2018). Ecophylogenetics clarifies the evolutionary association between mammals and their gut microbiota. *mBio* **9**, 1–14. doi: 10.1128/mBio.01348-18.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. and Vanbroekhoven, K.** (2006). DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **66**, 194–205. doi: 10.1016/j.mimet.2005.11.002.
- Geoghegan, J., Pirotta, V., Harvey, E., Smith, A., Buchmann, J., Ostrowski, M., Eden, J.-S., Harcourt, R. and Holmes, E.** (2018). Virological Sampling of Inaccessible Wildlife with Drones. *Viruses* **10**, 300. doi: 10.3390/v10060300.
- Geoghegan, J. L., Di Giallonardo, F., Wille, M., Ortiz-Baez, A. S., Costa, V. A., Ghaly, T., Mifsud, J. C. O., Turnbull, O. M. H., Bellwood, D. R., Williamson, J. E. and Holmes, E. C.** (2021). Virome composition in marine fish revealed by meta-transcriptomics. *Virus Evolution* **7**,. doi: 10.1093/ve/veab005.
- German, D. P., Sung, A., Jhaveri, P. and Agnihotri, R.** (2015). More than one way to be an herbivore: convergent evolution of herbivory using different digestive strategies in prickleback fishes (*Stichaeidae*). *Zoology* **118**, 161–170. doi: 10.1016/j.zool.2014.12.002.
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J. and Verdegem, M.** (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports* **5**, 18206. doi: 10.1038/srep18206.

- Gibbons, N. E.** (1933). The slime and intestinal flora of some marine fishes. *Contributions to Canadian Biology and Fisheries* **8**, 275–290. doi: 10.1139/f33-022.
- Gibson, G. R., Macfarlane, G. T. and Cummings, J. H.** (1988). Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *Journal of Applied Bacteriology* **65**, 103–111. doi: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb01498.x.
- Gijzen, H. J., Broers, C. A., Barughare, M. and Stumm, C. K.** (1991). Methanogenic bacteria as endosymbionts of the ciliate *Nyctotherus ovalis* in the cockroach hindgut. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1630–1634. doi: 10.1128/aem.57.6.1630-1634.1991.
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K. and Knight, R.** (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology* **12**, 69. doi: 10.1186/s12915-014-0069-1.
- Gilmour, A., McCallum, M. F. and Allan, M. C.** (1976). A study of the bacterial types occurring on the skin and in the intestines of farmed plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Aquaculture* **7**, 161–172. doi: 10.1016/0044-8486(76)90005-3.
- Gittleman, J. L. and Kot, M.** (1990). Adaptation: Statistics and a Null Model for Estimating Phylogenetic Effects. *Systematic Zoology* **39**, 227. doi: 10.2307/2992183.
- Givens, C. E., Ransom, B., Bano, N. and Hollibaugh, J. T.** (2015). Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series* **518**, 209–223. doi: 10.3354/meps11034.
- Glaeser, S. P., Silva, L. M. R., Prieto, R., Silva, M. A., Franco, A., Kämpfer, P., Hermosilla, C., Taubert, A. and Eisenberg, T.** (2021). A Preliminary Comparison on Faecal Microbiomes of Free-Ranging Large Baleen (*Balaenoptera musculus*, *B. physalus*, *B. borealis*) and Toothed (*Physeter macrocephalus*) Whales. *Microbial Ecology*. doi: 10.1007/s00248-021-01729-4.
- Glassman, S. I. and Martiny, J. B. H.** (2018). BROADSCALE Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact Sequence Variants versus Operational Taxonomic Units. *mSphere* **3**, e00148-18. doi: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00148-18>.
- Graham, N. A. J., Wilson, S. K., Jennings, S., Polunin, N. V. C., Bijoux, J. P. and Robinson, J.** (2006). Dynamic fragility of oceanic coral reef ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 8425–8429. doi: 10.1073/pnas.0600693103.
- Graham, N. A. J., Jennings, S., MacNeil, M. A., Mouillot, D. and Wilson, S. K.** (2015). Predicting climate-driven regime shifts versus rebound potential in coral reefs. *Nature* **518**, 94–97. doi: 10.1038/nature14140.
- Green, A. L., Maypa, A. P., Almany, G. R., Rhodes, K. L., Weeks, R., Abesamis, R. A., Gleason, M. G., Mumby, P. J. and White, A. T.** (2015). Larval dispersal and movement patterns of coral reef fishes, and implications for marine reserve network design. *Biological Reviews* **90**, 1215–1247. doi: 10.1111/brv.12155.
- Greene, L. K., McKenney, E. A., O’Connell, T. M. and Drea, C. M.** (2018). The critical role of dietary foliage in maintaining the gut microbiome and metabolome of folivorous sifakas. *Scientific Reports* **8**, 14482. doi: 10.1038/s41598-018-32759-7.
- Grice, E. A. and Segre, J. A.** (2012). The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **13**, 151–170. doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Murray, P. R., Green, E. D., Turner, M. L. and Segre, J. A.** (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* **324**, 1190–1192. doi: 10.1126/science.1171700.
- Grieneisen, L. E., Charpentier, M. J. E., Alberts, S. C., Blekhman, R., Bradburd, G., Tung, J. and Archie, E. A.** (2019). Genes, geology and germs: gut microbiota across a

- primate hybrid zone are explained by site soil properties, not host species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**, 20190431. doi: 10.1098/rspb.2019.0431.
- Grim, J. N.** (2006). Food Vacuole Contents in the Ciliate, *Balantidium jocularum* (Balantidiidae), a Symbiont in the Intestine of the Surgeonfish, *Naso tonganus* (Acanthuridae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **53**, 269–274. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00101.x.
- Grim, J. N. and Clements, K. D.** (1996). Description of a new species of opalinid by light microscopy, SEM and TEM: *Protoopalina polykineta*, n. sp. from the intestines of the surgeonfish, *Acanthurus nigrofusus*. *European Journal of Protistology* **32**, 81–89. doi: 10.1016/S0932-4739(96)80042-3.
- Grim, J. N., Nemeth, D. and Montgomery, W. L.** (2013). The occurrence of Epulopiscium-like Eubacteria in the intestines of surgeonfish from the US Virgin Islands, western Atlantic Ocean. *Marine Biodiversity Records* **6**, e79. doi: 10.1017/S1755267213000559.
- Grönlund, M.-M., Gueimonde, M., Laitinen, K., Kociubinski, G., Grönroos, T., Salminen, S. and Isolauri, E.** (2007). Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy* **37**, 1764–1772. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02849.x.
- Großkopf, R., Stubner, S. and Liesack, W.** (1998). Novel Euryarchaeotal Lineages Detected on Rice Roots and in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4983–4989. doi: 10.1128/AEM.64.12.4983-4989.1998.
- Grottoli, A. G., Dalcin Martins, P., Wilkins, M. J., Johnston, M. D., Warner, M. E., Cai, W.-J., Melman, T. F., Hoadley, K. D., Pettay, D. T., Levas, S. and Schoepf, V.** (2018). Coral physiology and microbiome dynamics under combined warming and ocean acidification. *PLOS ONE* **13**, e0191156. doi: 10.1371/journal.pone.0191156.
- Groussin, M., Mazel, F., Sanders, J. G., Smillie, C. S., Lavergne, S., Thuiller, W. and Alm, E. J.** (2017). Unraveling the processes shaping mammalian gut microbiomes over evolutionary time. *Nature Communications* **8**,. doi: 10.1038/ncomms14319.
- Groussin, M., Mazel, F. and Alm, E. J.** (2020). Co-evolution and Co-speciation of Host-Gut Bacteria Systems. *Cell Host and Microbe* **28**, 12–22. doi: 10.1016/j.chom.2020.06.013.
- Grupstra, C. G. B., Rabbitt, K. M., Howe-Kerr, L. I. and Correa, A. M. S.** (2021). Fish predation on corals promotes the dispersal of coral symbionts. *Animal Microbiome* **3**, 25. doi: 10.1186/s42523-021-00086-4.
- Gudka, M., Obura, D., Mbugua, J., Ahamada, S., Kloiber, U. and Holter, T.** (2020). Participatory reporting of the 2016 bleaching event in the Western Indian Ocean. *Coral Reefs* **39**,. doi: 10.1007/s00338-019-01851-3.
- Guinotte, J. M., Buddemeier, R. W. and Kleypas, J. A.** (2003). Future coral reef habitat marginality: temporal and spatial effects of climate change in the Pacific basin. *Coral Reefs* **22**, 551–558. doi: 10.1007/s00338-003-0331-4.
- Guo, Z., Zhang, J., Wang, Z., Ang, K. Y., Huang, S., Hou, Q., Su, X., Qiao, J., Zheng, Y., Wang, L., Koh, E., Danliang, H., Xu, J., Lee, Y. K. and Zhang, H.** (2016). Intestinal Microbiota Distinguish Gout Patients from Healthy Humans. *Scientific Reports* **6**, 20602. doi: 10.1038/srep20602.
- Guo, W., Chen, Y., Wang, C., Ning, R., Zeng, B., Tang, J., Li, C., Zhang, M., Li, Y., Ni, Q., Ni, X., Zhang, H., Li, D., Zhao, J. and Li, Y.** (2020). The carnivorous digestive system and bamboo diet of giant pandas may shape their low gut bacterial diversity. *Conservation Physiology* **8**, 1–12. doi: 10.1093/conphys/coz104.

-H-

- Haas, A. and Wild, C.** (2010). Composition analysis of organic matter released by cosmopolitan coral reef-associated green algae. *Aquatic Biology* **10**, 131–138. doi: 10.3354/ab00271.
- Haas, A., Jantzen, C., Naumann, M., Iglesias-Prieto, R. and Wild, C.** (2010). Organic matter release by the dominant primary producers in a Caribbean reef lagoon: implication for in situ O₂ availability. *Marine Ecology Progress Series* **409**, 27–39. doi: 10.3354/meps08631.
- Haas, A. F., Nelson, C. E., Wegley Kelly, L., Carlson, C. A., Rohwer, F., Leichter, J. J., Wyatt, A. and Smith, J. E.** (2011). Effects of Coral Reef Benthic Primary Producers on Dissolved Organic Carbon and Microbial Activity. *PLoS ONE* **6**, e27973. doi: 10.1371/journal.pone.0027973.
- Haas, A. F., Nelson, C. E., Rohwer, F., Wegley-Kelly, L., Quistad, S. D., Carlson, C. A., Leichter, J. J., Hatay, M. and Smith, J. E.** (2013). Influence of coral and algal exudates on microbially mediated reef metabolism. *PeerJ* **1**, e108. doi: 10.7717/peerj.108.
- Haas, A. F., Fairoz, M. F. M., Kelly, L. W., Nelson, C. E., Dinsdale, E. A., Edwards, R. A., Giles, S., Hatay, M., Hisakawa, N., Knowles, B., Lim, Y. W., Maughan, H., Pantos, O., Roach, T. N. F., Sanchez, S. E., Silveira, C. B., Sandin, S., Smith, J. E. and Rohwer, F.** (2016). Global microbialization of coral reefs. *Nature Microbiology* **1**, 1–7. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.42.
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C., Fox, H. E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H. S., Madin, E. M. P., Perry, M. T., Selig, E. R., Spalding, M., Steneck, R. and Watson, R.** (2008). A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science* **319**, 948–952. doi: 10.1126/science.1149345.
- Hamburger, M.** (1947). Transfer of beta hemolytic streptococci by shaking hands. *The American Journal of Medicine* **2**, 23–25. doi: 10.1016/0002-9343(47)90003-X.
- Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P. and Fierer, N.** (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 9641–9646. doi: 10.1073/pnas.1707186114.
- Handelsman, J.** (2007). Metagenomics and Microbial Communities. In *Encyclopedia of Life Sciences*, p. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK doi: 10.1002/9780470015902.a0020367.
- Hassenrück, C., Reinwald, H., Kunzmann, A., Tiedemann, I. and Gärdes, A.** (2020). Effects of Thermal Stress on the Gut Microbiome of Juvenile Milkfish (*Chanos chanos*). *Microorganisms* **9**, 5. doi: 10.3390/microorganisms9010005.
- Hatcher, M. J., Dick, J. T. and Dunn, A. M.** (2012). Diverse effects of parasites in ecosystems: linking interdependent processes. *Frontiers in Ecology and the Environment* **10**, 186–194. doi: 10.1890/110016.
- Hay, M.** (1988). Marine Plant-Herbivore Interactions: The Ecology Of Chemical Defense. *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**, 111–145. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.19.1.111.
- Hehemann, J. H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek, M. and Michel, G.** (2010). Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464**, 908–912. doi: 10.1038/nature08937.
- Hendrikson, R. G. and Zenoble, R. D.** (1983). Vibriosis in Fish: A review. *Iowa State University Veterinarian* **45**, 25–28.
- Hendrix, R. W.** (2002). Bacteriophages: Evolution of the Majority. *Theoretical Population*

- Biology* **61**, 471–480. doi: 10.1006/tpbi.2002.1590.
- Hennersdorf, P., Kleinertz, S., Theisen, S., Abdul-Aziz, M. A., Mrotzek, G., Palm, H. W. and Saluz, H. P.** (2016). Microbial diversity and parasitic load in tropical fish of different environmental conditions. *PLoS ONE* **11**, 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0151594.
- Henriques, S. F., Dhakan, D. B., Serra, L., Francisco, A. P., Carvalho-Santos, Z., Baltazar, C., Elias, A. P., Anjos, M., Zhang, T., Maddocks, O. D. K. and Ribeiro, C.** (2020). Metabolic cross-feeding in imbalanced diets allows gut microbes to improve reproduction and alter host behaviour. *Nature Communications* **11**, 4236. doi: 10.1038/s41467-020-18049-9.
- Henry, L. M., Peccoud, J., Simon, J.-C., Hadfield, J. D., Maiden, M. J. C., Ferrari, J. and Godfray, H. C. J.** (2013). Horizontally Transmitted Symbionts and Host Colonization of Ecological Niches. *Current Biology* **23**, 1713–1717. doi: 10.1016/j.cub.2013.07.029.
- Hess, S., Wenger, A. S., Ainsworth, T. D. and Rummer, J. L.** (2015). Exposure of clownfish larvae to suspended sediment levels found on the Great Barrier Reef: Impacts on gill structure and microbiome. *Scientific Reports* **5**, 10561. doi: 10.1038/srep10561.
- Hird, S. M., Sánchez, C., Carstens, B. C. and Brumfield, R. T.** (2015). Comparative gut microbiota of 59 neotropical bird species. *Frontiers in Microbiology* **6**,. doi: 10.3389/fmicb.2015.01403.
- Hirose, E., Neilan, B., Schmidt, E. W. and Murakami, A.** (2009). Enigmatic life and evolution of Prochloron and related cyanobacteria inhabiting colonial ascidians. In *Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications* (ed. Gault, P. and Marler, H.), pp. 161–189. New York, NY.
- Hiss, P. H. and Zinsser, H.** (1910). *A text-book of Bacteriology: a practical treatise for students and practitioners of medicine*. D. Appleton & Co., New York, & Londres.
- Hixon, M. A.** (1991). Predation as a Process Structuring Coral Reef Fish Communities. In *The Ecology of Fishes on Coral Reefs*, pp. 475–508. Elsevier doi: 10.1016/B978-0-08-092551-6.50022-2.
- Hofer, U.** (2018). The majority is uncultured. *Nature Reviews Microbiology* **16**, 716–717. doi: 10.1038/s41579-018-0097-x.
- Holt, R. D.** (1985). Population dynamics in two-patch environments: Some anomalous consequences of an optimal habitat distribution. *Theoretical Population Biology* **28**, 181–208. doi: 10.1016/0040-5809(85)90027-9.
- Hong, P. Y., Wheeler, E., Cann, I. K. O. and Mackie, R. I.** (2011). Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galápagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing. *ISME Journal* **5**, 1461–1470. doi: 10.1038/ismej.2011.33.
- Hotopp, J. C. D., Clark, M. E., Oliveira, D. C. S. G., Foster, J. M., Fischer, P., Torres, M. C. M., Giebel, J. D., Kumar, N., Ishmael, N., Wang, S., Ingram, J., Nene, R. V., Shepard, J., Tomkins, J., Richards, S., Spiro, D. J., Ghedin, E., Slatko, B. E., Tettelin, H. and Werren, J. H.** (2007). Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. *Science* **317**, 1753–1756. doi: 10.1126/science.1142490.
- Hrčák, J., McLean, A. H. C. and Godfray, H. C. J.** (2016). Symbionts modify interactions between insects and natural enemies in the field. *Journal of Animal Ecology* **85**, 1605–1612. doi: 10.1111/1365-2656.12586.
- Hubbell, S. P.** (2001). *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*. Princeton University Press, Princeton.
- Hughes, T. P.** (1994). Catastrophes, Phase Shifts, and Large-Scale Degradation of a Caribbean Coral Reef. *Science* **265**, 1547–1551. doi: 10.1126/science.265.5178.1547.
- Hughes, T. P.** (2003). Climate Change, Human Impacts, and the Resilience of Coral Reefs.

- Science* **301**, 929–933. doi: 10.1126/science.1085046.
- Hughes, T. P., Rodrigues, M. J., Bellwood, D. R., Ceccarelli, D., Hoegh-Guldberg, O., McCook, L., Moltschaniwskyj, N., Pratchett, M. S., Steneck, R. S. and Willis, B.** (2007). Phase Shifts, Herbivory, and the Resilience of Coral Reefs to Climate Change. *Current Biology* **17**, 360–365. doi: 10.1016/j.cub.2006.12.049.
- Hughes, T. P., Graham, N. A. J., Jackson, J. B. C., Mumby, P. J. and Steneck, R. S.** (2010). Rising to the challenge of sustaining coral reef resilience. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 633–642. doi: 10.1016/j.tree.2010.07.011.
- Hughes, T. P., Barnes, M. L., Bellwood, D. R., Cinner, J. E., Cumming, G. S., Jackson, J. B. C., Kleypas, J., van de Leemput, I. A., Lough, J. M., Morrison, T. H., Palumbi, S. R., van Nes, E. H. and Scheffer, M.** (2017). Coral reefs in the Anthropocene. *Nature* **546**, 82–90. doi: 10.1038/nature22901.
- Hughey, M. C., Pena, J. A., Reyes, R., Medina, D., Belden, L. K. and Burrowes, P. A.** (2017). Skin bacterial microbiome of a generalist Puerto Rican frog varies along elevation and land use gradients. *PeerJ* **5**, e3688. doi: 10.7717/peerj.3688.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G. and Shevchik, V. E.** (2014). Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports* **6**, 427–440. doi: 10.1111/1758-2229.12166.
- Humann, P. and DeLoach, N.** (2014). *Reef Fish Identification - Florida Caribbean Bahamas - 4th Edition*, New World.
- Huttenhower, C., Kostic, A. D. and Xavier, R. J.** (2014). Inflammatory Bowel Disease as a Model for Translating the Microbiome. *Immunity* **40**, 843–854. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.013.
- Hyde, E. R., Navas-Molina, J. A., Song, S. J., Kueneman, J. G., Ackermann, G., Cardona, C., Humphrey, G., Boyer, D., Weaver, T., Mendelson, J. R., McKenzie, V. J., Gilbert, J. A. and Knight, R.** (2016). The Oral and Skin Microbiomes of Captive Komodo Dragons Are Significantly Shared with Their Habitat. *mSystems* **1**. doi: 10.1128/mSystems.00046-16.
- Hyun, D.-W., Kim, J. Y., Kim, M.-S., Shin, N.-R., Kim, H. S., Lee, J.-Y. and Bae, J.-W.** (2015). *Actibacter haliotis* sp. nov., isolated from the gut of an abalone, *Haliotis discus hannai*, and emended description of the genus *Actibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 49–55. doi: 10.1099/ij.s.0.067041-0.

-I-

- Iglesias-Prieto, R., Matta, J. L., Robins, W. A. and Trench, R. K.** (1992). Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 10302–10305. doi: 10.1073/pnas.89.21.10302.
- IPCC** (2021). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge.
- Itoi, S., Okamura, T., Koyama, Y. and Sugita, H.** (2006). Chitinolytic bacteria in the intestinal tract of Japanese coastal fishes. *Canadian Journal of Microbiology* **52**, 1158–1163. doi: 10.1139/w06-082.
- IUCN** (2020). *The IUCN Red List of Threatened Species*.
- Iwai, S., Weinmaier, T., Schmidt, B. L., Albertson, D. G., Poloso, N. J., Dabbagh, K. and DeSantis, T. Z.** (2016). Piphillin: Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes. *PLOS ONE* **11**, e0166104. doi:

10.1371/journal.pone.0166104.

Izvekova, G. I. and Lapteva, N. A. (2004). Microflora Associated with the Digestive-Transport Surfaces of Fish and Their Parasitic Cestodes. *Russian Journal of Ecology* **35**, 176–180. doi: 10.1023/B:RUSE.0000025968.97632.30.

-J-

Jackson, A., Forsyth, C. B., Shaikh, M., Voigt, R. M., Engen, P. A., Ramirez, V. and Keshavarzian, A. (2019). Diet in Parkinson's Disease: Critical Role for the Microbiome. *Frontiers in Neurology* **10**,. doi: 10.3389/fneur.2019.01245.

Jani, A. J. and Briggs, C. J. (2014). The pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* disturbs the frog skin microbiome during a natural epidemic and experimental infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E5049–E5058. doi: 10.1073/pnas.1412752111.

Janzen, D. H. (1980). When is it Coevolution? *Evolution* **34**, 611–612. doi: 10.1111/j.1558-5646.1980.tb04849.x.

Jin, W., Cheng, Y. and Zhu, W. (2017). The community structure of Methanomassiliicoccales in the rumen of Chinese goats and its response to a high-grain diet. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **8**, 47. doi: 10.1186/s40104-017-0178-0.

Jokiel, P. L. and Coles, S. L. (1990). Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs* **8**, 155–162. doi: 10.1007/BF00265006.

Jones, J., DiBattista, J. D., Stat, M., Bunce, M., Boyce, M. C., Fairclough, D. V., Travers, M. J. and Huggett, M. J. (2018). The Microbiome of the Gastrointestinal Tract of a Range-Shifting Marine Herbivorous Fish. *Frontiers in Microbiology* **9**,. doi: 10.3389/fmicb.2018.02000.

Jost, L. (2006). Entropy and diversity. *Oikos* **113**, 363–375. doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x.

-K-

Kakumanu, M. L., Reeves, A. M., Anderson, T. D., Rodrigues, R. R. and Williams, M. A. (2016). Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Frontiers in Microbiology* **7**,. doi: 10.3389/fmicb.2016.01255.

Kalyuzhnyi, S., Fedorovich, V., Lens, P., Hulshoff Pol, L. and Lettinga, G. (1998). Mathematical modelling as a tool to study population dynamics between sulfate reducing and methanogenic bacteria. *Biodegradation* **9**, 187–199. doi: 10.1023/a:1008339018423.

Kan, J., Clingenpeel, S., Macur, R. E., Inskeep, W. P., Lovalvo, D., Varley, J., Gorby, Y., McDermott, T. R. and Nealson, K. (2011). Archaea in Yellowstone Lake. *The ISME Journal* **5**, 1784–1795. doi: 10.1038/ismej.2011.56.

Kane, M. D., Poulsen, L. K. and Stahl, D. A. (1993). Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 682–686. doi: 10.1128/aem.59.3.682-686.1993.

Keck, F., Rimet, F., Bouchez, A. and Franc, A. (2016). phylosignal: an R package to measure, test, and explore the phylogenetic signal. *Ecology and Evolution* **6**, 2774–2780. doi: 10.1002/ece3.2051.

- Keller, I. S., Bayer, T., Salzburger, W. and Roth, O.** (2018). Effects of parental care on resource allocation into immune defense and buccal microbiota in mouthbrooding cichlid fishes*. *Evolution* **72**, 1109–1123. doi: 10.1111/evo.13452.
- Kelly, C. and Salinas, I.** (2017). Under Pressure: Interactions between Commensal Microbiota and the Teleost Immune System. *Frontiers in Immunology* **8**,. doi: 10.3389/fimmu.2017.00559.
- Kelly, L. W., Barott, K. L., Dinsdale, E., Friedlander, A. M., Nosrat, B., Obura, D., Sala, E., Sandin, S. A., Smith, J. E., Vermeij, M. J. A., Williams, G. J., Willner, D. and Rohwer, F.** (2012). Black reefs: iron-induced phase shifts on coral reefs. *The ISME Journal* **6**, 638–649. doi: 10.1038/ismej.2011.114.
- Kendall, A. I.** (1923). *Civilization And The Microbe*, Houghton M. Riverside Press Cambridge, Boston & New York.
- Khoushab, F. and Yamabhai, M.** (2010). Chitin Research Revisited. *Marine Drugs* **8**, 1988–2012. doi: 10.3390/md8071988.
- Kibenge, F. S.** (2019). Emerging viruses in aquaculture. *Current Opinion in Virology* **34**, 97–103. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.008.
- Kikuchi, Y., Tada, A., Musolin, D. L., Hari, N., Hosokawa, T., Fujisaki, K. and Fukatsu, T.** (2016). Collapse of Insect Gut Symbiosis under Simulated Climate Change. *mBio* **7**,. doi: 10.1128/mBio.01578-16.
- Kim, S., Cho, Y. S., Kim, H.-M., Chung, O., Kim, H., Jho, S., Seomun, H., Kim, J., Bang, W. Y., Kim, C., An, J., Bae, C. H., Bhak, Y., Jeon, S., Yoon, H., Kim, Y., Jun, J., Lee, H., Cho, S., Uphyrkina, O., Kostyria, A., Goodrich, J., Miquelle, D., Roelke, M., Lewis, J., Yurchenko, A., Bankevich, A., Cho, J., Lee, S., Edwards, J. S., Weber, J. A., Cook, J., Kim, S., Lee, H., Manica, A., Lee, I., O'Brien, S. J., Bhak, J. and Yeo, J.-H.** (2016). Comparison of carnivore, omnivore, and herbivore mammalian genomes with a new leopard assembly. *Genome Biology* **17**, 211. doi: 10.1186/s13059-016-1071-4.
- Klaus, J. S., Janse, I., Heikoop, J. M., Sanford, R. A. and Fouke, B. W.** (2007). Coral microbial communities, zooxanthellae and mucus along gradients of seawater depth and coastal pollution. *Environmental Microbiology* **9**, 1291–1305. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01249.x.
- Kleypas, J. A., Feely, R. A., Fabry, V. J., Langdon, C., Sabine, C. L. and Robbins, L. L.** (2005). Impacts of Ocean Acidification on Coral Reefs and Other Marine Calcifiers: A Guide for Future Research. In *NSF, NOAA, and the US Geological Survey*, p. 88. Saint-Petersburg, FL.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, F. O.** (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* **41**, 1–11. doi: 10.1093/nar/gks808.
- Kline, D., Kuntz, N., Breitbart, M., Knowlton, N. and Rohwer, F.** (2006). Role of elevated organic carbon levels and microbial activity in coral mortality. *Marine Ecology Progress Series* **314**, 119–125. doi: 10.3354/meps314119.
- Klinges, G., Maher, R. L., Vega Thurber, R. L. and Muller, E. M.** (2020). Parasitic ‘Candidatus Aquarickettsia rohweri’ is a marker of disease susceptibility in *Acropora cervicornis* but is lost during thermal stress. *Environmental Microbiology* **22**, 5341–5355. doi: 10.1111/1462-2920.15245.
- Knights, D., Kuczynski, J., Charlson, E. S., Zaneveld, J., Mozer, M. C., Collman, R. G., Bushman, F. D., Knight, R. and Kelley, S. T.** (2011). Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nature Methods* **8**, 761–763. doi: 10.1038/nmeth.1650.

- Knox, N. C., Forbes, J. D., Van Domselaar, G. and Bernstein, C. N.** (2019). The Gut Microbiome as a Target for IBD Treatment: Are We There Yet? *Current Treatment Options in Gastroenterology* **17**, 115–126. doi: 10.1007/s11938-019-00221-w.
- Knutie, S. A.** (2018). Relationships among introduced parasites, host defenses, and gut microbiota of Galapagos birds. *Ecosphere* **9**,. doi: 10.1002/ecs2.2286.
- Knutie, S. A., Gabor, C. R., Kohl, K. D. and Rohr, J. R.** (2018). Do host-associated gut microbiota mediate the effect of an herbicide on disease risk in frogs? *Journal of Animal Ecology* **87**, 489–499. doi: 10.1111/1365-2656.12769.
- Koch, H., Abrol, D. P., Li, J. and Schmid-Hempel, P.** (2013). Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology* **22**, 2028–2044. doi: 10.1111/mec.12209.
- Kohl, K. D. and Yahn, J.** (2016). Effects of environmental temperature on the gut microbial communities of tadpoles. *Environmental Microbiology* **18**, 1561–1565. doi: 10.1111/1462-2920.13255.
- Kohl, K. D., Amaya, J., Passemment, C. A., Dearing, M. D. and Mccue, M. D.** (2014a). Unique and shared responses of the gut microbiota to prolonged fasting: A comparative study across five classes of vertebrate hosts. *FEMS Microbiology Ecology* **90**, 883–894. doi: 10.1111/1574-6941.12442.
- Kohl, K. D., Skopec, M. M. and Dearing, M. D.** (2014b). Captivity results in disparate loss of gut microbial diversity in closely related hosts. *Conservation Physiology* **2**, cou009–cou009. doi: 10.1093/conphys/cou009.
- Kohl, K. D., Cary, T. L., Karasov, W. H. and Dearing, M. D.** (2015). Larval exposure to polychlorinated biphenyl 126 (PCB-126) causes persistent alteration of the amphibian gut microbiota. *Environmental Toxicology and Chemistry* **34**, 1113–1118. doi: 10.1002/etc.2905.
- Kohl, K. D., Varner, J., Wilkening, J. L. and Dearing, M. D.** (2018). Gut microbial communities of American pikas (*Ochotona princeps*): Evidence for phylosymbiosis and adaptations to novel diets. *Journal of Animal Ecology* **87**, 323–330. doi: 10.1111/1365-2656.12692.
- Kokou, F., Sasson, G., Nitzan, T., Doron-Faigenboim, A., Harpaz, S., Cnaani, A. and Mizrahi, I.** (2018). Host genetic selection for cold tolerance shapes microbiome composition and modulates its response to temperature. *eLife* **7**,. doi: 10.7554/eLife.36398.
- Kolb, S., Seeliger, S., Springer, N., Ludwig, W. and Schink, B.** (1998). The Fermenting Bacterium *Malonomonas rubra* is Phylogenetically Related to Sulfur-Reducing Bacteria and Contains a c-Type Cytochrome similar to those of Sulfur and Sulfate Reducers. *Systematic and Applied Microbiology* **21**, 340–345. doi: 10.1016/S0723-2020(98)80042-8.
- Kormas, K. A., Meziti, A., Mente, E. and Frentzos, A.** (2014). Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*). *MicrobiologyOpen* **3**, 718–728. doi: 10.1002/mbo3.202.
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A. and Martens, E. C.** (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 323–335. doi: 10.1038/nrmicro2746.
- Koskella, B. and Brockhurst, M. A.** (2014). Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews* **38**, 916–931. doi: 10.1111/1574-6976.12072.
- Kotzamanis, Y. P., Gisbert, E., Gatesoupe, F. J., Zambonino Infante, J. and Cahu, C.** (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass

- (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **147**, 205–214. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.12.037.
- Krebs, C. J.** (1999). *Ecological Methodology*, Pearson. Addison-Wesley Educational Publishers, Menlo Park.
- Kreisinger, J., Bastien, G., Hauffe, H. C., Marchesi, J. and Perkins, S. E.** (2015). Interactions between multiple helminths and the gut microbiota in wild rodents. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**, 20140295. doi: 10.1098/rstb.2014.0295.
- Kroon, F. J., Lefèvre, C. D., Doyle, J. R., Patel, F., Milton, G., Severati, A., Kenway, M., Johansson, C. L., Schnebert, S., Thomas-Hall, P., Bonin, M. C., Cameron, D. S. and Westcott, D. A.** (2020). DNA-based identification of predators of the corallivorous Crown-of-Thorns Starfish (*Acanthaster cf. solaris*) from fish faeces and gut contents. *Scientific Reports* **10**, 8184. doi: 10.1038/s41598-020-65136-4.
- Krynak, K. L., Burke, D. J. and Benard, M. F.** (2016). Landscape and water characteristics correlate with immune defense traits across Blanchard's cricket frog (*Acris blanchardi*) populations. *Biological Conservation* **193**, 153–167. doi: 10.1016/j.biocon.2015.11.019.
- Krynak, K. L., Burke, D. J. and Benard, M. F.** (2017). Rodeo™ Herbicide Negatively Affects Blanchard's Cricket Frogs (*Acris blanchardi*) Survival and Alters the Skin-Associated Bacterial Community. *Journal of Herpetology* **51**, 402–410. doi: 10.1670/16-092.
- Kueneman, J. G., Woodhams, D. C., Harris, R., Archer, H. M., Knight, R. and McKenzie, V. J.** (2016). Probiotic treatment restores protection against lethal fungal infection lost during amphibian captivity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**, 20161553. doi: 10.1098/rspb.2016.1553.
- Kulbicki, M., Galzin, R., Lison de Loma, T., Madi Moussa, K. and Vigliola, L.** (2009). *Caractéristiques des peuplements de poissons de récif des îles hautes de Polynésie française : une revue des données disponibles. Rapport de Convention EPHE-AAMP*. Perpignan (France).
- Kulbicki, M., Parravicini, V., Bellwood, D. R., Arias-González, E., Chabanet, P., Floeter, S. R., Friedlander, A., McPherson, J., Myers, R. E., Vigliola, L. and Mouillot, D.** (2013). Global Biogeography of Reef Fishes: A Hierarchical Quantitative Delineation of Regions. *PLoS ONE* **8**, e81847. doi: 10.1371/journal.pone.0081847.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M. and Hedges, S. B.** (2017). TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Molecular Biology and Evolution* **34**, 1812–1819. doi: 10.1093/molbev/msx116.
- Kuntz, N., Kline, D., Sandin, S. and Rohwer, F.** (2005). Pathologies and mortality rates caused by organic carbon and nutrient stressors in three Caribbean coral species. *Marine Ecology Progress Series* **294**, 173–180. doi: 10.3354/meps294173.
- Kutty, S. N. and Philip, R.** (2008). Marine yeasts—a review. *Yeast* **25**, 465–483. doi: 10.1002/yea.1599.
- Kwong, W. K., Medina, L. A., Koch, H., Sing, K.-W., Soh, E. J. Y., Ascher, J. S., Jaffé, R. and Moran, N. A.** (2017). Dynamic microbiome evolution in social bees. *Science Advances* **3**, e1600513. doi: 10.1126/sciadv.1600513.

-L-

- Lafferty, K. D., Allesina, S., Arim, M., Briggs, C. J., De Leo, G., Dobson, A. P., Dunne, J. A., Johnson, P. T. J., Kuris, A. M., Marcogliese, D. J., Martinez, N. D., Memmott, J., Marquet, P. A., McLaughlin, J. P., Mordecai, E. A., Pascual, M., Poulin, R. and**

- Thieltges, D. W.** (2008). Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology letters* **11**, 533–46. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01174.x.
- Lane, D. J.** (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M.), pp. 115–175. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Lane, N. and Martin, W. F.** (2015). Eukaryotes really are special, and mitochondria are why. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E4823–E4823. doi: 10.1073/pnas.1509237112.
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G. and Huttenhower, C.** (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology* **31**, 814–821. doi: 10.1038/nbt.2676.
- Lapanje, A., Zrimec, A., Drobne, D. and Rupnik, M.** (2010). Long-term Hg pollution-induced structural shifts of bacterial community in the terrestrial isopod (*Porcellio scaber*) gut. *Environmental Pollution* **158**, 3186–3193. doi: 10.1016/j.envpol.2010.07.001.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S. A. and Arias, C. R.** (2013). Diversity of the skin microbiota of fishes: Evidence for host species specificity. *FEMS Microbiology Ecology* **85**, 483–494. doi: 10.1111/1574-6941.12136.
- Laue, H., Friedrich, M., Ruff, J. and Cook, A. M.** (2001). Dissimilatory Sulfite Reductase (Desulfoviridin) of the Taurine-Degrading, Non-Sulfate-Reducing Bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU Contains a Fused DsrB-DsrD Subunit. *Journal of Bacteriology* **183**, 1727–1733. doi: 10.1128/JB.183.5.1727-1733.2001.
- Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A.** (2002). Chromatin–IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603–607. doi: 10.1038/416603a.
- Lederberg, J. and McCray, A.** (2001). 'Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. *Genealogical Treasury of Words. Scientist* **15**, 8.
- Lee, W.-J. and Hase, K.** (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology* **10**, 416–424. doi: 10.1038/nchembio.1535.
- Lee, M. J., Schreurs, P. J., Messer, A. C. and Zinder, S. H.** (1987). Association of methanogenic bacteria with flagellated protozoa from a termite hindgut. *Current Microbiology* **15**, 337–341. doi: 10.1007/BF01577591.
- Leeuwenhoek, A. Van** (1674). More observations from Mr. Leewenhook, in a letter of Sept. 7. 1674. sent to the publisher. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **9**, 178–182. doi: 10.1098/rstl.1674.0057.
- Lefcheck, J. S., Brandl, S. J., Innes-Gold, A. A., Steneck, R. S., Torres, R. E. and Rasher, D. B.** (2019). Response: Commentary: Tropical fish diversity enhances coral reef functioning across multiple scales. *Frontiers in Ecology and Evolution* **7**,. doi: 10.3389/fevo.2019.00303.
- Legrand, T. P. R. A., Catalano, S. R., Wos-Oxley, M. L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M. S., Stone, D. A. J., Qin, J. G. and Oxley, A. P. A.** (2018). The Inner Workings of the Outer Surface: Skin and Gill Microbiota as Indicators of Changing Gut Health in Yellowtail Kingfish. *Frontiers in Microbiology* **8**,. doi: 10.3389/fmicb.2017.02664.
- Legrand, T. P. R. A., Wynne, J. W., Weyrich, L. S. and Oxley, A. P. A.** (2020). A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome. *Reviews in Aquaculture* **12**, 1101–1134. doi: 10.1111/raq.12375.
- Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F., Holt, R. D., Shurin, J. B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M. and Gonzalez, A.** (2004).

- The metacommunity concept: A framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters* **7**, 601–613. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00608.x.
- Leigh, S. C., Papastamatiou, Y. P. and German, D. P.** (2018). Seagrass digestion by a notorious “carnivore.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285**,. doi: 10.1098/rspb.2018.1583.
- León-Zayas, R., McCargar, M., Drew, J. A. and Biddle, J. F.** (2020). Microbiomes of fish, sediment and seagrass suggest connectivity of coral reef microbial populations. *PeerJ* **8**, 1–18. doi: 10.7717/peerj.10026.
- Letunic, I. and Bork, P.** (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* **44**, W242–W245. doi: 10.1093/nar/gkw290.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. and Gordon, J. I.** (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023. doi: 10.1038/4441022a.
- Ley, R., Hamady, M. and Lozupone, C.** (2008a). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**, 1647–1651. doi: 10.1126/science.1155725.Evolution.
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R. and Gordon, J. I.** (2008b). Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 776–788. doi: 10.1038/nrmicro1978.
- Li, M., Wang, C., Wang, J., Li, A., Gong, X. and Ma, H.** (2009). Redescription of *Balantidium polyvacuolum* Li 1963 (Class: Litostomatea) inhabiting the intestines of Xenocyprinae fishes in Hubei, China. *Parasitology Research* **106**, 177–182. doi: 10.1007/s00436-009-1645-0.
- Li, K., Bihan, M., Yooseph, S. and Methé, B. A.** (2012). Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome. *PLoS ONE* **7**, e32118. doi: 10.1371/journal.pone.0032118.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A. S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J. Y., Edris, S., Yang, H., Wang, J., Hansen, T., Nielsen, H. B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Doré, J., Ehrlich, S. D., Bork, P. and Wang, J.** (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology* **32**, 834–841. doi: 10.1038/nbt.2942.
- Liamleam, W. and Annachhatre, A. P.** (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances* **25**, 452–463. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.05.002.
- Lim, S. J. and Bordenstein, S. R.** (2020). An introduction to phylosymbiosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**,. doi: 10.1098/rspb.2019.2900.
- Littleford-Colquhoun, B. L., Weyrich, L. S., Kent, N. and Frere, C. H.** (2019). City life alters the gut microbiome and stable isotope profiling of the eastern water dragon (*Intellagama lesueurii*). *Molecular Ecology* **28**, 4592–4607. doi: 10.1111/mec.15240.
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F. and Wang, W.** (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports* **6**, 1–12. doi: 10.1038/srep24340.
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H. and Derome, N.** (2014). Teleost microbiomes: The state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology* **5**,. doi: 10.3389/fmicb.2014.00207.
- Lobato, F. L., Barneche, D. R., Siqueira, A. C., Liedke, A. M. R., Lindner, A., Pie, M. R., Bellwood, D. R. and Floeter, S. R.** (2014). Diet and Diversification in the Evolution of Coral Reef Fishes. *PLoS ONE* **9**, e102094. doi: 10.1371/journal.pone.0102094.
- Lødemel, J. B., Mayhew, T. M., Myklebust, R., Olsen, R. E., Espelid, S. and Ringø, E.** (2001). Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus*

- alpinus L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Aquaculture Research* **32**, 935–945. doi: 10.1046/j.1365-2109.2001.00621.x.
- Logares, R., Bråte, J., Bertilsson, S., Clasen, J. L., Shalchian-Tabrizi, K. and Rengefors, K.** (2009). Infrequent marine–freshwater transitions in the microbial world. *Trends in Microbiology* **17**, 414–422. doi: 10.1016/j.tim.2009.05.010.
- Long, A., Call, D. R. and Cain, K. D.** (2014). Investigation of the Link between Broodstock Infection, Vertical Transmission, and Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* in Eggs and Progeny of Rainbow Trout and Coho Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* **26**, 66–77. doi: 10.1080/08997659.2014.886632.
- Louca, S., Parfrey, L. W. and Doebeli, M.** (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* **353**, 1272–1277. doi: 10.1126/science.aaf4507.
- Loudon, A. H., Woodhams, D. C., Parfrey, L. W., Archer, H., Knight, R., McKenzie, V. and Harris, R. N.** (2014). Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *The ISME Journal* **8**, 830–840. doi: 10.1038/ismej.2013.200.
- Lowrey, L., Woodhams, D. C., Tacchi, L. and Salinas, I.** (2015). Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 6915–6925. doi: 10.1128/AEM.01826-15.
- Lozupone, C. and Knight, R.** (2005). UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **71**, 8228–8235. doi: 10.1128/AEM.71.12.8228.
- Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T. and Knight, R.** (2007). Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1576–1585. doi: 10.1128/AEM.01996-06.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J. and Knight, R.** (2010). UniFrac : an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal* **5**, 169–172. doi: 10.1038/ismej.2010.133.
- Lubomski, M., Tan, A. H., Lim, S.-Y., Holmes, A. J., Davis, R. L. and Sue, C. M.** (2020). Parkinson’s disease and the gastrointestinal microbiome. *Journal of Neurology* **267**, 2507–2523. doi: 10.1007/s00415-019-09320-1.
- Ludwig, W.** (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**, 1363–1371. doi: 10.1093/nar/gkh293.
- Lurie-Weinberger, M. N. and Gophna, U.** (2015). Archaea in and on the Human Body: Health Implications and Future Directions. *PLOS Pathogens* **11**, e1004833. doi: 10.1371/journal.ppat.1004833.

-M-

- MacAvoy, S. ., Macko, S. . and Joye, S. .** (2002). Fatty acid carbon isotope signatures in chemosynthetic mussels and tube worms from gulf of Mexico hydrocarbon seep communities. *Chemical Geology* **185**, 1–8. doi: 10.1016/S0009-2541(01)00394-1.
- Mackie, R., Nelson, D., Wheeler, E., Wikelski, M. and Cann, I.** (2009). Fermentative Digestion in Herbivorous Lizards : Bacterial Population Analysis in the Intestinal Tract of Free-Living Land (*Conolophus pallidus*) and Marine Iguanas (*Amblyrynchus cristatus*) on the Galapagos Archipelago. In *Proceedings of the 4 th CPB meeting in Africa : Mara 2008 ; molecules to migration ; the pressures of life ; Maasai Mara Game Reserve, Kenya, July 19 - 25, 2008* (ed. Morris, S. and Vosloo, A.), pp. 193–202. Bologna.
- Magurran, A. E. and Henderson, P. A.** (2003). Explaining the excess of rare species in

- natural species abundance distributions. *Nature* **422**, 714–716. doi: 10.1038/nature01547.
- Maire, E., Villéger, S., Graham, N. A. J., Hoey, A. S., Cinner, J., Ferse, S. C. A., Aliaume, C., Booth, D. J., Feary, D. A., Kulbicki, M., Sandin, S. A., Vigliola, L. and Mouillot, D.** (2018). Community-wide scan identifies fish species associated with coral reef services across the Indo-Pacific. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285**, 20181167. doi: 10.1098/rspb.2018.1167.
- Maldonado, J., Cañabate, F., Sempere, L., Vela, F., Sánchez, A. R., Narbona, E., López-Huertas, E., Geerlings, A., Valero, A. D., Olivares, M. and Lara-Villoslada, F.** (2012). Human Milk Probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 Reduces the Incidence of Gastrointestinal and Upper Respiratory Tract Infections in Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **54**, 55–61. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182333f18.
- Margulis, L. and Fester, R.** (1991). *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. MIT press, Cambridge.
- Marques, A., Ollevier, F., Verstraete, W., Sorgeloos, P. and Bossier, P.** (2006). Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 903–918. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02961.x.
- Martin, A. P.** (2002). Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3673–3682. doi: 10.1128/AEM.68.8.3673-3682.2002.
- Martin, R., Nauta, A., Ben Amor, K., Knippels, L., Knol, J. and Garssen, J.** (2010). Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial Microbes* **1**, 367–382. doi: 10.3920/BM2010.0027.
- Martin, W. F., Garg, S. and Zimorski, V.** (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**, 20140330. doi: 10.1098/rstb.2014.0330.
- Martino, M., Ma, D. and Leulier, F.** (2017). Microbial influence on *Drosophila* biology. *Current Opinion in Microbiology* **38**, 165–170. doi: 10.1016/j.mib.2017.06.004.
- Martinson, V. G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Rueppell, O., Tingek, S. and Moran, N. A.** (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology* **20**, 619–628. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x.
- Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C. and Ralph, J.** (2009). Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Current Biology* **19**, 169–175. doi: 10.1016/j.cub.2008.12.031.
- Mazel, F., Davis, K. M., Loudon, A., Kwong, W. K., Groussin, M. and Parfrey, L. W.** (2018). Is Host Filtering the Main Driver of Phyllosymbiosis across the Tree of Life? *mSystems* **3**, 1–15. doi: 10.1128/msystems.00097-18.
- McClanahan, T. R.** (1995). A coral reef ecosystem-fisheries model: impacts of fishing intensity and catch selection on reef structure and processes. *Ecological Modelling* **80**, 1–19. doi: 10.1016/0304-3800(94)00042-G.
- McClanahan, T. R., Mwaguni, S. and Muthiga, N. A.** (2005). Management of the Kenyan coast. *Ocean & Coastal Management* **48**, 901–931. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2005.03.005.
- McDole, T., Nulton, J., Barott, K. L., Felts, B., Hand, C., Hatay, M., Lee, H., Nadon, M. O., Nosrat, B., Salamon, P., Bailey, B., Sandin, S. A., Vargas-Angel, B., Youle, M., Zgliczynski, B. J., Brainard, R. E. and Rohwer, F.** (2012). Assessing Coral Reefs on a Pacific-Wide Scale Using the Microbialization Score. *PLoS ONE* **7**, e43233. doi: 10.1371/journal.pone.0043233.
- McFall-Ngai, M.** (2007). Adaptive immunity: Care for the community. *Nature* **445**, 153. doi: 10.1038/445153a.

- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Neilson, K., Pierce, N. E., Rawls, J. F., Reid, A., Ruby, E. G., Rumpho, M., Sanders, J. G., Tautz, D. and Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 3229–3236. doi: 10.1073/pnas.1218525110.
- McIntosh, D., Ji, B., Forward, B. S., Puvanendran, V., Boyce, D. and Ritchie, R. (2008). Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture* **275**, 42–50. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.12.021.
- McKenney, E. A., Greene, L. K., Drea, C. M. and Yoder, A. D. (2017). Down for the count: Cryptosporidium infection depletes the gut microbiome in Coquerel's sifakas. *Microbial Ecology in Health and Disease* **28**, 1335165. doi: 10.1080/16512235.2017.1335165.
- McKenzie, V. J., Song, S. J., Delsuc, F., Prest, T. L., Oliverio, A. M., Korpita, T. M., Alexiev, A., Amato, K. R., Metcalf, J. L., Kowalewski, M., Avenant, N. L., Link, A., Di Fiore, A., Seguin-Orlando, A., Feh, C., Orlando, L., Mendelson, J. R., Sanders, J. and Knight, R. (2017). The Effects of Captivity on the Mammalian Gut Microbiome. *Integrative and Comparative Biology* **57**, 690–704. doi: 10.1093/icb/ixc090.
- McLean, A. H. C., Parker, B. J., Hrček, J., Henry, L. M. and Godfray, H. C. J. (2016). Insect symbionts in food webs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**, 20150325. doi: 10.1098/rstb.2015.0325.
- McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **8**,. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Meadow, J. F., Bateman, A. C., Herkert, K. M., O'Connor, T. K. and Green, J. L. (2013). Significant changes in the skin microbiome mediated by the sport of roller derby. *PeerJ* **1**, e53. doi: 10.7717/peerj.53.
- Meadow, J. F., Altrichter, A. E., Bateman, A. C., Stenson, J., Brown, G., Green, J. L. and Bohannon, B. J. M. (2015). Humans differ in their personal microbial cloud. *PeerJ* **3**, e1258. doi: 10.7717/peerj.1258.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. A. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* **91**, 295–298. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80412-2.
- Mendell, J. E., Clements, K. D., Choat, J. H. and Angert, E. R. (2008). Extreme polyploidy in a large bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 6730–6734. doi: 10.1073/pnas.0707522105.
- Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S. and Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology* **10**,. doi: 10.3389/fmicb.2019.00780.
- Merrifield, D. L. and Rodiles, A. (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In *Mucosal Health in Aquaculture*, doi: 10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Bøgwald, J., Castex, M. and Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* **302**, 1–18. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.02.007.
- Micheli, F., Benedetti-Cecchi, L., Gambaccini, S., Bertocci, I., Borsini, C., Osio, G. C. and Romano, F. (2005). Cascading human impacts, marine protected areas, and the structure of Mediterranean reef assemblages. *Ecological Monographs* **75**, 81–102. doi: 10.1890/03-

- Miller, J., Muller, E., Rogers, C., Waara, R., Atkinson, A., Whelan, K. R. T., Patterson, M. and Witcher, B.** (2009). Coral disease following massive bleaching in 2005 causes 60% decline in coral cover on reefs in the US Virgin Islands. *Coral Reefs* **28**, 925–937. doi: 10.1007/s00338-009-0531-7.
- Miller, T. W., Wang, E. A., Gould, S., Stein, E. V., Kaur, S., Lim, L., Amarnath, S., Fowler, D. H. and Roberts, D. D.** (2012). Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Potentiator of T Cell Activation. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4211–4221. doi: 10.1074/jbc.M111.307819.
- Miller, E. T., Svanbäck, R. and Bohannan, B. J. M.** (2018). Microbiomes as Metacommunities : Understanding Host-Associated Microbes through Metacommunity Ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 1–10. doi: 10.1016/j.tree.2018.09.002.
- Miller, D. L., Parish, A. J. and Newton, I. L.** (2019). Transitions and transmission: behavior and physiology as drivers of honey bee-associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology* **50**, 1–7. doi: 10.1016/j.mib.2019.08.001.
- Miyake, S., Ngugi, D. K. and Stingl, U.** (2015). Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes. *Molecular Ecology* **24**, 656–672. doi: 10.1111/mec.13050.
- Miyake, S., Ngugi, D. K. and Stingl, U.** (2016). Phylogenetic diversity, distribution, and cophylogeny of giant bacteria (Epulopiscium) with their surgeonfish hosts in the Red Sea. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2016.00285.
- Moeller, A. H., Caro-Quintero, A., Mjunga, D., Georgiev, A. V., Lonsdorf, E. V., Muller, M. N., Pusey, A. E., Peeters, M., Hahn, B. H. and Ochman, H.** (2016). Cospeciation of gut microbiota with hominids. *Science* **353**,. doi: 10.1126/science.aaf3951.
- Moeller, A. H., Suzuki, T. A., Lin, D., Lacey, E. A., Wasser, S. K. and Nachman, M. W.** (2017). Dispersal limitation promotes the diversification of the mammalian gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 13768–13773. doi: 10.1073/pnas.1700122114.
- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C. and Schmitz, R. A.** (2018). Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends in Microbiology* **26**, 70–85. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.004.
- Montague, M. J., Li, G., Gandolfi, B., Khan, R., Aken, B. L., Searle, S. M. J., Minx, P., Hillier, L. W., Koboldt, D. C., Davis, B. W., Driscoll, C. A., Barr, C. S., Blackistone, K., Quilez, J., Lorente-Galdos, B., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Thomas, G. W. C., Hahn, M. W., Menotti-Raymond, M., O'Brien, S. J., Wilson, R. K., Lyons, L. A., Murphy, W. J. and Warren, W. C.** (2014). Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 17230–17235. doi: 10.1073/pnas.1410083111.
- Monteiro, A. L. G., Faro, A. M. C. da F., Peres, M. T. P., Batista, R., Poli, C. H. E. C. and Villalba, J. J.** (2018). The role of small ruminants on global climate change. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* **40**, 43124. doi: 10.4025/actascianimsci.v40i1.43124.
- Montero, D., Mathlouthi, F., Tort, L., Afonso, J. M., Torrecillas, S., Fernández-Vaquero, A., Negrin, D. and Izquierdo, M. S.** (2010). Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish & Shellfish Immunology* **29**, 1073–1081. doi: 10.1016/j.fsi.2010.08.024.
- Moran, P.** (1948). The interpretation of statistical maps. *Journal of the Royal Statistical Society : Series B (Methodol.)* **10**, 243–251.
- Moran, N. A.** (2001). The Coevolution of Bacterial Endosymbionts and Phloem-Feeding Insects. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**, 35. doi: 10.2307/2666130.

- Moran, N. A. and Sloan, D. B.** (2015). The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLoS Biology* **13**, doi: 10.1371/journal.pbio.1002311.
- Moran, N. A., Ochman, H. and Hammer, T. J.** (2019). Evolutionary and Ecological Consequences of Gut Microbial Communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **50**, 451–475. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062453.
- Morrow, K. M., Liles, M. R., Paul, V. J., Moss, A. G. and Chadwick, N. E.** (2013). Bacterial shifts associated with coral-macroalgal competition in the Caribbean Sea. *Marine Ecology Progress Series* **488**, 103–117. doi: 10.3354/meps10394.
- Morrow, K. M., Bromhall, K., Motti, C. A., Munn, C. B. and Bourne, D. G.** (2017). Allelochemicals produced by brown macroalgae of the *Lobophora* genus are active against coral larvae and associated bacteria, supporting pathogenic shifts to *Vibrio* dominance. *Applied and Environmental Microbiology* **83**, 1–19. doi: 10.1128/AEM.02391-16.
- Mouillot, D., Villéger, S., Parravicini, V., Kulbicki, M., Arias-González, J. E., Bender, M., Chabanet, P., Floeter, S. R., Friedlander, A., Vigliola, L. and Bellwood, D. R.** (2014). Functional over-redundancy and high functional vulnerability in global fish faunas on tropical reefs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 13757–13762. doi: 10.1073/pnas.1317625111.
- Mountfort, D. O., Campbell, J. and Clements, K. D.** (2002). Hindgut Fermentation in Three Species of Marine Herbivorous Fish. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1374–1380. doi: 10.1128/AEM.68.3.1374-1380.2002.
- Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., Gonzalez, A., Fontana, L., Henrissat, B., Knight, R. and Gordon, J. I.** (2011). Diet Drives Convergence in Gut Microbiome Functions Across Mammalian Phylogeny and Within Humans. *Science* **332**, 970–974. doi: 10.1126/science.1198719.
- Muller, E. M., Sartor, C., Alcaraz, N. I. and van Woesik, R.** (2020). Spatial Epidemiology of the Stony-Coral-Tissue-Loss Disease in Florida. *Frontiers in Marine Science* **7**, doi: 10.3389/fmars.2020.00163.
- Mumby, P. J.** (2006). The impact of exploiting grazers (Scaridae) on the dynamics of Caribbean coral reefs. *Ecological Applications* **16**, 747–769. doi: 10.1890/1051-0761(2006)016[0747:TIOEGS]2.0.CO;2.
- Mumby, P. J., Dahlgren, C. P., Harborne, A. R., Kappel, C. V., Micheli, F., Brumbaugh, D. R., Holmes, K. E., Mendes, J. M., Broad, K., Sanchirico, J. N., Buch, K., Box, S., Stoffle, R. W. and Gill, A. B.** (2006). Fishing, trophic cascades, and the process of grazing on coral reefs. *Science* **311**, 98–101. doi: 10.1126/science.1121129.
- Munday, P. L., Jones, G. P., Pratchett, M. S. and Williams, A. J.** (2008). Climate change and the future for coral reef fishes. *Fish and Fisheries* **9**, 261–285. doi: 10.1111/j.1467-2979.2008.00281.x.
- Murray, M. H., Lankau, E. W., Kidd, A. D., Welch, C. N., Ellison, T., Adams, H. C., Lipp, E. K. and Hernandez, S. M.** (2020). Gut microbiome shifts with urbanization and potentially facilitates a zoonotic pathogen in a wading bird. *PLOS ONE* **15**, e0220926. doi: 10.1371/journal.pone.0220926.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G.** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695–700. doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.

- Ñacari, L. A. and Oliva, M. E. (2016). Metazoan parasites of deep-sea fishes from the South Eastern Pacific: Exploring the role of ecology and host phylogeny. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **115**, 123–130. doi: 10.1016/j.dsr.2016.06.002.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* **41**, 1553–1573. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x.
- Nayak, S. K., Swain, P. and Mukherjee, S. C. (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish & Shellfish Immunology* **23**, 892–896. doi: 10.1016/j.fsi.2007.02.008.
- Nelson, C. E., Goldberg, S. J., Wegley Kelly, L., Haas, A. F., Smith, J. E., Rohwer, F. and Carlson, C. A. (2013a). Coral and macroalgal exudates vary in neutral sugar composition and differentially enrich reef bacterioplankton lineages. *ISME Journal* **7**, 962–979. doi: 10.1038/ismej.2012.161.
- Nelson, T. M., Rogers, T. L., Carlini, A. R. and Brown, M. V. (2013b). Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Environmental Microbiology* **15**, 1132–1145. doi: 10.1111/1462-2920.12022.
- Nelson, C. E., Goldberg, S. J., Wegley Kelly, L., Haas, A. F., Smith, J. E., Rohwer, F. and Carlson, C. A. (2013c). Coral and macroalgal exudates vary in neutral sugar composition and differentially enrich reef bacterioplankton lineages. *The ISME Journal* **7**, 962–979. doi: 10.1038/ismej.2012.161.
- Nelson, T. M., Apprill, A., Mann, J., Rogers, T. L. and Brown, M. V. (2015). The marine mammal microbiome: current knowledge and future directions. *Microbiology Australia* **36**, 8. doi: 10.1071/MA15004.
- Nelson, J. S., Grande, T. C. and Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA doi: 10.1002/9781119174844.
- Nelson, T., Wallen, M., Bunce, M., Oskam, C., Lima, N., Clayton, L. and Mann, J. (2019). Detecting respiratory bacterial communities of wild dolphins: implications for animal health. *Marine Ecology Progress Series* **622**, 203–217. doi: 10.3354/meps13055.
- Newbold, C. J., De la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E. and McEwan, N. R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2015.01313.
- Newman Jr., J. T., Cosenza, B. J. and Buck, J. D. (1972). Aerobic Microflora of the Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) Intestine. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **29**, 333–336. doi: 10.1139/f72-055.
- Ngugi, D. K., Miyake, S., Cahill, M., Vinu, M., Hackmann, T. J., Blom, J., Tietbohl, M. D., Berumen, M. L. and Stingl, U. (2017). Genomic diversification of giant enteric symbionts reflects host dietary lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E7592–E7601. doi: 10.1073/pnas.1703070114.
- Ni, J., Yan, Q., Yu, Y. and Zhang, T. (2014). Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism. *FEMS Microbiology Ecology* **87**, 704–714. doi: 10.1111/1574-6941.12256.
- Nicolet, K. J., Chong-Seng, K. M., Pratchett, M. S., Willis, B. L. and Hoogenboom, M. O. (2018). Predation scars may influence host susceptibility to pathogens: evaluating the role of corallivores as vectors of coral disease. *Scientific Reports* **8**, 5258. doi: 10.1038/s41598-018-23361-y.
- Nielsen, S., Wilkes Walburn, J., Vergés, A., Thomas, T. and Egan, S. (2017). Microbiome patterns across the gastrointestinal tract of the rabbitfish *Siganus fuscescens*. *PeerJ* **5**,

e3317. doi: 10.7717/peerj.3317.

- Nussbaumer, A. D., Fisher, C. R. and Bright, M.** (2006). Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* **441**, 345–348. doi: 10.1038/nature04793.
- Nyholm, S. V. and McFall-Ngai, M.** (2004). The winnowing: establishing the squid–vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 632–642. doi: 10.1038/nrmicro957.
- Nyholm, S. V., Stewart, J. J., Ruby, E. G. and McFall-Ngai, M. J.** (2009). Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environmental Microbiology* **11**, 483–493. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01788.x.

-O-

- Oh, W. T., Jun, J. W., Giri, S. S., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. G., Kim, S. W., Han, S. J., Kwon, J. and Park, S. C.** (2019). *Staphylococcus xylosus* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) As a Primary Pathogenic Cause of Eye Protrusion and Mortality. *Microorganisms* **7**, 330. doi: 10.3390/microorganisms7090330.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Michael, F., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Peter, S., M., H., H., S., Eduard, S. and Helene, W.** (2019). *vegan: Community Ecology Package*.
- Oliveira, N. M., Niehus, R. and Foster, K. R.** (2014). Evolutionary limits to cooperation in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 17941–17946. doi: 10.1073/pnas.1412673111.
- Olivier, G., Lallier, R. and Larivière, S.** (1981). A toxigenic profile of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* isolated from fish. *Canadian Journal of Microbiology* **27**, 330–333. doi: 10.1139/m81-050.
- Oremland, R. S.** (1979). Methanogenic activity in plankton samples and fish intestines A mechanism for in situ methanogenesis in oceanic surface waters. *Limnology and Oceanography* **24**, 1136–1141. doi: 10.4319/lo.1979.24.6.1136.
- Osawa, R., Blanshard, W. and Ocallaghan, P.** (1993). Microbiological Studies of the Intestinal Microflora of the Koala, *Phascolarctos Cinereus* .2. Pap, a Special Maternal Feces Consumed by Juvenile Koalas. *Australian Journal of Zoology* **41**, 611. doi: 10.1071/ZO9930611.
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M. and Belzer, C.** (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**,. doi: 10.3389/fcimb.2012.00104.
- Ovreås, L., Forney, L., Daae, F. L. and Torsvik, V.** (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* **63**, 3367–73. doi: 10.1128/aem.63.9.3367-3373.1997.
- Ozawa, G., Shimamura, S., Takaki, Y., Takishita, K., Ikuta, T., Barry, J. P., Maruyama, T., Fujikura, K. and Yoshida, T.** (2017). Ancient Occasional Host Switching of Maternally Transmitted Bacterial Symbionts of Chemosynthetic Vesicomysid Clams. *Genome Biology and Evolution* **9**, 2226–2236. doi: 10.1093/gbe/evx166.

-P-

- Pal, V. K., Bandyopadhyay, P. and Singh, A.** (2018). Hydrogen sulfide in physiology and

- pathogenesis of bacteria and viruses. *IUBMB Life* **70**, 393–410. doi: 10.1002/iub.1740.
- Parada, A. E., Needham, D. M. and Fuhrman, J. A.** (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* **18**, 1403–1414. doi: 10.1111/1462-2920.13023.
- Paradis, E. and Schliep, K.** (2019). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* **35**, 526–528. doi: 10.1093/bioinformatics/bty633.
- Parata, L., Nielsen, S., Xing, X., Thomas, T., Egan, S. and Vergés, A.** (2019). Age, gut location and diet impact the gut microbiome of a tropical herbivorous surgeonfish. *FEMS Microbiology Ecology*. doi: 10.1093/femsec/fiz179.
- Parravicini, V., Casey, J. M., Schiettekatte, N. M. D., Brandl, S. J., Pozas-Schacre, C., Carlot, J., Edgar, G. J., Graham, N. A. J., Harmelin-Vivien, M., Kulbicki, M., Strona, G. and Stuart-Smith, R. D.** (2020). Delineating reef fish trophic guilds with global gut content data synthesis and phylogeny. *PLoS Biology* **18**,. doi: 10.1371/journal.pbio.3000702.
- Parris, D. J., Brooker, R. M., Morgan, M. A., Dixon, D. L. and Stewart, F. J.** (2016). Whole gut microbiome composition of damselfish and cardinalfish before and after reef settlement. *PeerJ* **4**, e2412. doi: 10.7717/peerj.2412.
- Parris, D. J., Morgan, M. M. and Stewart, F. J.** (2019). Feeding rapidly alters microbiome composition and gene transcription in the clownfish gut. *Applied and Environmental Microbiology* **85**, 1–15. doi: 10.1128/AEM.02479-18.
- Patra, A., Park, T., Kim, M. and Yu, Z.** (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **8**, 1–18. doi: 10.1186/s40104-017-0145-9.
- Pausan, M. R., Csorba, C., Singer, G., Till, H., Schöpf, V., Santigli, E., Klug, B., Högenauer, C., Blohs, M. and Moissl-Eichinger, C.** (2019). Exploring the Archaeome: Detection of Archaeal Signatures in the Human Body. *Frontiers in Microbiology* **10**,. doi: 10.3389/fmicb.2019.02796.
- Pečur Kazazić, S., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Florio, D., Fioravanti, M., Babić, S. and Čož-Rakovac, R.** (2019). Fish photobacteriosis-The importance of rapid and accurate identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* **42**, 1201–1209. doi: 10.1111/jfd.13022.
- Pedrós-Alió, C. and Manrubia, S.** (2016). The vast unknown microbial biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 6585–6587. doi: 10.1073/pnas.1606105113.
- Peixoto, R. S., Rosado, P. M., Leite, D. C. de A., Rosado, A. S. and Bourne, D. G.** (2017). Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience. *Frontiers in Microbiology* **8**,. doi: 10.3389/fmicb.2017.00341.
- Pereira, O., Hochart, C., Auguet, J. C., Debroas, D. and Galand, P. E.** (2019). Genomic ecology of Marine Group II, the most common marine planktonic Archaea across the surface ocean. *MicrobiologyOpen* **8**,. doi: 10.1002/mbo3.852.
- Pérez-Barbería, F. J.** (2017). Scaling methane emissions in ruminants and global estimates in wild populations. *Science of The Total Environment* **579**, 1572–1580. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.175.
- Petersen, J. M., Kemper, A., Gruber-Vodicka, H., Cardini, U., van der Geest, M., Kleiner, M., Bulgheresi, S., Mußmann, M., Herbold, C., Seah, B. K. B., Antony, C. P., Liu, D., Belitz, A. and Weber, M.** (2017). Chemosynthetic symbionts of marine invertebrate animals are capable of nitrogen fixation. *Nature Microbiology* **2**, 16195. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.195.

- Peterson, C. H. and Lubchenco, J.** (1997). Part III: Services Supplied by Major Biomes. In *Nature's Services: Societal Dependence On Natural Ecosystems* (ed. Daily, G. C.), pp. 177–194. Island Press, Washington & Covelo.
- Peterson, D. A., McNulty, N. P., Guruge, J. L. and Gordon, J. I.** (2007). IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis. *Cell Host & Microbe* **2**, 328–339. doi: 10.1016/j.chom.2007.09.013.
- Pimentel, M., Lin, H. C., Enayati, P., van den Burg, B., Lee, H.-R., Chen, J. H., Park, S., Kong, Y. and Conklin, J.** (2006). Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, G1089–G1095. doi: 10.1152/ajpgi.00574.2004.
- Pinsky, M. L., Eikeset, A. M., McCauley, D. J., Payne, J. L. and Sunday, J. M.** (2019). Greater vulnerability to warming of marine versus terrestrial ectotherms. *Nature* **569**, 108–111. doi: 10.1038/s41586-019-1132-4.
- Pittet, D., Allegranzi, B., Sax, H., Dharan, S., Pessoa-Silva, C. L., Donaldson, L. and Boyce, J. M.** (2006). Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *The Lancet Infectious Diseases* **6**, 641–652. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70600-4.
- Polanco Fernández, A., Marques, V., Fopp, F., Juhel, J., Borrero-Pérez, G. H., Cheutin, M., Dejean, T., González Corredor, J. D., Acosta-Chaparro, A., Hocdé, R., Eme, D., Maire, E., Spescha, M., Valentini, A., Manel, S., Mouillot, D., Albouy, C. and Pellissier, L.** (2021). Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes. *Environmental DNA* **3**, 142–156. doi: 10.1002/edn3.140.
- Polidoro, B. A., Elfes, C. T., Sanciangco, J. C., Pippard, H. and Carpenter, K. E.** (2011). Conservation Status of Marine Biodiversity in Oceania: An Analysis of Marine Species on the IUCN Red List of Threatened Species. *Journal of Marine Biology* **2011**, 1–14. doi: 10.1155/2011/247030.
- Pollock, F. J., McMinds, R., Smith, S., Bourne, D. G., Willis, B. L., Medina, M., Thurber, R. V. and Zaneveld, J. R.** (2018). Coral-associated bacteria demonstrate phyllosymbiosis and cophylogeny. *Nature Communications* **9**, 1–13. doi: 10.1038/s41467-018-07275-x.
- Polónia, A. R. M., Cleary, D. F. R., Freitas, R., Gomes, N. C. M. and de Voogd, N. J.** (2017). Archaeal and bacterial communities of Xestospongia testudinaria and sediment differ in diversity, composition and predicted function in an Indonesian coral reef environment. *Journal of Sea Research* **119**, 37–53. doi: 10.1016/j.seares.2016.10.007.
- Polunin, N. V. C. and Roberts, C. M.** (1996). *Reef Fisheries*. ed. Polunin, N. V. C. and Robert, C. Chapman & Hall, London.
- Prado, S. S. and Zucchi, T. D.** (2012). Host-Symbiont Interactions for Potentially Managing Heteropteran Pests. *Psyche: A Journal of Entomology* **2012**, 1–9. doi: 10.1155/2012/269473.
- Pratchett, M. S., Hoey, A. S., Wilson, S. K., Messmer, V. and Graham, N. A. J.** (2011). Changes in Biodiversity and Functioning of Reef Fish Assemblages following Coral Bleaching and Coral Loss. *Diversity* **3**, 424–452. doi: 10.3390/d3030424.
- Pratte, Z. A., Besson, M., Hollman, R. D. and Stewarta, F. J.** (2018). The gills of reef fish support a distinct microbiome influenced by hosts specific factors. *Applied and Environmental Microbiology* **84**, 1–15. doi: 10.1128/AEM.00063-18.
- Price, S. A., Wainwright, P. C., Bellwood, D. R., Kazancioglu, E., Collar, D. C. and Near, T. J.** (2010). Functional innovations and morphological diversification in parrotfish. *Evolution* **64**, 3057–3068. doi: 10.1111/j.1558-5646.2010.01036.x.
- Probst, A. J., Auerbach, A. K. and Moissl-Eichinger, C.** (2013). Archaea on Human Skin.

PLoS ONE **8**, e65388. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065388>.

Pulliam, H. R. (1988). Sources, Sinks, and Population Regulation. *The American Naturalist* **132**, 652–661. doi: [10.1086/284880](https://doi.org/10.1086/284880).

-Q-

Qi, X.-Z., Xue, M.-Y., Yang, S.-B., Zha, J.-W., Wang, G.-X. and Ling, F. (2017). Ammonia exposure alters the expression of immune-related and antioxidant enzymes-related genes and the gut microbial community of crucian carp (*Carassius auratus*). *Fish & Shellfish Immunology* **70**, 485–492. doi: [10.1016/j.fsi.2017.09.043](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.043).

Qian, J., Hospodsky, D., Yamamoto, N., Nazaroff, W. W. and Peccia, J. (2012). Size-resolved emission rates of airborne bacteria and fungi in an occupied classroom. *Indoor Air* **22**, 339–351. doi: [10.1111/j.1600-0668.2012.00769.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2012.00769.x).

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**, 590–596. doi: [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219).

Quimbayo, J. P., Dias, M. S., Kulbicki, M., Mendes, T. C., Lamb, R. W., Johnson, A. F., Aburto-Oropeza, O., Alvarado, J. J., Bocos, A. A., Ferreira, C. E. L., Garcia, E., Luiz, O. J., Mascareñas-Osorio, I., Pinheiro, H. T., Rodriguez-Zaragoza, F., Salas, E., Zapata, F. A. and Floeter, S. R. (2019). Determinants of reef fish assemblages in tropical Oceanic islands. *Ecography* **42**, 77–87. doi: [10.1111/ecog.03506](https://doi.org/10.1111/ecog.03506).

-R-

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing.

Rabosky, D. L., Chang, J., Title, P. O., Cowman, P. F., Sallan, L., Friedman, M., Kaschner, K., Garilao, C., Near, T. J., Coll, M. and Alfaro, M. E. (2018). An inverse latitudinal gradient in speciation rate for marine fishes. *Nature* **559**, 392–395. doi: [10.1038/s41586-018-0273-1](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0273-1).

Raimundo, I., Silva, R., Meunier, L., Valente, S. M., Lago-Lestón, A., Keller-Costa, T. and Costa, R. (2021). Functional metagenomics reveals differential chitin degradation and utilization features across free-living and host-associated marine microbiomes. *Microbiome* **9**, 1–18. doi: [10.1186/s40168-020-00970-2](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00970-2).

Rambo, I. M., Dombrowski, N., Constant, L., Erdner, D. and Baker, B. J. (2020). Metabolic relationships of uncultured bacteria associated with the microalgae *Gambierdiscus*. *Environmental Microbiology* **22**, 1764–1783. doi: [10.1111/1462-2920.14878](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14878).

Ramirez, R. F. and Dixon, B. A. (2003). Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscar (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* **227**, 417–426. doi: [10.1016/S0044-8486\(03\)00520-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00520-9).

Ramsby, B. D., Hoogenboom, M. O., Smith, H. A., Whalan, S. and Webster, N. S. (2018). The bioeroding sponge *Cliona orientalis* will not tolerate future projected ocean warming. *Scientific Reports* **8**, 8302. doi: [10.1038/s41598-018-26535-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26535-w).

Rappé, M. S. and Giovannoni, S. J. (2003). The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology* **57**, 369–394. doi: [10.1146/annurev.micro.57.030502.090759](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759).

- Rasher, D. B., Hoey, A. S. and Hay, M. E.** (2013). Consumer diversity interacts with prey defenses to drive ecosystem function. *Ecology* **94**, 1347–1358. doi: 10.1890/12-0389.1.
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E. and Stahl, D. A.** (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1232–1240. doi: 10.1128/aem.60.4.1232-1240.1994.
- Rawls, J. F., Samuel, B. S. and Gordon, J. I.** (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 4596–4601. doi: 10.1073/pnas.0400706101.
- Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Ley, R. E. and Gordon, J. I.** (2006). Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell* **127**, 423–433. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.043.
- Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Goodman, A. L., Trent, C. M. and Gordon, J. I.** (2007). In vivo imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebrafish gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7622–7627. doi: 10.1073/pnas.0702386104.
- Ray, A. K., Ghosh, K. and Ringø, E.** (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition* **18**, 465–492. doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x.
- Raymann, K., Moeller, A. H., Goodman, A. L. and Ochman, H.** (2017). Unexplored Archaeal Diversity in the Great Ape Gut Microbiome. *mSphere* **2**, 1–12. doi: 10.1128/msphere.00026-17.
- Raymundo, L. J., Halford, A. R., Maypa, A. P. and Kerr, A. M.** (2009). Functionally diverse reef-fish communities ameliorate coral disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 17067–17070. doi: 10.1073/pnas.0900365106.
- Reber, S. O., Siebler, P. H., Donner, N. C., Morton, J. T., Smith, D. G., Kopelman, J. M., Lowe, K. R., Wheeler, K. J., Fox, J. H., Hassell, J. E., Greenwood, B. N., Jansch, C., Lechner, A., Schmidt, D., Uschold-Schmidt, N., Füchsl, A. M., Langgartner, D., Walker, F. R., Hale, M. W., Lopez Perez, G., Van Treuren, W., González, A., Halweg-Edwards, A. L., Fleshner, M., Raison, C. L., Rook, G. A., Peddada, S. D., Knight, R. and Lowry, C. A.** (2016). Immunization with a heat-killed preparation of the environmental bacterium *Mycobacterium vaccae* promotes stress resilience in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E3130–E3139. doi: 10.1073/pnas.1600324113.
- Rebollar, E. A., Hughey, M. C., Medina, D., Harris, R. N., Ibáñez, R. and Belden, L. K.** (2016). Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The ISME Journal* **10**, 1682–1695. doi: 10.1038/ismej.2015.234.
- Reed, G. B. and Spence, C. M.** (1929). The intestinal and slime flora of the haddock: a preliminary report. *Contributions to Canadian Biology and Fisheries* **4**, 257–264. doi: 10.1139/f29-019.
- Reid, K. M., Patel, S., Robinson, A. J., Bu, L., Jarungsriapisit, J., Moore, L. J. and Salinas, I.** (2017). Salmonid alphavirus infection causes skin dysbiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *PLOS ONE* **12**, e0172856. doi: 10.1371/journal.pone.0172856.
- Rekecki, A., Dierckens, K., Laureau, S., Boon, N., Bossier, P. and Van den Broeck, W.** (2009). Effect of germ-free rearing environment on gut development of larval sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* **293**, 8–15. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.001.
- Relman, D. A.** (2012). The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutrition Reviews* **70**, S2–S9. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x.
- Renema, W., Bellwood, D. R., Braga, J. C., Bromfield, K., Hall, R., Johnson, K. G., Lunt,**

- P., Meyer, C. P., McMonagle, L. B., Morley, R. J., O'Dea, A., Todd, J. A., Wesselingh, F. P., Wilson, M. E. J. and Pandolfi, J. M. (2008). Hopping Hotspots: Global Shifts in Marine Biodiversity. *Science* **321**, 654–657. doi: 10.1126/science.1155674.
- Reverter, M., Sasal, P., Suzuki, M. T., Raviglione, D., Inguibert, N., Pare, A., Banaigs, B., Voisin, S. N., Bulet, P. and Tapissier-Bontemps, N. (2020). Insights into the Natural Defenses of a Coral Reef Fish Against Gill Ectoparasites: Integrated Metabolome and Microbiome Approach. *Metabolites* **10**, 227. doi: 10.3390/metabo10060227.
- Richards, G. P., Kingham, B. F., Shevchenko, O., Watson, M. A. and Needleman, D. S. (2018). Complete Genome Sequence of *Vibrio coralliilyticus* RE22, a Marine Bacterium Pathogenic toward Larval Shellfish. *Microbiology Resource Announcements* **7**,. doi: 10.1128/MRA.01332-18.
- Rimmer, D. W. (1986). Changes in diet and the development of microbial digestion in juvenile buffalo bream, *Kyphosus cornelii*. *Marine Biology* **92**, 443–448. doi: 10.1007/BF00392685.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* **31**, 603–632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- Ringø, E., Strøm, E. and Tabachek, J.-A. (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research* **26**, 773–789. doi: 10.1111/j.1365-2109.1995.tb00870.x.
- Ringø, E., Lødemel, J. B., Myklebust, R., Jensen, L., Lund, V., Mayhew, T. M. and Olsen, R. E. (2002). The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Aquaculture Research* **33**, 591–606. doi: 10.1046/j.1365-2109.2002.00697.x.
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Mayhew, T. M. and Olsen, R. E. (2006). The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research* **37**, 891–897. doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01509.x.
- Ringø, E., Zhou, Z., Olsen, R. E. and Song, S. K. (2012). Use of chitin and krill in aquaculture - the effect on gut microbiota and the immune system: A review. *Aquaculture Nutrition* **18**, 117–131. doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00919.x.
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., Olsen, R. E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L. L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S. and Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition* **22**, 219–282. doi: 10.1111/anu.12346.
- Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. Van, Beck, B. R. and Song, S. K. (2018). Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update. *Frontiers in Microbiology* **9**,. doi: 10.3389/fmicb.2018.01818.
- Roberts, C. M. (1995). Effects of Fishing on the Ecosystem Structure of Coral Reefs. *Conservation Biology* **9**, 988–995. doi: 10.1046/j.1523-1739.1995.9050988.x.
- Robinson, D. F. and Foulds, L. R. (1981). Comparison of phylogenetic trees. *Mathematical Biosciences* **53**, 131–147. doi: 10.1016/0025-5564(81)90043-2.
- Robles-Malagamba, M. J., Walsh, M. T., Ahasan, M. S., Thompson, P., Wells, R. S., Jobin, C., Fodor, A. A., Winglee, K. and Waltzek, T. B. (2020). Characterization of the bacterial microbiome among free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Heliyon* **6**, e03944. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03944.
- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy, D. M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K. and Rawls, J. F. (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME Journal* **5**, 1595–1608. doi: 10.1038/ismej.2011.38.
- Romero, J. and Navarrete, P. (2006). 16S rDNA-Based Analysis of Dominant Bacterial

- Populations Associated with Early Life Stages of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology* **51**, 422–430.
- Romero, J., Ringø, E. and Merrifield, D. L.** (2014). The Gut Microbiota of Fish. In *Aquaculture Nutrition*, pp. 75–100. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK doi: 10.1002/9781118897263.ch4.
- Rosado, D., Pérez-Losada, M., Severino, R., Cable, J. and Xavier, R.** (2019). Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **500**, 57–64. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.063.
- Rosebury, T.** (1962). *Microorganisms indigenous to man*, McGraw-Hill. New York, NY.
- Rosebury, T.** (1969). *Life on man*. Viking.
- Ross, E. M., Moate, P. J., Marett, L. C., Cocks, B. G. and Hayes, B. J.** (2013). Metagenomic Predictions: From Microbiome to Complex Health and Environmental Phenotypes in Humans and Cattle. *PLoS ONE* **8**, e73056. doi: 10.1371/journal.pone.0073056.
- Ross, A. A., Rodrigues Hoffmann, A. and Neufeld, J. D.** (2019). The skin microbiome of vertebrates. *Microbiome* **7**, 79. doi: 10.1186/s40168-019-0694-6.
- Roughgarden, J., Gilbert, S. F., Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I. and Lloyd, E. A.** (2018). Holobionts as Units of Selection and a Model of Their Population Dynamics and Evolution. *Biological Theory* **13**, 44–65. doi: 10.1007/s13752-017-0287-1.
- Round, J. L. and Mazmanian, S. K.** (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* **9**, 313–323. doi: 10.1038/nri2515.
- Rubino, J. G., Zimmer, A. M. and Wood, C. M.** (2014). An in vitro analysis of intestinal ammonia handling in fasted and fed freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Physiology B* **184**, 91–105. doi: 10.1007/s00360-013-0781-0.
- Ruiz-Rodríguez, M., Scheifler, M., Sanchez-Brosseau, S., Magnanou, E., West, N., Suzuki, M., Duperron, S. and Desdevises, Y.** (2020). Host Species and Body Site Explain the Variation in the Microbiota Associated to Wild Sympatric Mediterranean Teleost Fishes. *Microbial Ecology* **80**, 212–222. doi: 10.1007/s00248-020-01484-y.

-S-

- Sachs, J. L., Mueller, U. G., Wilcox, T. P. and Bull, J. J.** (2004). The Evolution of Cooperation. *The Quarterly Review of Biology* **79**, 135–160. doi: 10.1086/383541.
- Sachs, J. L., Russell, J. E., Lii, Y. E., Black, K. C., Lopez, G. and Patil, A. S.** (2010). Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont. *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 1919–1927. doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02056.x.
- Sachs, J. L., Skophammer, R. G. and Regus, J. U.** (2011). Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10800–10807. doi: 10.1073/pnas.1100304108.
- Sadovy, Y.** (2005). Trouble on the reef: the imperative for managing vulnerable and valuable fisheries. *Fish and Fisheries* **6**, 167–185. doi: 10.1111/j.1467-2979.2005.00186.x.
- Saengkerdsut, S. and Rieke, S. C.** (2014). Ecology and characteristics of methanogenic archaea in animals and humans. *Critical Reviews in Microbiology* **40**, 97–116. doi: 10.3109/1040841X.2013.763220.
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J. and Walker, A. W.** (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology* **12**, 1–12. doi: 10.1186/s12915-014-0087-z.

- Sampson, T. R. and Mazmanian, S. K.** (2015). Control of Brain Development, Function, and Behavior by the Microbiome. *Cell Host & Microbe* **17**, 565–576. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.011.
- Sanders, J. G., Powell, S., Kronauer, D. J. C., Vasconcelos, H. L., Frederickson, M. E. and Pierce, N. E.** (2014). Stability and phylogenetic correlation in gut microbiota: lessons from ants and apes. *Molecular Ecology* **23**, 1268–1283. doi: 10.1111/mec.12611.
- Sanders, J. G., Beichman, A. C., Roman, J., Scott, J. J., Emerson, D., McCarthy, J. J. and Girguis, P. R.** (2015). Baleen whales host a unique gut microbiome with similarities to both carnivores and herbivores. *Nature Communications* **6**, 8285. doi: 10.1038/ncomms9285.
- Sapp, J.** (1994). Evolution by Association: A History of Symbiosis. In *Evolution by Association: A History of Symbiosis* (ed. Oxford University Press Inc), pp. 3–14.
- Scheifler, M., Ruiz-Rodríguez, M., Sanchez-Brosseau, S., Magnanou, E., Suzuki, M. T., West, N., Duperron, S. and Desdevises, Y.** (2019). Characterization of ecto- And endoparasite communities of wild Mediterranean teleosts by a metabarcoding approach. *PLoS ONE* **14**, 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0221475.
- Schiettekatte, N. M. D., Brandl, S. J. and Casey, J. M.** (2020). fishualize: color palettes based on fish species. R package v0.2.0.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. and Weber, C. F.** (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09.
- Schluter, J. and Foster, K. R.** (2012). The Evolution of Mutualism in Gut Microbiota Via Host Epithelial Selection. *PLoS Biology* **10**, e1001424. doi: 10.1371/journal.pbio.1001424.
- Schoenborn, L., Abdollahi, H., Tee, W., Dyal-Smith, M. and Janssen, P. H.** (2001). A Member of the Delta Subgroup of Proteobacteria from a Pyogenic Liver Abscess Is a Typical Sulfate Reducer of the Genus *Desulfovibrio*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 787–790. doi: 10.1128/JCM.39.2.787-790.2001.
- Scott, J. J., Adam, T. C., Duran, A., Burkepile, D. E. and Rasher, D. B.** (2020). Intestinal microbes: an axis of functional diversity among large marine consumers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**, 20192367. doi: 10.1098/rspb.2019.2367.
- Scupham, A. J., Patton, T. G., Bent, E. and Bayles, D. O.** (2008). Comparison of the Cecal Microbiota of Domestic and Wild Turkeys. *Microbial Ecology* **56**, 322–331. doi: 10.1007/s00248-007-9349-4.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. and Huttenhower, C.** (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology* **12**, R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- Segata, N., Haake, S., Mannon, P., Lemon, K. P., Waldron, L., Gevers, D., Huttenhower, C. and Izard, J.** (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biology* **13**, R42. doi: 10.1186/gb-2012-13-6-r42.
- Sehnal, L., Brammer-Robbins, E., Wormington, A. M., Blaha, L., Bisesi, J., Larkin, I., Martyniuk, C. J., Simonin, M. and Adamovsky, O.** (2021). Microbiome Composition and Function in Aquatic Vertebrates: Small Organisms Making Big Impacts on Aquatic Animal Health. *Frontiers in Microbiology* **12**,. doi: 10.3389/fmicb.2021.567408.
- Sekar, R., Kaczmarek, L. and Richardson, L.** (2008). Microbial community composition of black band disease on the coral host *Siderastrea siderea* from three regions of the wider

- Caribbean. *Marine Ecology Progress Series* **362**, 85–98. doi: 10.3354/meps07496.
- Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R.** (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology* **14**, e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Sera, H. and Ishida, Y.** (1972). Bacterial Flora in the Digestive Tracts of Marine Fish-II. *Nippon Suisan Gakkaishi* **38**, 633–637. doi: 10.2331/suisan.38.633.
- Shah, A. M., Ma, J., Wang, Z., Hu, R., Wang, X., Peng, Q., Amevor, F. K. and Goswami, N.** (2020). Production of Hydrogen Sulfide by Fermentation in Rumen and Its Impact on Health and Production of Animals. *Processes* **8**, 1169. doi: 10.3390/pr8091169.
- Shmida, A. and Wilson, M. V.** (1985). Biological Determinants of Species Diversity. *Journal of Biogeography* **12**, 1. doi: 10.2307/2845026.
- Shu, Y., Hong, P., Tang, D., Qing, H., Omondi Donde, O., Wang, H., Xiao, B. and Wu, H.** (2019). Comparison of intestinal microbes in female and male Chinese concave-eared frogs (*Odorrana tormota*) and effect of nematode infection on gut bacterial communities. *MicrobiologyOpen* **8**,. doi: 10.1002/mbo3.749.
- Siqueira, A. C., Morais, R. A., Bellwood, D. R. and Cowman, P. F.** (2020). Trophic innovations fuel reef fish diversification. *Nature Communications* **11**, 1–11. doi: 10.1038/s41467-020-16498-w.
- Skovgaard, A., Meneses, I. and Angélico, M. M.** (2009). Identifying the lethal fish egg parasite *Ichthyodinium chabaudi* as a member of Marine Alveolate Group I. *Environmental microbiology* **11**, 2030–41. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01924.x.
- Smith, T. B., Wahl, D. H. and Mackie, R. I.** (1996). Volatile fatty acids and anaerobic fermentation in temperate piscivorous and omnivorous freshwater fish. *Journal of Fish Biology* **48**, 829–841. doi: 10.1111/j.1095-8649.1996.tb01479.x.
- Smith, S. A., Robbins, L. W. and Steiert, J. G.** (1998). Isolation and Characterization of a Chitinase from the Nine-Banded Armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Journal of Mammalogy* **79**, 486–491. doi: 10.2307/1382979.
- Smith, J. E., Shaw, M., Edwards, R. A., Obura, D., Pantos, O., Sala, E., Sandin, S. A., Smriga, S., Hatay, M. and Rohwer, F. L.** (2006). Indirect effects of algae on coral: algae-mediated, microbe-induced coral mortality. *Ecology Letters* **9**, 835–845. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00937.x.
- Smriga, S., Sandin, S. A. and Azam, F.** (2010). Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces. *FEMS Microbiology Ecology* **73**, 31–42. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00879.x.
- Solden, L. M., Hoyt, D. W., Collins, W. B., Plank, J. E., Daly, R. A., Hildebrand, E., Beavers, T. J., Wolfe, R., Nicora, C. D., Purvine, S. O., Carstensen, M., Lipton, M. S., Spalinger, D. E., Firkins, J. L., Wolfe, B. A. and Wrighton, K. C.** (2017). New roles in hemicellulosic sugar fermentation for the uncultivated Bacteroidetes family BS11. *The ISME Journal* **11**, 691–703. doi: 10.1038/ismej.2016.150.
- Söllinger, A. and Urich, T.** (2019). Methylophilic methanogens everywhere — physiology and ecology of novel players in global methane cycling. *Biochemical Society Transactions* **47**, 1895–1907. doi: 10.1042/BST20180565.
- Song, W., Li, L., Huang, H., Jiang, K., Zhang, F., Chen, X., Zhao, M. and Ma, L.** (2016). The Gut Microbial Community of Antarctic Fish Detected by 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *BioMed Research International* **2016**, 1–7. doi: 10.1155/2016/3241529.
- Song, S. J., Sanders, J. G., Delsuc, F., Metcalf, J., Amato, K., Taylor, M. W., Mazel, F., Lutz, H. L., Winker, K., Graves, G. R., Humphrey, G., Gilbert, J. A., Hackett, S. J., White, K. P., Skeen, H. R., Kurtis, S. M., Withrow, J., Braile, T., Miller, M., McCracken, K. G., Maley, J. M., Ezenwa, V. O., Williams, A., Blanton, J. M., McKenzie, V. J. and Knight, R.** (2020). Comparative analyses of vertebrate gut

- microbiomes reveal convergence between birds and bats. *mBio* **11**, 1–14. doi: 10.1128/mBio.02901-19.
- Spor, A., Koren, O. and Ley, R.** (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 279–290. doi: 10.1038/nrmicro2540.
- Sprockett, D., Fukami, T. and Relman, D. A.** (2018). Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **15**, 197–205. doi: 10.1038/nrgastro.2017.173.
- St-Pierre, B. and Wright, A.-D. G.** (2013). Diversity of gut methanogens in herbivorous animals. *Animal* **7**, 49–56. doi: 10.1017/S1751731112000912.
- Stahl, D. A. and Amann, R.** (1991). Development and Application of Nucleic Acid Probes in Bacterial Systematics. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M.), pp. 205–248. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Stanley Jr., G. D.** (2006). ECOLOGY: Photosymbiosis and the Evolution of Modern Coral Reefs. *Science* **312**, 857–858. doi: 10.1126/science.1123701.
- Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V. and Gordon, J. I.** (2002). Nonlinear partial differential equations and applications: Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 15451–15455. doi: 10.1073/pnas.202604299.
- Steen, A. D., Crits-Christoph, A., Carini, P., DeAngelis, K. M., Fierer, N., Lloyd, K. G. and Cameron Thrash, J.** (2019). High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *The ISME Journal* **13**, 3126–3130. doi: 10.1038/s41396-019-0484-y.
- Steinberg, L. M. and Regan, J. M.** (2008). Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6663–6671. doi: 10.1128/AEM.00553-08.
- Stevens, J., Jackson, R. and Olson, J.** (2016). Bacteria associated with lionfish (*Pterois volitans*/miles complex) exhibit antibacterial activity against known fish pathogens. *Marine Ecology Progress Series* **558**, 167–180. doi: 10.3354/meps11789.
- Stöver, B. C. and Müller, K. F.** (2010). TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* **11**, 7. doi: 10.1186/1471-2105-11-7.
- Strobel, S., Roswag, A., Becker, N. I., Trenczek, T. E. and Encarnação, J. A.** (2013). Insectivorous Bats Digest Chitin in the Stomach Using Acidic Mammalian Chitinase. *PLoS ONE* **8**, e72770. doi: 10.1371/journal.pone.0072770.
- Su, Z., Dai, T., Tang, Y., Tao, Y., Huang, B., Mu, Q. and Wen, D.** (2018). Sediment bacterial community structures and their predicted functions implied the impacts from natural processes and anthropogenic activities in coastal area. *Marine Pollution Bulletin* **131**, 481–495. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.04.052.
- Sugita, H., Miyajima, C. and Deguchi, Y.** (1990). The vitamin B12 - producing ability of the intestinal bacteria isolated from tilapia and channel catfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* **56**, 701.
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O'Connor, M. P., Rosen, G. L., Knight, R., Kilham, S. S. and Russell, J. A.** (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Molecular Ecology* **21**, 3363–3378. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x.
- Sunagawa, S., Coelho, L. P., Chaffron, S., Kultima, J. R., Labadie, K., Salazar, G., Djahanschiri, B., Zeller, G., Mende, D. R., Alberti, A., Cornejo-castillo, F. M.,**

- Costea, P. I., Cruaud, C., Ovidio, F., Engelen, S., Ferrera, I., Gasol, J. M., Guidi, L., Hildebrand, F., Kokoszka, F. and Lepoivre, C. (2015).** Structure and function of the global ocean microbiome. *Science* **348**, 1–10.
- Sutton, D. C. and Clements, K. D. (1988).** Aerobic, heterotrophic gastrointestinal microflora of tropical marine fishes. In *Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium*, pp. 185–190. Townsville.
- Suzuki, T. A. (2017).** Links between natural variation in the microbiome and host fitness in wild mammals. *Integrative and Comparative Biology* **57**, 756–769. doi: 10.1093/icb/ix104.
- Sylvain, F.-É. and Derome, N. (2017).** Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Scientific Reports* **7**, 5263. doi: 10.1038/s41598-017-05662-w.
- Sylvain, F.-É., Cheaib, B., Llewellyn, M., Gabriel Correia, T., Barros Fagundes, D., Luis Val, A. and Derome, N. (2016).** pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Scientific Reports* **6**, 32032. doi: 10.1038/srep32032.

-T-

- Takai, K. and Horikoshi, K. (2000).** Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 5066–5072. doi: 10.1128/AEM.66.11.5066-5072.2000.
- Tapio, I., Snelling, T. J., Strozzi, F. and Wallace, R. J. (2017).** The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **8**, 1–11. doi: 10.1186/s40104-017-0141-0.
- Taquet, M. and Delinguer, A. (2007).** *Poissons de l’Océan Indien et de la Mer Rouge*, Quae. Versailles doi: 978-2-7592-0045-0.
- Tarnecki, A. M., Patterson, W. F. and Arias, C. R. (2016).** Microbiota of wild-caught Red Snapper *Lutjanus campechanus*. *BMC Microbiology* **16**, 1–10. doi: 10.1186/s12866-016-0864-7.
- Tarnecki, A. M., Burgos, F. A., Ray, C. L. and Arias, C. R. (2017).** Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *Journal of Applied Microbiology* **123**, 2–17. doi: 10.1111/jam.13415.
- Teyssier, A., Rouffaer, L. O., Saleh Hudin, N., Strubbe, D., Matthysen, E., Lens, L. and White, J. (2018).** Inside the guts of the city: Urban-induced alterations of the gut microbiota in a wild passerine. *Science of The Total Environment* **612**, 1276–1286. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.035.
- Thacker, R. W. and Freeman, C. J. (2012).** *Sponge–Microbe Symbioses*. pp. 57–111. doi: 10.1016/B978-0-12-394283-8.00002-3.
- Thaiss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., Abramson, L., Katz, M. N., Korem, T., Zmora, N., Kuperman, Y., Biton, I., Gilad, S., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E. and Elinav, E. (2014).** Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. *Cell* **159**, 514–529. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.048.
- The Human Microbiome Project Consortium, . (2012).** Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214. doi: 10.1038/nature11234.
- Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., Cryan, J. F., Gilbert, S. F., Goodnight, C. J., Lloyd, E. A., Sapp, J., Vandenkoornhuys, P., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. and Bordenstein, S. R.**

- (2016). Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* **1**, e00028-16. doi: 10.1128/mSystems.00028-16.
- Thomas, C., Desmond-LeQuemener, E., Gribaldo, S. and Borrel, G.** (2021). Factors shaping the abundance and diversity of archaea in the animal gut (Preprint). *Research square*.
- Thurber, R. V., Willner-Hall, D., Rodriguez-Mueller, B., Desnues, C., Edwards, R. A., Angly, F., Dinsdale, E., Kelly, L. and Rohwer, F.** (2009). Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environmental Microbiology* **11**, 2148–2163. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01935.x.
- Thurber, R. V., Mydlarz, L. D., Brandt, M., Harvell, D., Weil, E., Raymundo, L., Willis, B. L., Langevin, S., Tracy, A. M., Littman, R., Kemp, K. M., Dawkins, P., Prager, K. C., Garren, M. and Lamb, J.** (2020). Deciphering Coral Disease Dynamics: Integrating Host, Microbiome, and the Changing Environment. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**,. doi: 10.3389/fevo.2020.575927.
- Tobe, S. S. and Langley, P. A.** (1978). Reproductive Physiology of Glossina. *Annual Review of Entomology* **23**, 283–307. doi: 10.1146/annurev.en.23.010178.001435.
- Toft, C. and Andersson, S. G. E.** (2010). Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nature reviews. Genetics* **11**, 465–75. doi: 10.1038/nrg2798.
- Trevelline, B. K., Sosa, J., Hartup, B. K. and Kohl, K. D.** (2020). A bird’s-eye view of phyllosymbiosis: Weak signatures of phyllosymbiosis among all 15 species of cranes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**,. doi: 10.1098/rspb.2019.2988.
- Troussellier, M., Escalas, A., Bouvier, T. and Mouillot, D.** (2017). Sustaining rare marine microorganisms: Macroorganisms as repositories and dispersal agents of microbial diversity. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2017.00947.
- Trujillo-González, A., Constantinoiu, C. C., Rowe, R. and Hutson, K. S.** (2015). Tracking transparent monogenean parasites on fish from infection to maturity. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife* **4**, 316–22. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.06.002.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. and Gordon, J. I.** (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–1031. doi: 10.1038/nature05414.
- Turner, L. A. and Bucking, C.** (2019). The role of intestinal bacteria in the ammonia detoxification ability of teleost fish. *Journal of Experimental Biology* **222**,. doi: 10.1242/jeb.209882.
- Turon, M. and Uriz, M. J.** (2020). New Insights Into the Archaeal Consortium of Tropical Sponges. *Frontiers in Marine Science* **6**, 1–13. doi: 10.3389/fmars.2019.00789.

-U-

- Uren Webster, T. M., Rodriguez-Barreto, D., Consuegra, S. and Garcia de Leaniz, C.** (2020). Cortisol-Related Signatures of Stress in the Fish Microbiome. *Frontiers in Microbiology* **11**,. doi: 10.3389/fmicb.2020.01621.
- Urrutia-Cordero, P., Ekvall, M. K. and Hansson, L.-A.** (2015). Responses of cyanobacteria to herbivorous zooplankton across predator regimes: who mows the bloom? *Freshwater Biology* **60**, 960–972. doi: 10.1111/fwb.12555.
- Ushijima, B., Meyer, J. L., Thompson, S., Pitts, K., Marusich, M. F., Tittl, J., Weatherup, E., Reu, J., Wetzell, R., Aeby, G. S., Häse, C. C. and Paul, V. J.** (2020). Disease Diagnostics and Potential Coinfections by *Vibrio coralliilyticus* During an Ongoing Coral

-V-

- Vadstein, O., Attramadal, K. J. K., Bakke, I., Forberg, T., Olsen, Y., Verdegem, M., Giatsis, C., Skjermo, J., Aasen, I. M., Gatesoupe, F.-J., Dierckens, K., Sorgeloos, P. and Bossier, P.** (2018). Managing the Microbial Community of Marine Fish Larvae: A Holistic Perspective for Larviculture. *Frontiers in Microbiology* **9**,. doi: 10.3389/fmicb.2018.01820.
- van der Maarel, M. J. E. C., Artz, R. R. E., Haanstra, R. and Forney, L. J.** (1998). Association of marine archaea with the digestive tracts of two marine fish species. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2894–2898.
- van der Maarel, M. J. E. C., Sprenger, W. and Forney, L. J.** (1999). Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive. *Fems Microbiology Letters* **173**, 189.
- van Uden, N. and Branco, R. C.** (1963). Distribution and population densities of yeast species in pacific water, air, animals, and kelp off southern california. *Limnology and Oceanography* **8**, 323–329. doi: 10.4319/lo.1963.8.3.0323.
- Vellend, M.** (2016). *The Theory of Ecological Communities*. Princeton University Press, New York, NY.
- Vergés, A., Tomas, F., Cebrian, E., Ballesteros, E., Kizilkaya, Z., Dendrinis, P., Karamanlidis, A. A., Spiegel, D. and Sala, E.** (2014). Tropical rabbitfish and the deforestation of a warming temperate sea. *Journal of Ecology* **102**, 1518–1527. doi: 10.1111/1365-2745.12324.
- Vergés, A., Doropoulos, C., Malcolm, H. A., Skye, M., Garcia-Pizá, M., Marzinelli, E. M., Campbell, A. H., Ballesteros, E., Hoey, A. S., Vila-Concejo, A., Bozec, Y.-M. and Steinberg, P. D.** (2016). Long-term empirical evidence of ocean warming leading to tropicalization of fish communities, increased herbivory, and loss of kelp. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 13791–13796. doi: 10.1073/pnas.1610725113.
- Verstraete, W.** (2015). The technological side of the microbiome. *npj Biofilms and Microbiomes* **1**, 15001. doi: 10.1038/npjbiofilms.2015.1.
- Vienne, D. M., Refrégier, G., López-Villavicencio, M., Tellier, A., Hood, M. E. and Giraud, T.** (2013). Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytologist* **198**, 347–385. doi: 10.1111/nph.12150.
- Visick, K. L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M. and Ruby, E. G.** (2000). *Vibrio fischeri* lux Genes Play an Important Role in Colonization and Development of the Host Light Organ. *Journal of Bacteriology* **182**, 4578–4586. doi: 10.1128/JB.182.16.4578-4586.2000.

-W-

- Wächtershäuser, G.** (2006). From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**, 1787–1808. doi: 10.1098/rstb.2006.1904.
- Walk, S. T., Blum, A. M., Ewing, S. A.-S., Weinstock, J. V. and Young, V. B.** (2010).

- Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Inflammatory Bowel Diseases* **16**, 1841–1849. doi: 10.1002/ibd.21299.
- Walter, J.** (2015). Murine Gut Microbiota—Diet Trumps Genes. *Cell Host & Microbe* **17**, 3–5. doi: 10.1016/j.chom.2014.12.004.
- Wang, R.** (2012). Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed. *Physiological Reviews* **92**, 791–896. doi: 10.1152/physrev.00017.2011.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. and Cole, J. R.** (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07.
- Wang, W., Zhou, Z., He, S., Liu, Y., Cao, Y., Shi, P., Yao, B. and Ringø, E.** (2010). Identification of the adherent microbiota on the gills and skin of poly-cultured gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Aquaculture Research* **41**, e72–e83. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02459.x.
- Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E. and Zhou, Z. G.** (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture* **10**, 626–640. doi: 10.1111/raq.12191.
- Wang, L., Ding, J., Yang, Z., Chen, H., Yao, R., Dai, Q., Ding, Y. and Zhu, L.** (2019). Père David's deer gut microbiome changes across captive and translocated populations: Implications for conservation. *Evolutionary Applications* **12**, 622–635. doi: 10.1111/eva.12743.
- Ward, N. L., Steven, B., Penn, K., Methé, B. A. and Detrich, W. H.** (2009). Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles* **13**, 679–685. doi: 10.1007/s00792-009-0252-4.
- Wasimuddin, Menke, S., Melzheimer, J., Thalwitzer, S., Heinrich, S., Wachter, B. and Sommer, S.** (2017). Gut microbiomes of free-ranging and captive Namibian cheetahs: Diversity, putative functions and occurrence of potential pathogens. *Molecular Ecology* **26**, 5515–5527. doi: 10.1111/mec.14278.
- Webster, N. S., Cobb, R. E. and Negri, A. P.** (2008). Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *The ISME Journal* **2**, 830–842. doi: 10.1038/ismej.2008.42.
- Wemheuer, F., Kaiser, K., Karlovsky, P., Daniel, R., Vidal, S. and Wemheuer, B.** (2017). Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. *Scientific Reports* **7**, 40914. doi: 10.1038/srep40914.
- Wemheuer, F., Taylor, J. A., Daniel, R., Johnston, E., Meinicke, P., Thomas, T. and Wemheuer, B.** (2020). Tax4Fun2: prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. *Environmental Microbiome* **15**, 11. doi: 10.1186/s40793-020-00358-7.
- West, S. A., Kiers, E. T., Simms, E. L. and Denison, R. F.** (2002). Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **269**, 685–694. doi: 10.1098/rspb.2001.1878.
- West, A. G., Waite, D. W., Deines, P., Bourne, D. G., Digby, A., McKenzie, V. J. and Taylor, M. W.** (2019). The microbiome in threatened species conservation. *Biological Conservation* **229**, 85–98. doi: 10.1016/j.biocon.2018.11.016.
- Whitaker, J. O., Dannelly, H. K. and Prentice, D. A.** (2004). Chitinase in Insectivorous Bats. *Journal of Mammalogy* **85**, 15–18. doi: 10.1644/1545-1542(2004)085<0015:CIIB>2.0.CO;2.
- Wienemann, T., Schmitt-Wagner, D., Meuser, K., Segelbacher, G., Schink, B., Brune, A. and Berthold, P.** (2011). The bacterial microbiota in the ceca of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) differs between wild and captive birds. *Systematic and Applied Microbiology* **34**, 542–551. doi: 10.1016/j.syapm.2011.06.003.

- Wild, C., Niggli, W., Naumann, M. and Haas, A.** (2010). Organic matter release by Red Sea coral reef organisms—potential effects on microbial activity and in situ O₂ availability. *Marine Ecology Progress Series* **411**, 61–71. doi: 10.3354/meps08653.
- Wilkes Walburn, J., Wemheuer, B., Thomas, T., Copeland, E., O'Connor, W., Booth, M., Fielder, S. and Egan, S.** (2019). Diet and diet-associated bacteria shape early microbiome development in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *Microbial Biotechnology* **12**, 275–288. doi: 10.1111/1751-7915.13323.
- Wilkinson, C. R.** (2004). Status of the Coral Reefs of the World: 2004. In *Global Coral Reef Monitoring Network and Australian Institute of Marine Science*, .
- Wilkinson, C., Lindén, O., Cesar, H., Hodgson, G., Rubens, J. and Strong, A. E.** (1999). Ecological and socioeconomic impacts of 1998 coral mortality in the Indian Ocean: An ENSO impact and a warning of future change? *Ambio* **28**, 188–196.
- Wilkinson, T. J., Huws, S. A., Edwards, J. E., Kingston-Smith, A. H., Siu-Ting, K., Hughes, M., Rubino, F., Friedersdorff, M. and Creevey, C. J.** (2018). CowPI: A Rumen Microbiome Focussed Version of the PICRUSt Functional Inference Software. *Frontiers in Microbiology* **9**,. doi: 10.3389/fmicb.2018.01095.
- Williams, C. L., Ybarra, A. R., Meredith, A. N., Durrant, B. S. and Tubbs, C. W.** (2019). Gut Microbiota and Phytoestrogen-Associated Infertility in Southern White Rhinoceros. *mBio* **10**,. doi: 10.1128/mBio.00311-19.
- Wilson, S. K., Robinson, J. P. W., Chong-Seng, K., Robinson, J. and Graham, N. A. J.** (2019). Boom and bust of keystone structure on coral reefs. *Coral Reefs* **38**, 625–635. doi: 10.1007/s00338-019-01818-4.
- Woese, C. R. and Fox, G. E.** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5088–5090. doi: 10.1073/pnas.74.11.5088.
- Wong, S., Waldrop, T., Summerfelt, S., Davidson, J., Barrows, F., Kenney, P. B., Welch, T., Wiens, G. D., Snekvik, K., Rawls, J. F. and Good, C.** (2013). Aquacultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Possess a Large Core Intestinal Microbiota That Is Resistant to Variation in Diet and Rearing Density. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 4974–4984. doi: 10.1128/AEM.00924-13.
- Wong, S., Stephens, W. Z., Burns, A. R., Stagaman, K., David, L. A., Bohannon, B. J. M., Guillemin, K. and Rawls, J. F.** (2015). Ontogenetic Differences in Dietary Fat Influence Microbiota Assembly in the Zebrafish Gut. *mBio* **6**,. doi: 10.1128/mBio.00687-15.
- Wong, A. C.-N., Wang, Q.-P., Morimoto, J., Senior, A. M., Lihoreau, M., Neely, G. G., Simpson, S. J. and Ponton, F.** (2017). Gut Microbiota Modifies Olfactory-Guided Microbial Preferences and Foraging Decisions in *Drosophila*. *Current Biology* **27**, 2397–2404.e4. doi: 10.1016/j.cub.2017.07.022.
- Woodhead, A. J., Hicks, C. C., Norström, A. V., Williams, G. J. and Graham, N. A. J.** (2019). Coral reef ecosystem services in the Anthropocene. *Functional Ecology* 1365–2435.13331. doi: 10.1111/1365-2435.13331.
- Worm, B., Barbier, E. B., Beaumont, N., Duffy, J. E., Folke, C., Halpern, B. S., Jackson, J. B. C., Lotze, H. K., Micheli, F., Palumbi, S. R., Sala, E., Selkoe, K. A., Stachowicz, J. J. and Watson, R.** (2006). Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science* **314**, 787–790. doi: 10.1126/science.1132294.
- Wu, S., Ren, Y., Peng, C., Hao, Y., Xiong, F., Wang, G., Li, W., Zou, H. and Angert, E. R.** (2015). Metatranscriptomic discovery of plant biomass-degrading capacity from grass carp intestinal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology* **91**, 1–9. doi: 10.1093/femsec/fiv107.

-X-

- Xavier, R., Mazzei, R., Pérez-Losada, M., Rosado, D., Santos, J. L., Veríssimo, A. and Soares, M. C. (2019). A Risky Business? Habitat and Social Behavior Impact Skin and Gut Microbiomes in Caribbean Cleaning Gobies. *Frontiers in Microbiology* **10**,. doi: 10.3389/fmicb.2019.00716.
- Xavier, R., Pereira, A., Pagan, A., Hendrick, G. C., Nicholson, M. D., Rosado, D., Soares, M. C., Pérez-Losada, M. and Sikkil, P. C. (2020). The effects of environment and ontogeny on the skin microbiome of two *Stegastes* damselfishes (Pomacentridae) from the eastern Caribbean Sea. *Marine Biology* **167**, 102. doi: 10.1007/s00227-020-03717-7.
- Xenoulis, P. G., Gray, P. L., Brightsmith, D., Palculict, B., Hoppes, S., Steiner, J. M., Tizard, I. and Suchodolski, J. S. (2010). Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Veterinary Microbiology* **146**, 320–325. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.024.
- Xia, J. H., Lin, G., Fu, G. H., Wan, Z. Y., Lee, M., Wang, L., Liu, X. J. and Yue, G. H. (2014). The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics* **15**, 266. doi: 10.1186/1471-2164-15-266.

-Y-

- Yang, R., Liu, P. and Ye, W. (2017). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of tree peony (*Paeonia* Sect. *Moutan*) roots and leaves. *Brazilian Journal of Microbiology* **48**, 695–705. doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.009.
- Yang, P., Zhang, Y., Lai, D. Y. F., Tan, L., Jin, B. and Tong, C. (2018). Fluxes of carbon dioxide and methane across the water–atmosphere interface of aquaculture shrimp ponds in two subtropical estuaries: The effect of temperature, substrate, salinity and nitrate. *Science of the Total Environment* **635**, 1025–1035. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.102.
- Yang, G., Jian, S. Q., Cao, H., Wen, C., Hu, B., Peng, M., Peng, L., Yuan, J. and Liang, L. (2019). Changes in microbiota along the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Community, interspecific interactions, and functions. *Aquaculture* **498**, 151–161. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.062.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R. and Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227. doi: 10.1038/nature11053.
- Youngblut, N. D., Reischer, G. H., Walters, W., Schuster, N., Walzer, C., Stalder, G., Ley, R. E. and Farnleitner, A. H. (2019). Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades. *Nature Communications* **10**,. doi: 10.1038/s41467-019-10191-3.
- Youngblut, N. D., Reischer, G. H., Dauser, S., Walzer, C., Stalder, G., Farnleitner, A. H. and Ley, R. E. (2020). Strong influence of vertebrate host phylogeny on gut archaeal diversity. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.11.10.376293.

-Z-

- Zacharias, O.** (1896). *L'année biologique : comptes-rendus annuels des travaux de biologie générale*. ed. Delage, Y. Elsevier, Paris.
- Zhang, M., Sun, Y., Liu, Y., Qiao, F., Chen, L., Liu, W.-T., Du, Z. and Li, E.** (2016a). Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. *Aquaculture* **454**, 72–80. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.014.
- Zhang, L., Kang, M., Xu, J., Xu, J., Shuai, Y., Zhou, X., Yang, Z. and Ma, K.** (2016b). Bacterial and archaeal communities in the deep-sea sediments of inactive hydrothermal vents in the Southwest India Ridge. *Scientific Reports* **6**, 25982. doi: 10.1038/srep25982.
- Zhang, Z., Li, D., Refaey, M. M. and Xu, W.** (2017). High Spatial and Temporal Variations of Microbial Community along the Southern Catfish Gastrointestinal Tract: Insights into Dynamic Food Digestion. *Frontiers in Microbiology* **8**,. doi: 10.3389/fmicb.2017.01531.
- Zhang, X., Wu, H., Li, Z., Li, Y., Wang, S., Zhu, D., Wen, X. and Li, S.** (2018a). Effects of dietary supplementation of *Ulva pertusa* and non-starch polysaccharide enzymes on gut microbiota of *Siganus canaliculatus*. *Journal of Oceanology and Limnology* **36**, 438–449. doi: 10.1007/s00343-017-6235-x.
- Zhang, Z., Li, D., Refaey, M. M., Xu, W., Tang, R. and Li, L.** (2018b). Host Age Affects the Development of Southern Catfish Gut Bacterial Community Divergent From That in the Food and Rearing Water. *Frontiers in Microbiology* **9**,. doi: 10.3389/fmicb.2018.00495.
- Zhao, S., Lieberman, T. D., Poyet, M., Kauffman, K. M., Gibbons, S. M., Groussin, M., Xavier, R. J. and Alm, E. J.** (2019). Adaptive Evolution within Gut Microbiomes of Healthy People. *Cell Host & Microbe* **25**, 656–667.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.03.007.
- Zhu, L., Wu, Q., Dai, J., Zhang, S. and Wei, F.** (2011). Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 17714–17719. doi: 10.1073/pnas.1017956108.
- Zhu, L., Wu, Q., Deng, C., Zhang, M., Zhang, C., Chen, H., Lu, G. and Wei, F.** (2018). Adaptive evolution to a high purine and fat diet of carnivorans revealed by gut microbiomes and host genomes. *Environmental Microbiology* **20**, 1711–1722. doi: 10.1111/1462-2920.14096.
- Zilber-Rosenberg, I. and Rosenberg, E.** (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 723–735. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.

8. Annexes

8. I. Protocoles expérimentaux

8. I. A – Protocole d'extraction des acides nucléiques à partir du kit MagAttract PowerSoil®

Méthode adaptée à partir du protocole constructeur et utilisé pour les échantillons des campagnes *Megafauna* et *Exofishmed*

MagAttract ® PowerSoil ® DNA KF Kit Handbook

Created by Arthur Escalas and edited by Marie-Charlotte Cheutin

To prepare in advance

- Autoclave 500 tubes of 0.2 ml for storage of aliquots
- Autoclave 6 multi-channel pipette reservoirs
- Charge the multi channel pipettes
- Make a reservation for the Kingfisher robot and the Nanodrop spectrometer on the Genseq Website <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/>
- 2 boxes with all the necessary material for the Marbec and for the Genseq Parts

Material checklist

- Spatulas
- Scissors to cut filters and swabs
- Pliers to manipulate filters and swabs
- Plastic covers with hole for protecting the plates
- Kimwipes and paper towels
- 70% ethanol
- 1 becher
- three 50 ml falcons or burettes
- Styrofoam boxes, one big filled with ice and two small to hold the tubes
- 6 multi-channel pipette reservoirs
- 2 box of 10 µl tips
- 2 box of 200 µl tips
- 6 boxes of 1000 µl tips
- 4 boxes of long and narrow (XL) 1000 µl tips
- 1 KingFisher Deep Well 96 Plate (to get at the genseq platform)
- 2 collection plates
- multi-channel pipettes

Before starting

- Print the map of the plate
- Fill the bottom of the big styrofoam box with ice and place the two small boxes on top
- Place the samples in the boxes in the same order as on the plate
- If SL Solution has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves

Procedure

At the MARBEC platform

1. Carefully peel off the Square Well Mat that covers the PowerBead DNA Plate and set aside. Load samples to each well of the PowerBead DNA Plate. Use the plastic covers with the hole for targeting the good well. Clean the plastic cover with ethanol between each sample.

Amount of sample to load:

- Fish gut : 1 big spatula spoon
- Swabs : half of the swab
- Filters : half of the filter cut into pieces
- Sediment : 1 big spatula spoon
- Mock community: 75 µl

Note: This is an appropriate stopping point. You can store the PowerBead DNA Plate at 2–8 °C covered with the Square Well Mat.

2. Mix **400 µl** of RNase A Solution to **75 ml** of Powerbead Solution in a becher for every 96-well plate you plan to process.

Pour 75 ml of Powerbead Solution/RNase A Solution in a multi-channel pipette reservoir. Distribute **750 µl** of Powerbead Solution/RNase A Solution to each well of the plate.

3. Pour carefully to not form foam 7 ml of SL Solution in a multichannel reservoir. Add **60 µl** of SL Solution to each well.

Note: Use 10 mL falcon tube to measure the volumes.

4. Replace the Square Well Mat tightly on the plate and securely fastened the plate between 2 Adapter Plates.

Note: A proper seal of the mat is critical to prevent loss of sample and leakage.

5. Shake at speed **20 Hz for 10 min** using the Tissue Lyzer.

Re-orient plates so that the side that was closest to the machine body is now farthest from it and shake again at speed **20 Hz for 10 min**.

6. Centrifuge the plate at room temperature for **13 min at 3700 x g**.

Use the equilibration plate (“plaque équilibrage”) with the beads located in the shelves close to the centrifuge.

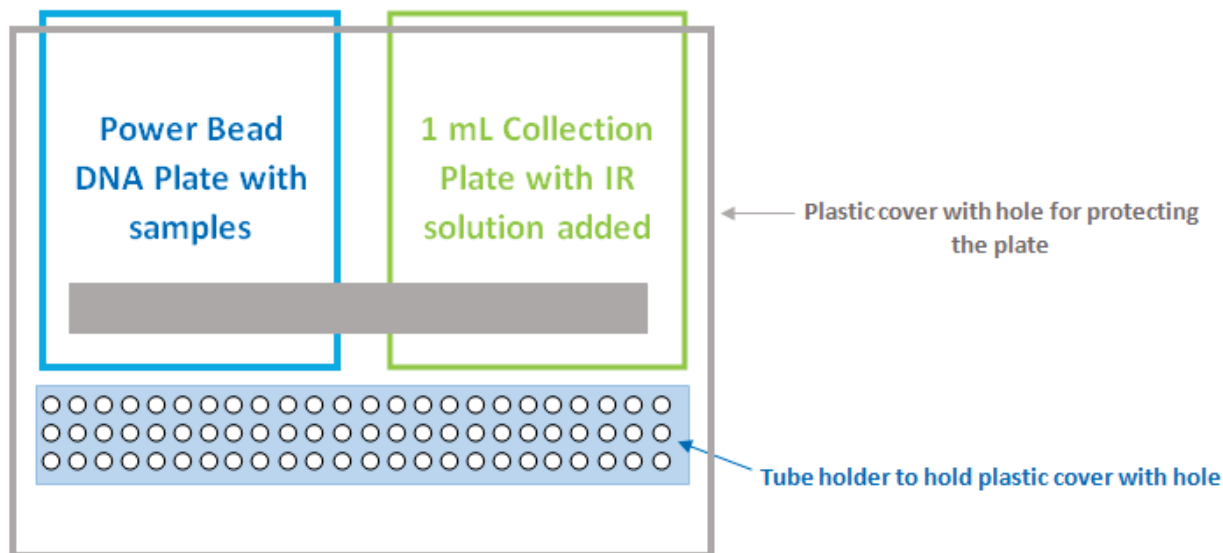
7. During centrifugation, pour 45 ml of IR Solution in a multi-channel pipette reservoir.

Distribute **450 μ L** of IR Solution to each well of a clean 1 ml Collection Plate.

Note: Use 50 mL falcon tube to measure the volumes.

8. Carefully remove and discard the Square Well Mat. Using the **long and narrow 1000 μ L tips**, transfer **600 μ L** of supernatant into the plate prepared at step 7. Seal the plate using Sealing Tape.

Note: The supernatant may still contain some soil particles. It's okay if you transfer less than 600 μ L of supernatant.



9. Vortex horizontally for **5 s** and incubate at **2–8°C for 10 min.**

10. Centrifuge at room temperature for **13 min at 3700 x g**. Use the equilibration plate (“plaque 1050 μ L”) located in the shelves close to the centrifuge.

Remove and discard Sealing Tape.

11. Avoiding the pellet, transfer **850 μ L** of supernatant to a new 1 ml Collection Plate using the **long and narrow 1000 μ L tips**.

Dip the tips down to the first mark and move the pipette down (to the second mark) into the plate after pushing the pipetting button.

12. Apply Sealing Tape and centrifuge at room temperature for **13 min at 3700 x g**. Use the equilibration plate (“plaque 650 μ L”) located in the shelves close to the centrifuge.

13. During centrifugation, resuspend ClearMag Beads (ClearMag Zorb Reagent) by vortexing. For each 96-well plate to be processed, add 2 ml of the resuspended ClearMag Beads (ClearMag Zorb Reagent) to 45 ml of ClearMag Binding Solution. Mix well and immediately transfer to a multi-channel pipette reservoir.

Note: Use another 50 mL falcon tube to measure the volumes.

Note: Maintain the ClearMag Beads in suspension to ensure uniform distribution.

14. Distribute **470 μ L** of the ClearMag Beads/ClearMag Binding Solution to each well of the KingFisher Deep Well 96 Plate.

15. Taking care to avoid any residual pellet, use the **long and narrow 1000 µl tips** to transfer **450 µl** of supernatant from each well to the **KingFisher Deep Well 96 Plate** prepared at step 14.

Dip the tips down to the second mark and move the pipette down into the plate after pushing the pipetting button. Seal the plate

Note: You can store the plate at 2–8°C until they can be processed.

At the GenSeq platform

Bring the materiel:

- 10µL tips box (full) + multi-channel pipet
- 100µL tips box (not necessarily full) + multi-channel pipet
- 1000µL tips box (not necessarily full) + multi-channel pipet
- USB key
- 2 Trash bags (1 for reservoirs recycle and 1 for the wash tapes before trashing in the yellow rubbish).
- plastic sheet with the transect hole to transfer the samples.

Prepare a file containing the name of samples processed and place it on a USB drive. Write in the platform's notebook the nature and number of consumables from the platform that you're going to use.

16. Start the Kingfisher software on the platform computer. Load the appropriated program and check that the volumes correspond to your protocol.

17. Under the hood, pour approximately 50 ml of ClearMag Wash Solution to a multi-channel pipette reservoir.

Distribute **500 µl** of ClearMag Wash Solution to each well of a clean KingFisher Deep Well 96 plates.

Repeat this step 3 times and label the plates wash 1, wash 2 and wash 3.

18. Pour 10 ml of EB Solution to a multi-channel pipette reservoir.

Distribute **100 µl** of EB Solution to each well of a clean KingFisher 96 KF plate. Label the plate elution.

19. Label another clean KingFisher 96 KF plate as tip and place the plastic comb on it.

Note: nothing happens in this plate so you can use it again.

20. Initiate the robotic program using the green arrow. Then the robot will provide instructions on which plate to position on the deck.

21. Upon completion of the robotic program, transfer the eluted DNA into a new 96 well plate. DNA is now ready for downstream applications.

22. Check DNA concentration and quality using the Nanodrop from the CEMEB platform (see the other protocol "Nanodrop 8000 usage note").

Note : write in Nanodrop's notebook the date, your name and your work team.

Storage of extracted DNA

Material checklist

- 2 Star Chill storage boxes
- 96 sterile PCR tubes of 0.2 mL
- one 96 wells plate
- 2 sealing tape
- labeler
- one box of 200 μ L tips
- multichannel pipet P200

Warning : between each step, be careful to not contaminate your DNA by covering 96 wells plate and closing sterile PCR tubes as soon as possible.

23. Label the storage box (Star Chill) with eluted DNA (one label at the bottom of the storage box, one label on the cover of the storage box) with the right *box_id*.

24. Take two another storage boxes (Star Chill) and label them with the right *box_id*. One storage box will contain 96 wells plate. The other storage box will contain 96 sterile PCR tubes.

25. Thanks to the multichannel pipet P200, distribute 20 μ L of eluted DNA in the 96 wells plate. Then, distribute another 20 μ L of eluted DNA in sterile PCR tubes.

At this step, you get you 3 aliquots (two in 96 wells plate and one in 96 sterile PCR tubes).

26. Close 96 wells plates with sealing tape.

27. If you plan to make PCR the same day, keep one plate at 4°C. Store other aliquots at -20°C as soon as possible.

8. I. B – Expérience de mesure du méthane *in vivo*

Protocole créé avec Martin Dessart dans l'objectif de mesurer une activité méthanogène *in vivo* de poissons méditerranéens (Saupes et Sardines juvéniles)

Material checklist

- Wader
- Hand lift net
- Tank filled with of 0,2µm filtered seawater
- Liquid nitrogen bottle
- Storage box (ideally black) with full of ambient temperature seawater (e.g. might be a cooler)
- 5 labelled (Meso_00x) Zip bags of 8L volume
- Double needle systems (highest Gauge is better)
- 9 mL dried Vacutainer (without conservators– white vials) labeled for gas (Vac_00x_A) and water (Vac_00x_W) phases sampling
- Vials rack
- Measuring tape
- Parafilm
- Towel paper
- Ethanol 90%
- Trash bin

1) Sampling fishes

This part is basically catching fish.

The aim is to fish at least 10 individuals of one species, ideally at the same time. Fishes are quite delicate and require the minimum of stress.

The species described are living in shoals, near the surface or in shallow water.

The best time to go fishing is early in the morning.

- Fill the zipbag with 2 L of 0, 2µm filtered seawater before sampling.
- Catch fishes with a dip net and/or hand lift net (15 cm) and drop them slightly in zipbag (n = 20 fishes per bag). Two zipbags are whitout fishes (negatives).

Rem The effective number per bag is depending on the size of the fishes. We concentrated many fishes in order to enhance the detection of a methane emission signal.

- Put the zipbags into the dark box and close it for 25 min to let the fish settle down and calm.
- Put the zipbags into the seawater (*i.e.* ambient temperature) and wait for 1h

2) Sampling for Gas chromatography

This part consists in taking gas or liquid sampling of fish activity.

Water phase sampling:

- Stick the small part of the intravenous needle into the vials and the big part in the water part (both insertions have to be done at the same time)

Rem In order to keep the perfect sealing, use a piece of parafilm on the bag where you will stick the syringe.

- Stick back the needle out of the filled vacutainer, **but not of the bag.**
- Put the second vacutainer for the second sampling keeping the same needle.

Rem You can add NaCl to stop methane formation

- Store the vials at 4°C

Gas phase sampling:

- Stick the small part of the intravenous needle into the vials and the big part into the headspace and the vials

- Stands for 3 seconds. Stick back the needle out of the vacutainer **but not of the bag.**
- Put the second vacutainer for the second sampling keeping the same needle.
- Store the vials at 4°C



8. II. Informations supplémentaires

8. II. A – Supplementary material – **Manuscrit A**

Supplementary material

Finding Dory & Co. : insights into the enteric core microbiome of coral reef fish

Authors : Marie-Charlotte Cheutin¹, Sébastien Villéger¹, Christina C. Hicks², James P. W. Robinson², Nicholas A. J. Graham², Clémence Marconnet¹, Claudia Ximena Ortiz Restrepo¹, Jean-Baptiste Juhel¹, Eva Maire², Elliott Sucre³, Virginie Marques¹, Cassandra Benkwitt², Rachel L. Gunn², Eilish Richards⁴, Camille Albouy⁵, Marc Trousselier¹, Giulia Donati⁴, Loic Pelissier⁴, Thierry Bouvier¹, Jean-Christophe Auguet¹

¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

³ Centre Universitaire de Mayotte, Route Nationale 3, BP53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

⁴ ETH, Universität Zürich, 8092 Zürich, Switzerland

⁵ IFREMER, Unité Ecologie et Modèles pour l'Halieutique, EMH, Nantes Cedex 3, France

Key words : Microbiome, gut, coral reef fish.

En préparation

Supplementary material – Manuscript A

Supplemental Table 1 : Ecological traits of the sampled reef fish (n = sampling size).

Species	Family	Diet	Region
<i>Abudefduf saxatilis</i> (n = 3)	Pomacentridae	Omnivore	Caribbean sea
<i>Abudefduf sparoides</i> (n = 2)	Pomacentridae	Omnivore	Indian ocean
<i>Abudefduf vaigiensis</i> (n = 4)	Pomacentridae	Omnivore	Indian ocean
<i>Acanthurus bahianus</i> (n = 1)	Acanthuridae	Herbivore	Caribbean sea
<i>Acanthurus nigrofusus</i> (n = 12)	Acanthuridae	Herbivore	Indian ocean
<i>Aethaloperca rogaa</i> (n = 5)	Serranidae	Piscivore	Indian ocean
<i>Aluterus schoepfii</i> (n = 1)	Monacanthidae	Herbivore	Caribbean sea
<i>Aluterus scriptus</i> (n = 2)	Monacanthidae	Omnivore	Caribbean sea
<i>Amphiprion akallopisos</i> (n = 3)	Pomacentridae	Omnivore	Indian ocean
<i>Aprion virescens</i> (n = 8)	Lutjanidae	Piscivore	Indian ocean
<i>Aulostomus maculatus</i> (n = 3)	Aulostomidae	Piscivore	Caribbean sea
<i>Calotomus carolinus</i> (n = 6)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
<i>Cantherhines macrocerus</i> (n = 1)	Monacanthidae	Omnivore	Caribbean sea
<i>Cantherhines pardalis</i> (n = 2)	Monacanthidae	Omnivore	Indian ocean
<i>Cantherhines striatus</i> (n = 1)	Monacanthidae	Omnivore	Caribbean sea
<i>Carangoides fulvoguttatus</i> (n = 1)	Carangidae	Mobile invertivore	Indian ocean
<i>Carangoides plagiotaenia</i> (n = 1)	Carangidae	Mobile invertivore	Indian ocean
<i>Caranx melampygus</i> (n = 2)	Carangidae	Mobile invertivore	Indian ocean
<i>Cephalopholis argus</i> (n = 2)	Serranidae	Piscivore	Indian ocean
<i>Cephalopholis nigripinnis</i> (n = 1)	Serranidae	Piscivore	Indian ocean
<i>Chaetodon guttatisissimus</i> (n = 1)	Chaetodontidae	Omnivore	Indian ocean
<i>Chaetodon striatus</i> (n = 3)	Chaetodontidae	Sessile invertivore	Caribbean sea
<i>Chaetodon trifasciatus</i> (n = 5)	Chaetodontidae	Sessile invertivore	Indian ocean
<i>Cheilinus fasciatus</i> (n = 4)	Labridae	Mobile invertivore	Indian ocean
<i>Cheilinus trilobatus</i> (n = 3)	Labridae	Mobile invertivore	Indian ocean
<i>Chlorurus sordidus</i> (n = 7)	Scaridae	Detritivore	Indian ocean
<i>Chromis opercularis</i> (n = 4)	Pomacentridae	Omnivore	Indian ocean
<i>Chromis weberi</i> (n = 1)	Pomacentridae	Planktivore	Indian ocean
<i>Clepticus parrae</i> (n = 2)	Labridae	Mobile invertivore	Caribbean sea
<i>Coris formosa</i> (n = 1)	Labridae	Mobile invertivore	Indian ocean
<i>Ctenochaetus binotatus</i> (n = 1)	Acanthuridae	Detritivore	Indian ocean
<i>Ctenochaetus striatus</i> (n = 18)	Acanthuridae	Detritivore	Indian ocean
<i>Dascyllus aruanus</i> (n = 3)	Pomacentridae	Omnivore	Indian ocean
<i>Decapterus macarellus</i> (n = 4)	Carangidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
<i>Diodon holocanthus</i> (n = 3)	Diodontidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
<i>Epibulus insidiator</i> (n = 1)	Labridae	Mobile invertivore	Indian ocean
<i>Epinephelus guttatus</i> (n = 2)	Serranidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
<i>Epinephelus spilotoceps</i> (n = 1)	Serranidae	Mobile invertivore	Indian ocean

Gomphosus caeruleus (n = 7)	Labridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Haemulon chrysargyreum (n = 3)	Haemulidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Haemulon flavolineatum (n = 6)	Haemulidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Haemulon vittatum (n = 1)	Haemulidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Halichoeres garnoti (n = 8)	Labridae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Halichoeres hortulanus (n = 10)	Labridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Hemigymnus fasciatus (n = 5)	Labridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Heteropriacanthus cruentatus (n = 2)	Priacanthidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Holocentrus adscensionis (n = 4)	Holocentridae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Holocentrus rufus (n = 2)	Holocentridae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Kyphosus sectatrix (n = 1)	Kyphosidae	Herbivore	Caribbean sea
Lactophrys triqueter (n = 4)	Ostraciidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Lepidozygus tapeinosoma (n = 1)	Pomacentridae	Planktivore	Indian ocean
Lethrinus enigmaticus (n = 6)	Lethrinidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lethrinus mahsena (n = 10)	Lethrinidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lethrinus microdon (n = 5)	Lethrinidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lethrinus nebulosus (n = 2)	Lethrinidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lethrinus variegatus (n = 2)	Lethrinidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lethrinus xanthochilus (n = 1)	Lethrinidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lutjanus bohar (n = 7)	Lutjanidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lutjanus fulviflamma (n = 2)	Lutjanidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lutjanus gibbus (n = 8)	Lutjanidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lutjanus griseus (n = 1)	Lutjanidae	Piscivore	Caribbean sea
Lutjanus kasmira (n = 14)	Lutjanidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Lutjanus vitta (n = 1)	Lutjanidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Melichthys niger (n = 1)	Balistidae	Omnivore	Caribbean sea
Microspathodon chrysurus (n = 2)	Pomacentridae	Herbivore	Caribbean sea
Monotaxis grandoculis (n = 16)	Lethrinidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Mulloidichthys martinicus (n = 10)	Mullidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Myripristis adusta (n = 1)	Holocentridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Myripristis berndti (n = 3)	Holocentridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Myripristis jacobus (n = 7)	Holocentridae	Detritivore	Caribbean sea
Myripristis murdjan (n = 3)	Holocentridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Myripristis pralinia (n = 1)	Holocentridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Myripristis violacea (n = 11)	Holocentridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Oxycheilinus digramma (n = 5)	Labridae	Mobile invertivore	Indian ocean
Paracirrhites forsteri (n = 1)	Cirrhitidae	Piscivore	Indian ocean
Parapercis hexophtalma (n = 2)	Pinguipedidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Parupeneus barberinus (n = 2)	Mullidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Parupeneus macronemus (n = 3)	Mullidae	Mobile invertivore	Indian ocean
Pseudanthias squamipinnis (n = 1)	Serranidae	Planktivore	Indian ocean
Pseudupeneus maculatus (n = 1)	Mullidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Scarus caudofasciatus (n = 1)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean

Scarus falcipinnis (n = 3)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
Scarus ghobban (n = 7)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
Scarus iseri (n = 2)	Scaridae	Herbivore	Caribbean sea
Scarus niger (n = 2)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
Scarus psittacus (n = 1)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
Scarus rubroviolaceus (n = 2)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
Scarus sp. (n = 1)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
Scarus sp2 (n = 3)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
Scarus tricolor (n = 2)	Scaridae	Herbivore	Indian ocean
Siganus argenteus (n = 3)	Siganidae	Herbivore	Indian ocean
Siganus sp. (n = 3)	Siganidae	Herbivore	Indian ocean
Siganus sutor (n = 11)	Siganidae	Herbivore	Indian ocean
Sparisoma aurofrenatum (n = 5)	Scaridae	Herbivore	Caribbean sea
Sparisoma axillare (n = 1)	Scaridae	Herbivore	Caribbean sea
Sparisoma viride (n = 1)	Scaridae	Herbivore	Caribbean sea
Sphoeroides spengleri (n = 1)	Tetraodontidae	Mobile invertivore	Caribbean sea
Stegastes partitus (n = 1)	Pomacentridae	Detritivore	Caribbean sea
Synodus intermedius (n = 5)	Synodontidae	Piscivore	Caribbean sea
Zanclus cornutus (n = 11)	Zanclidae	Sessile invertivore	Indian ocean
Zebrasoma desjardini (n = 4)	Acanthuridae	Detritivore	Indian ocean
Sediment (n = 33)	-	-	-
Seawater (n = 60)	-	-	-

8. II. B – Supplementary material – **Manuscrit B**

Supplementary material

Sulfate-reduction prevents marine fishes from farting methane

Authors : Marie-Charlotte Cheutin¹, Julie Balland¹, Émilie Roso¹, Martin Dessart¹, Fabien Rieuvilleneuve¹, Sébastien Villéger¹, Thierry Bouvier¹, Jean-Christophe Auguet¹

1 UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France

Key words : Archaeome, gut, coral reef fish, methane production, sulfate-reduction.

En préparation

Supplementary material – Manuscript B

Supplemental Table 1 : Ecological traits of the sampled reef fish (n = sampling size).

Taxonomy	Family	Trophic guild
<i>Acanthurus bahianus</i> (n = 1)	Acanthuridae	Herbivorous
<i>Acanthurus chirurgus</i> (n = 1)		Herbivorous
<i>Acanthurus nigrofasciatus</i> (n = 11)		Herbivorous
<i>Ctenochaetus striatus</i> (n = 19)		Herbivorous
<i>Zebrasoma desjardini</i> (n = 4)		Herbivorous
<i>Aulotomus maculatus</i> (n = 6)	Aulostomidae	Carnivorous
<i>Carangoides fulvoguttatus</i> (n = 2)	Carangidae	Carnivorous
<i>Carangoides plagiotaenia</i> (n = 1)		Carnivorous
<i>Caranx melampygus</i> (n = 8)		Carnivorous
<i>Decapturus macarellus</i> (n = 4)		Carnivorous
<i>Chaetodon aculeatus</i> (n = 1)	Chaetodontidae	Carnivorous
<i>Chaetodon capistratus</i> (n = 5)		Carnivorous
<i>Chaetodon guttatisissimus</i> (n = 1)		Omnivorous
<i>Chaetodon striatus</i> (n = 3)		Carnivorous
<i>Chaetodon trifasciatus</i> (n = 8)		Carnivorous
<i>Paracirrhites forsteri</i> (n = 1)	Cirrhitidae	Carnivorous
<i>Haemulon chrysargyrum</i> (n = 2)	Haemulidae	Carnivorous
<i>Haemulon flavolineatum</i> (n = 4)		Carnivorous
<i>Inermia vittata</i> (n = 2)		Carnivorous
<i>Holocentrus adscensionis</i> (n = 3)	Holocentridae	Carnivorous
<i>Holocentrus rufus</i> (n = 1)		Carnivorous
<i>Myripristis adusta</i> (n = 1)		Carnivorous
<i>Myripristis berndti</i> (n = 5)		Carnivorous
<i>Myripristis jacobus</i> (n = 5)		Herbivorous
<i>Myripristis murdjan</i> (n = 3)		Carnivorous
<i>Myripristis pralinia</i> (n = 1)		Carnivorous
<i>Myripristis violacea</i> (n = 11)		Carnivorous
<i>Oxycheilinus digramma</i> (n = 1)		Carnivorous
<i>Cheilinus fasciatus</i> (n = 4)		Carnivorous
<i>Cheilinus trilobatus</i> (n = 3)	Labridae	Carnivorous
<i>Clepticus parrae</i> (n = 1)		Carnivorous
<i>Coris formosa</i> (n = 1)		Carnivorous
<i>Epibulus insidiator</i> (n = 1)		Carnivorous
<i>Gomphosus caeruleus</i> (n = 9)		Carnivorous
<i>Halichoeres garnoti</i> (n = 3)		Carnivorous
<i>Halichoeres hortulanus</i> (n = 20)		Carnivorous
<i>Halichoeres maculipinna</i> (n = 1)		Carnivorous

Hemigymnus fasciatus (n = 13)		Carnivorous
Oxycheilinus digramma (n = 8)		Carnivorous
Lethrinus enigmaticus (n = 6)		Carnivorous
Lethrinus mahsena (n = 11)		Carnivorous
Lethrinus microdon (n = 6)		Carnivorous
Lethrinus nebulosus (n = 2)	Lethrinidae	Carnivorous
Lethrinus obsoletus (n = 1)		Carnivorous
Lethrinus variegatus (n = 5)		Carnivorous
Lethrinus xanthochilus (n = 1)		Carnivorous
Monotaxis grandoculis (n = 17)		Carnivorous
Aprion virescens (n = 15)		Carnivorous
Lutjanus bohar (n = 10)		Carnivorous
Lutjanus fulviflamma (n = 2)		Carnivorous
Lutjanus gibbus (n = 9)	Lutjanidae	Carnivorous
Lutjanus griseus (n = 1)		Carnivorous
Lutjanus kasmira (n = 15)		Carnivorous
Lutjanus vitta (n = 2)		Carnivorous
Aluterus schoepfii (n = 1)		Herbivorous
Aluterus scriptus (n = 2)	Monacanthidae	Omnivorous
Cantherhines pardalis (n = 2)		Omnivorous
Cantherines macrocerus (n = 1)		Omnivorous
Mulloidichthys martinicus (n = 8)		Carnivorous
Parupeneus barberinus (n = 10)	Mullidae	Omnivorous
Parupeneus macronemus (n = 7)		Omnivorous
Lactophrys triqueter (n = 3)	Ostraciidae	Carnivorous
Parapercis hexophtalma (n = 1)	Pinguipedidae	Carnivorous
Abudedefduf saxalitis (n = 2)		Omnivorous
Abudedefduf sparoides (n = 2)		Omnivorous
Abudedefduf vaigiensis (n = 4)		Omnivorous
Amphiprion akallopisos (n = 4)		Omnivorous
Chromis opercularis (n = 7)	Pomacentridae	Omnivorous
Chromis ternatensis (n = 1)		Omnivorous
Chromis weberi (n = 15)		Omnivorous
Dascyllus aruanus (n = 9)		Omnivorous
Lepidozygus tapeinosoma (n = 1)		Carnivorous
Microspathodon chrysurus (n = 1)		Herbivorous
Heteropriacanthus cruentatus (n = 1)	Priacanthidae	Carnivorous
Calotomus carolinus (n = 6)		Herbivorous
Chlorurus sordidus (n = 7)		Herbivorous
Scarus caudofasciatus (n = 1)	Scaridae	Herbivorous
Scarus falcipinnis (n = 4)		Herbivorous
Scarus frenatus (n = 1)		Herbivorous
Scarus ghobban (n = 7)		Herbivorous

Scarus isteri (n = 1)		Herbivorous
Scarus niger (n = 3)		Herbivorous
Scarus psittacus (n = 1)		Herbivorous
Scarus rubroviolaceus (n = 3)		Herbivorous
Scarus sordidus (n = 1)		Herbivorous
Scarus sp. (n = 3)		Herbivorous
Scarus sp1 (n = 1)		Herbivorous
Scarus sp2 (n = 3)		Herbivorous
Scarus tricolor (n = 2)		Herbivorous
Sparisoma aurofrenatum (n = 5)		Herbivorous
Aethaloperca rogaa (n = 9)		Carnivorous
Cephalopholis argus (n = 6)		Carnivorous
Cephalopholis cruentatus (n = 1)		Carnivorous
Cephalopholis nignipinnis (n = 1)		Carnivorous
Epinephelus fasciatus (n = 2)		Carnivorous
Epinephelus guttatus (n = 1)	Serranidae	Carnivorous
Epinephelus spilotoceps (n = 1)		Carnivorous
Eucinostomus jonesi (n = 1)		Carnivorous
Pseudanthias squamipinnis (n = 9)		Carnivorous
Pseudopeneus maculatus (n = 1)		Carnivorous
Serranus tigrinus (n = 1)		Carnivorous
Siganus argenteus (n = 3)		Herbivorous
Siganus sp. (n = 3)	Siganidae	Herbivorous
Siganus sutor (n = 11)		Herbivorous
Synodus intermedius (n = 5)	Synodontidae	Carnivorous
Canthigaster valentini (n = 4)		Carnivorous
Chilomycterus antennatus (n = 1)		Carnivorous
Diodon holocanthus (n = 3)	Tetraodontidae	Carnivorous
Sphoeroides spengleri (n = 1)		Carnivorous
Zanclus cornutus (n = 12)	Zanclidae	Carnivorous
Seawater (n = 60)		
Macroalgae (n = 29)		
Sediment (n = 33)		

8. II. C – Supplementary material – **Manuscript C**

Supplementary material

Gut bacteriome of coral reef fishes follows phylosymbiotic patterns

Authors : Marie-Charlotte Cheutin¹, Sébastien Villéger¹, Christina C. Hicks², James P. W. Robinson², Nicholas A. J. Graham², Clémence Marconnet¹, Claudia Ximena Ortiz Restrepo¹, Jean-Baptiste Juhel¹, Eva Maire², Elliott Sucre³, Virginie Marques¹, Cassandra Benkwitt², Rachel L. Gunn², Eilish Richards⁴, Camille Albouy⁵, Marc Trousselier¹, Giulia Donati⁴, Loic Pelissier⁴, David Mouillot¹, Tony Dejean, Thierry Bouvier⁶, Jean-Christophe Auguet¹

¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, 34095 Montpellier, France

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

³ Centre Universitaire de Mayotte, Route Nationale 3, BP53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

⁴ ETH, Universität Zürich, 8092 Zürich, Switzerland

⁵ IFREMER, Unité Ecologie et Modèles pour l'Halieutique, EMH, Nantes Cedex 3, France

⁶ SPYGEN, 73370 Le Bourget-du-Lac, France

Key words : Gut bacteriome, coral fish, phylosymbiosis, conserved clades

Supplementary material – Manuscript C

Supplemental Table 1 : Phylosymbiosis and Co-phylogeny results resulting from the Mantel test, the normalized Robinson-Foulds (nRF) and the normalized Matching cluster (nMC) analyses for bacteriome considering the conserved bacterial lineages from the ClaaTU analyses. The resulting normalized scores nRF and nMC are comprised between 0 (complete congruence) and 1 (complete incongruence). P-values were determined by the probability of 10 000 randomized dendrogram topologies yielding equivalent or more congruent phylosymbiotic patterns than the actual microbiota dendrogram. All tests were proceeded on the Bray-Curtis (BC), W-Uni (Weighted Unifrac) and U-Uni (Unweighted Unifrac) bacteriome matrices. Codes for p-value : *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not ($0.05 < NS < 0.1 < NS$).

Microbiome	Host community	Metric	Mantel (p-value)	nRF (p-value)	nMC (p-value)
Firmicutes	All species (n = 47)	BC	r = 0.06 (NS)	nRF = 0.98 (NS)	nMC = 0.92 (NS)
		U-Uni	r = 0.10 (NS)	nRF = 0.96 (*)	nMC = 0.78 (NS)
		W-Uni	r = - 0.02 (NS)	nRF = 0.96 (*)	nMC = 0.73 (*)
	Carnivorous (n = 30)	BC	r = 0.08 (NS)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.70 (*)
		U-Uni	r = 0.10 (NS)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.71 (NS)
		W-Uni	r = 0.02 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.68 (NS)
	Herbivorous (n = 11)	BC	r = 0.36 (**)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.55 (NS)
		U-Uni	r = 0.10 (NS)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.58 (NS)
		W-Uni	r = 0.25 (NS)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.57 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	BC	r = 0.41 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.42 (NS)
		U-Uni	r = 0.10 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		W-Uni	r = 0.34 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.5 (NS)
Clostridiales	All species (n = 47)	BC	r = 0.04 (NS)	nRF = 0.93 (**)	nMC = 0.99 (NS)
		U-Uni	r = 0.05 (NS)	nRF = 0.96 (*)	nMC = 0.72 (NS)
		W-Uni	r = 0.01 (NS)	nRF = 0.93 (**)	nMC = 0.78 (NS)
	Carnivorous (n = 30)	BC	r = 0.08 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.87 (NS)
		U-Uni	r = 0.05 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.63 (*)
		W-Uni	r = 0.04 (NS)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
	Herbivorous (n = 11)	BC	r = 0.53 (***)	nRF = 0.56 (***)	nMC = 0.21 (***)
		U-Uni	r = 0.05 (NS)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.45 (*)
		W-Uni	r = 0.23 (NS)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.48 (*)
	Omnivorous (n = 6)	BC	r = 0.40 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.42 (*)
		U-Uni	r = 0.05 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		W-Uni	r = 0.61 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.42 (*)
Clostridium_sensu_stricto_1	All species (n = 44)	BC	r = 0.25 (***)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.73 (*)
		U-Uni	r = 0.17 (*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.79 (NS)
		W-Uni	r = - 0.11 (NS)	nRF = 0.98 (NS)	nMC = 0.83 (NS)

	Carnivorous (n = 29)	BC	r = 0.08 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.65 (*)
		U-Uni	r = 0.18 (*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
		W-Uni	r = - 0.16 (NS)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.81 (NS)
	Herbivorous (n = 9)	BC	r = 0.17 (NS)	nRF = 0.71 (NS)	nMC = 0.54 (NS)
		U-Uni	r = 0.23 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.61 (NS)
		W-Uni	r = 0.09 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.71 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	BC	r = 0.17 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		U-Uni	r = - 0.31 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		W-Uni	r = - 0.17 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
Lachnospiraceae	All species (n = 47)	BC	r = 0.01 (NS)	nRF = 0.98 (NS)	nMC = 0.99 (NS)
		U-Uni	r = 0.11 (NS)	nRF = 0.93 (**)	nMC = 0.76 (NS)
		W-Uni	r = -0.19 (NS)	nRF = 0.98 (NS)	nMC = 0.95 (NS)
	Carnivorous (n = 30)	BC	r = 0.16 (NS)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.70 (*)
		U-Uni	r = 0.17 (NS*)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.68 (*)
		W-Uni	r = 0.09 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.78 (NS)
	Herbivorous (n = 11)	BC	r = 0.05 (NS)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.62 (NS)
		U-Uni	r = 0.17 (NS)	nRF = 0.89 (NS)	nMC = 0.63 (NS)
		W-Uni	r = - 0.30 (NS)	nRF = 0.89 (NS)	nMC = 0.76 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	BC	r = 0.03 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		U-Uni	r = - 0.22 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		W-Uni	r = - 0.01 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
Epulopiscium	All species (n = 44)	BC	r = - 0.04 (NS)	nRF = 0.95 (*)	nMC = 0.75 (NS)
		U-Uni	r = 0.10 (*)	nRF = 0.98 (NS)	nMC = 0.72 (NS)
		W-Uni	r = 0.01 (NS)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.78 (NS)
	Carnivorous (n = 28)	BC	r = - 0.04 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.72 (NS)
		U-Uni	r = 0.03 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
		W-Uni	r = - 0.06 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.82 (NS)
	Herbivorous (n = 11)	BC	r = 0.17 (NS)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.71 (NS)
		U-Uni	r = 0.23 (*)	nRF = 0.89 (NS)	nMC = 0.575 (NS)
		W-Uni	r = 0.09 (NS)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.62 (NS)
	Omnivorous (n = 5)	BC	r = - 0.04 (NS)	nRF = 0.67 (NS)	nMC = 0.43 (NS)
		U-Uni	r = - 0.74 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 1.00 (NS)
		W-Uni	r = 0.37 (NS)	nRF = 0.33 (NS*)	nMC = 0.43 (NS)
Proteobacteria	All species (n = 48)	BC	r = 0.17 (*)	nRF = 0.97 (*)	nMC = 0.81 (NS)
		U-Uni	r = 0.30 (***)	nRF = 0.96 (*)	nMC = 0.63 (***)
		W-Uni	r = 0.02 (NS)	nRF = 0.98 (NS)	nMC = 0.84 (NS)
	Carnivorous (n = 31)	BC	r = 0.26 (**)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.70 (*)
		U-Uni	r = 0.39 (***)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.55 (***)
		W-Uni	r = 0.18 (NS*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.71 (NS)
	Herbivorous (n = 11)	BC	r = 0.46 (**)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.57 (NS)
		U-Uni	r = 0.61 (**)	nRF = 0.67 (**)	nMC = 0.38 (**)

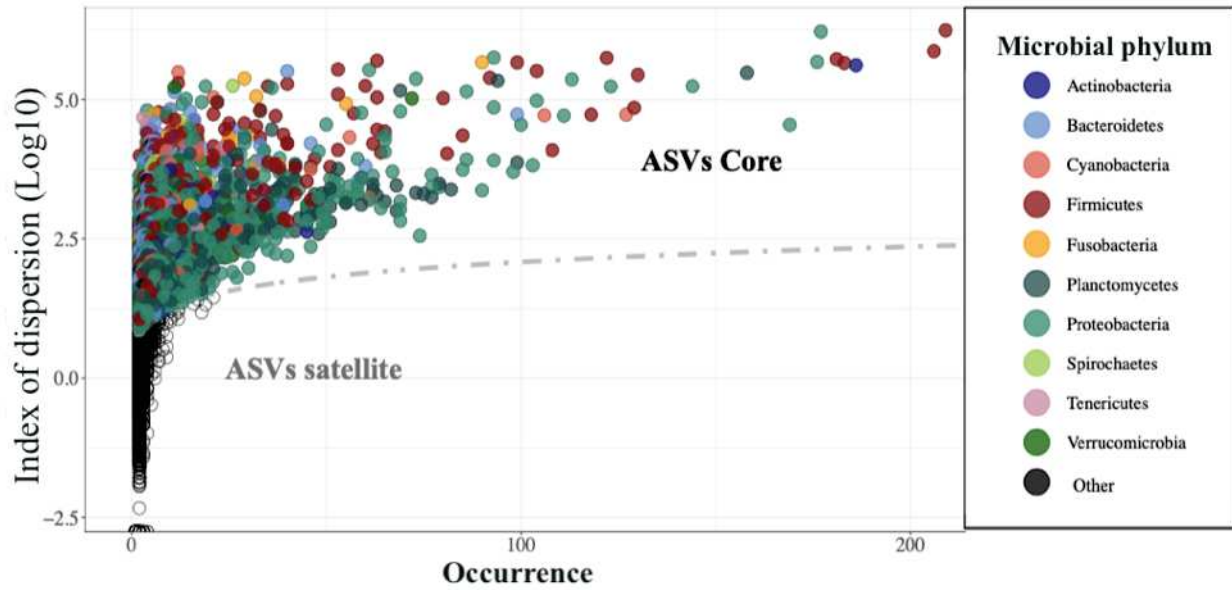
Rhodobacterales	Omnivorous (n = 6)	W-Uni	r = 0.27 (*)	nRF = 0.78 (*)	nMC = 0.48 (*)
		BC	r = -0.36 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
		U-Uni	r = 0.02 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
	All species (n = 43)	W-Uni	r = -0.32 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		BC	r = 0.39 (***)	nRF = 0.93 (***)	nMC = 0.67 (**)
		U-Uni	r = 0.20 (**)	nRF = 0.93 (***)	nMC = 0.86 (NS)
	Carnivorous (n = 28)	W-Uni	r = 0.18 (*)	nRF = 0.95 (*)	nMC = 1.15 (NS)
		BC	r = 0.42 (**)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.59 (***)
		U-Uni	r = 0.18 (**)	nRF = 0.92 (*)	nMC = 0.80 (NS)
	Herbivorous (n = 9)	W-Uni	r = 0.08 (NS)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		BC	r = 0.28 (NS)	nRF = 0.86 (NS)	nMC = 0.40 (*)
		U-Uni	r = 0.20 (NS)	nRF = 0.86 (NS)	nMC = 0.47 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	W-Uni	r = 0.15 (NS)	nRF = 0.86 (NS)	nMC = 0.73 (NS)
		BC	r = - 0.09 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
		U-Uni	r = 0.05 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 1.00 (NS)
	All triplicate (n = 38)	W-Uni	r = - 0.36 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		BC	r = 0.30 (**)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 1.06 (NS)
		U-Uni	r = 0.32 (***)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.66 (*)
	Carnivorous (n = 23)	W-Uni	r = 0.34 (***)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.78 (NS)
		BC	r = 0.31 (*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.78 (NS)
		U-Uni	r = 0.42 (**)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.66 (NS)
	Herbivorous (n = 9)	W-Uni	r = 0.41 (**)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.73 (NS)
		BC	r = 0.23 (NS*)	nRF = 0.86 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		U-Uni	r = 0.20 (NS)	nRF = 0.57 (**)	nMC = 0.40 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	W-Uni	r = 0.12 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.60 (NS)
		BC	r = - 0.10 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		U-Uni	r = - 0.16 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
Rhizobiales	All species (n = 45)	W-Uni	r = - 0.32 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
		BC	r = 0.01 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.79 (NS)
		U-Uni	r = 0.11 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.76 (NS)
	Carnivorous (n = 30)	W-Uni	r = -0.19 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.97 (NS)
		BC	r = - 0.01 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.74 (NS*)
		U-Uni	r = 0.16 (NS*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.77 (NS)
	Herbivorous (n = 9)	W-Uni	r = - 0.14 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.79 (NS)
		BC	r = 0.11 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.68 (NS)
		U-Uni	r = 0.40 (*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.64 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	W-Uni	r = - 0.3 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.71 (NS)
		BC	r = - 0.51 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		U-Uni	r = - 0.25 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
Planctomycetes	All species	W-Uni	r = - 0.31 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.92 (NS)
		BC	r = 0.26 (**)	nRF = 0.90 (***)	nMC = 1.09 (NS)

Pirellulales	(n = 44)	U-Uni	r = 0.37 (***)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.72 (NS)
		W-Uni	r = 0.37 (***)	nRF = 0.93 (**)	nMC = 0.82 (NS)
		BC	r = 0.34 (**)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.71 (NS)
	Carnivorous (n = 28)	U-Uni	r = 0.50 (***)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.60 (**)
		W-Uni	r = 0.44 (***)	nRF = 0.88 (**)	nMC = 0.61 (**)
		BC	r = 0.27 (*)	nRF = 0.75 (*)	nMC = 0.67 (NS)
	Herbivorous (n = 10)	U-Uni	r = 0.24 (*)	nRF = 0.75 (*)	nMC = 0.5 (NS)
		W-Uni	r = 0.14 (NS)	nRF = 0.88 (NS)	nMC = 0.85 (NS)
		BC	r = 0.05 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	U-Uni	r = - 0.28 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.58 (NS)
		W-Uni	r = - 0.27 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		BC	r = 0.26 (**)	nRF = 0.90 (***)	nMC = 1.06 (NS)
	All species (n = 44)	U-Uni	r = 0.39 (***)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.69 (*)
		W-Uni	r = 0.37 (***)	nRF = 0.93 (**)	nMC = 0.84 (NS)
		BC	r = 0.34 (**)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.73 (NS)
	Carnivorous (n = 28)	U-Uni	r = 0.52 (***)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.57 (***)
		W-Uni	r = 0.44 (***)	nRF = 0.88 (**)	nMC = 0.64 (**)
		BC	r = 0.27 (*)	nRF = 0.75 (*)	nMC = 0.67 (NS)
	Herbivorous (n = 10)	U-Uni	r = 0.20 (NS*)	nRF = 0.88 (NS)	nMC = 0.58 (NS)
		W-Uni	r = 0.15 (NS)	nRF = 0.88 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		BC	r = 0.05 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	U-Uni	r = - 0.29 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		W-Uni	r = - 0.25 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		BC	r = 0.18 (*)	nRF = 0.93 (***)	nMC = 0.80 (NS)
Cyanobacteria	All species (n=44)	U-Uni	r = 0.13 (NS*)	nRF = 0.93 (**)	nMC = 0.68 (*)
		W-Uni	r = 0.10 (NS*)	nRF = 0.98 (NS)	nMC = 0.81 (NS)
		BC	r = 0.17 (NS*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.70 (NS*)
	Carnivorous (n = 29)	U-Uni	r = 0.11 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.71 (NS*)
		W-Uni	r = 0.10 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.79 (NS)
		BC	r = 0.38 (*)	nRF = 0.57 (**)	nMC = 0.52 (NS)
	Herbivorous (n = 9)	U-Uni	r = 0.11 (NS)	nRF = 0.71 (NS*)	nMC = 0.63 (NS)
		W-Uni	r = 0.27 (NS*)	nRF = 0.86 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		BC	r = 0.05 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	U-Uni	r = -0.11 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		W-Uni	r = 0.00 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.83 (NS)
		BC	r = 0.14 (**)	nRF = 0.98 (NS)	nMC = 0.75 (NS*)
Bacteroidetes	All species (n = 48)	U-Uni	r = 0.21 (***)	nRF = 0.89 (NS)	nMC = 0.60 (***)
		W-Uni	r = 0.07 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.80 (NS)
		BC	r = 0.05 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.66 (NS)
	Carnivorous (n=31)	U-Uni	r = 0.06 (NS)	nRF = 0.90 (***)	nMC = 0.66 (**)
		W-Uni	r = 0.03 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.70 (NS)
		BC	r = 0.05 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.66 (NS)

Fusobacteria	Herbivorous (n = 11)	BC	r = 0.39 (*)	nRF = 0.89 (NS)	nMC = 0.57 (NS)
		U-Uni	r = 0.45 (*)	nRF = 0.67 (**)	nMC = 0.48 (*)
		W-Uni	r = 0.35 (*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.57 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	BC	r = -0.15 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.92 (NS)
		U-Uni	r = 0.39 (NS)	nRF = 0.5 (NS*)	nMC = 0.5 (NS)
		W-Uni	r = -0.51 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
	All species (n = 41)	BC	r = 0.02 (NS)	nRF = 0.95 (NS)	nMC = 0.76 (NS)
		U-Uni	r = -0.01 (NS)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.63 (***)
		W-Uni	r = -0.06 (NS)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.70 (*)
	Carnivorous (n = 26)	BC	r = 0.08 (NS)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.58 (*)
		U-Uni	r = 0.14 (NS)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.60 (**)
		W-Uni	r = 0.01 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.62 (**)
	Herbivorous (n = 10)	BC	r = 0.12 (NS)	nRF = 0.88 (NS)	nMC = 0.59 (NS)
		U-Uni	r = 0.04 (*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.53 (NS)
		W-Uni	r = 0.33 (*)	nRF = 0.75 (*)	nMC = 0.44 (*)
	Omnivorous (n = 5)	BC	r = 0.03 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 1.00 (NS)
		U-Uni	r = 0.03 (NS)	nRF = 0.67 (NS)	nMC = 0.57 (NS)
		W-Uni	r = -0.01 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 1.00 (NS)
Tenericutes	All triplicate (n = 33)	BC	r = 0.29 (***)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.70 (NS)
		U-Uni	r = 0.03 (NS)	nRF = 0.94 (*)	nMC = 0.62 (***)
		W-Uni	r = -0.05 (NS)	nRF = 0.94 (*)	nMC = 0.72 (NS)
	Carnivorous (n = 21)	BC	r = 0.32 (**)	nRF = 0.95 (NS)	nMC = 0.72 (NS)
		U-Uni	r = 0.02 (NS)	nRF = 0.90 (*)	nMC = 0.58 (*)
		W-Uni	r = -0.20 (NS)	nRF = 0.89 (*)	nMC = 0.74 (NS)
	Herbivorous (n = 10)	BC	r = 0.05 (NS)	nRF = 0.50 (NS*)	nMC = 0.42 (NS)
		U-Uni	r = -0.10 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
		W-Uni	r = 0.04 (NS)	nRF = 0.50 (NS*)	nMC = 0.42 (NS)
	Omnivorous (n = 6)	BC	r = 0.00 (NS)	nRF = 0.50 (NS*)	nMC = 0.67 (NS)
		U-Uni	r = 0.32 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.5 (NS)
		W-Uni	r = 0.44 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.67 (NS)
Verrucomicrobia	All species (n = 41)	BC	r = 0.17 (*)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.76 (NS)
		U-Uni	r = 0.13 (*)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.78 (NS)
		W-Uni	r = 0.10 (*)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.81 (NS)
	Carnivorous (n = 25)	BC	r = 0.10 (NS)	nRF = 0.91 (*)	nMC = 0.61 (*)
		U-Uni	r = 0.17 (NS*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.66 (NS)
		W-Uni	r = 0.07 (NS)	nRF = 0.96 (NS)	nMC = 0.70 (NS)
	Herbivorous (n = 10)	BC	r = 0.13 (NS)	nRF = 0.88 (NS)	nMC = 0.58 (NS)
		U-Uni	r = 0.41 (*)	nRF = 0.88 (NS)	nMC = 0.42 (*)
		W-Uni	r = 0.37 (*)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.53 (NS)
	Omnivorous	BC	r = 0.24 (NS)	nRF = 0.75 (NS)	nMC = 0.67 (NS)

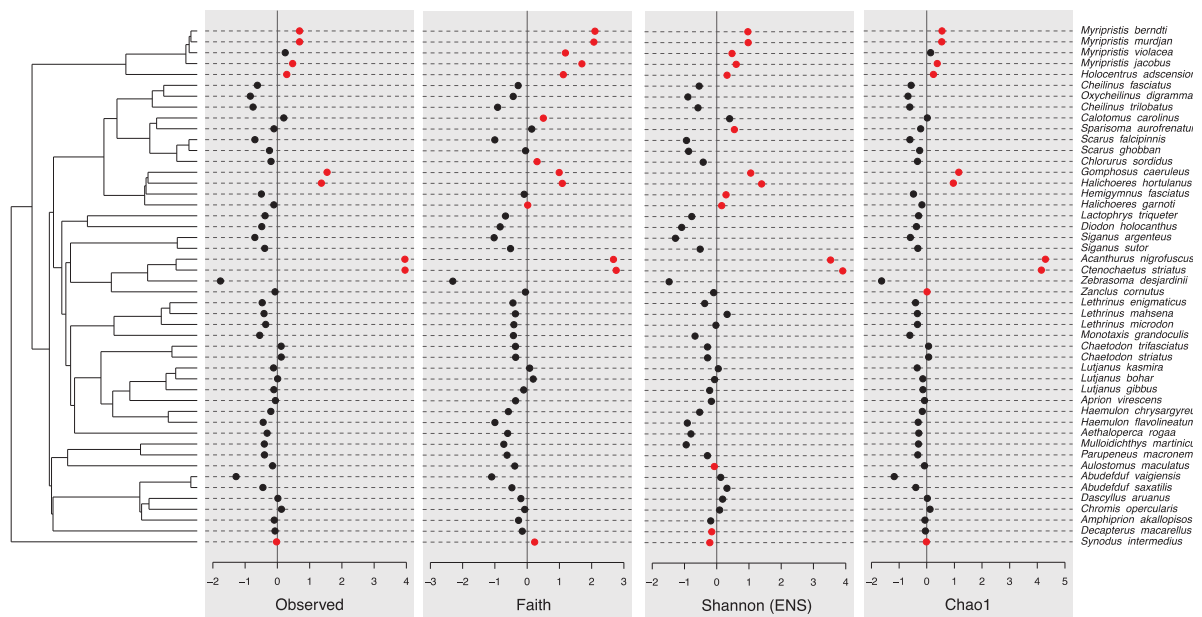
Spirochaetes	(n = 6)	U-Uni	r = 0.52 (*)	nRF = 0.50 (NS*)	nMC = 0.5 (NS)
		W-Uni	r = 0.21 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.75 (NS)
	All species (n = 31)	BC	r = 0.02 (NS)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.56 (NS)
		U-Uni	r = 0.00 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.69 (NS)
		W-Uni	r = 0.05 (NS)	nRF = 0.97 (NS)	nMC = 0.77 (NS)
	Carnivorous (n = 20)	BC	r = 0.10 (NS)	nRF = 0.94 (NS)	nMC = 0.64 (NS)
		U-Uni	r = -0.04 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.64 (NS)
		W-Uni	r = 0.05 (NS)	nRF = 0.94 (NS)	nMC = 0.74 (NS)
	Herbivorous (n = 10)	BC	r = -0.06 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.78 (NS)
		U-Uni	r = -0.07 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.89 (NS)
		W-Uni	r = -0.13 (NS)	nRF = 1.00 (NS)	nMC = 0.70 (NS)
	Omnivorous (n = 2)	BC	-	-	-
		U-Uni	-	-	-
		W-Uni	-	-	-

Supplementary material – Manuscript C



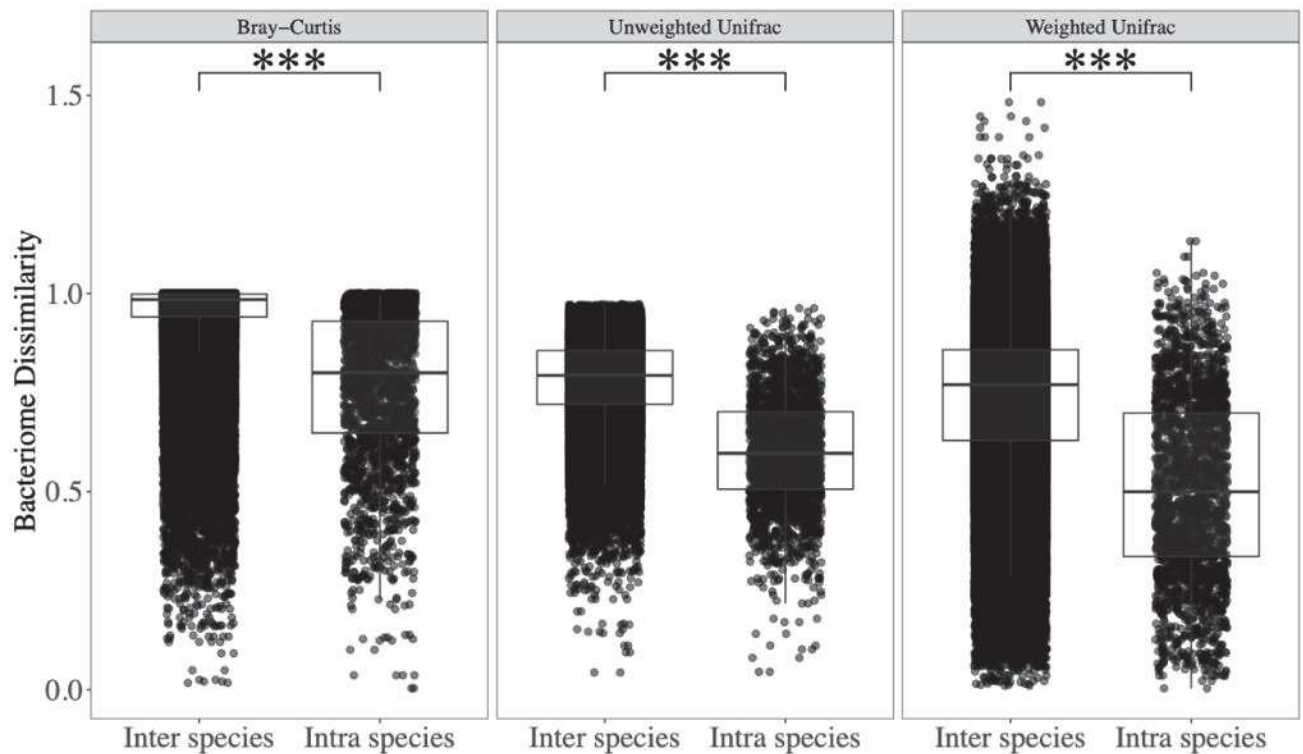
Supplemental Figure 1 : Species abundance distribution (SAD) pattern of bacterial ASVs in the fish gut. Occurrence of each ASV is plotted against its dispersion index. The line depicts the 2.5% confidence limit of the Chi2 distribution: ASVs falling below this line follow a Poisson distribution and are randomly dispersed within bacteriomes.

Supplementary material – Manuscript C



Supplemental Figure 2 : Alpha diversity of gut bacteriome between trophic guilds in bold (*i.e.* Carnivores, Omnivores and Herbivores) and the intra-dietary levels. Alpha diversity is expressed in phylogenetic diversity (PD) with the Faith's index (A) and in taxonomical diversity with the observed richness (B) and the Shannon's index H exponentially transformed in Effective Number of Species (ENS) (C).

Supplementary material – Manuscript C



Supplemental Figure 3 : Fish gut bacteriome dissimilarities between individuals of the same fish species (*i.e.* intraspecific, $n = 101$ species with more than 1 individual) and among individuals from different species (*i.e.* interspecific, $n = 101$ species). Dissimilarities were calculated using the Bray-Curtis, Weighted Unifrac and Unweighted Unifrac metrics. Boxes represent the interquartile range dissimilarity values. Thick bars represent the median of dissimilarity values, and vertical segments extend to the fifth and the 95th percentiles of the distribution of values. Horizontal brackets indicate pairs which differ significantly: *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05) or not (NS.) with a Wilcoxon test.

[illegible]

331

8. II. D – Supplementary material – **Manuscrit D**

Supplementary material

Is the assertion « I am what I eat » true in coral fish?

Authors : Marie-Charlotte Cheutin¹, Sébastien Villéger¹, Christina C. Hicks², James P. W. Robinson², Nicholas A. J. Graham², Clémence Marconnet¹, Claudia Ximena Ortiz Restrepo¹, Jean-Baptiste Juhel¹, Eva Maire², Elliott Sucré³, Virginie Marques¹, Cassandra Benkwitt², Rachel L. Gunn², Eilish Richards⁴, Camille Albouy⁵, Marc Trousselier¹, Giulia Donati⁴, Loic Pelissier⁴, Thierry Bouvier¹, Jean-Christophe Auguet¹

¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

³ Centre Universitaire de Mayotte, Route Nationale 3, BP53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

⁴ETH, Universität Zürich, 8092 Zürich, Switzerland

⁵ IFREMER, Unité Ecologie et Modèles pour l'Halieutique, EMH, Nantes Cedex 3, France

Key-words : gut bacteriome ; dietary strategy ; carnivorous ; reef fish ; taxonomic and phylogenetic diversity ; functional prediction diversity

Supplementary material – Manuscript D

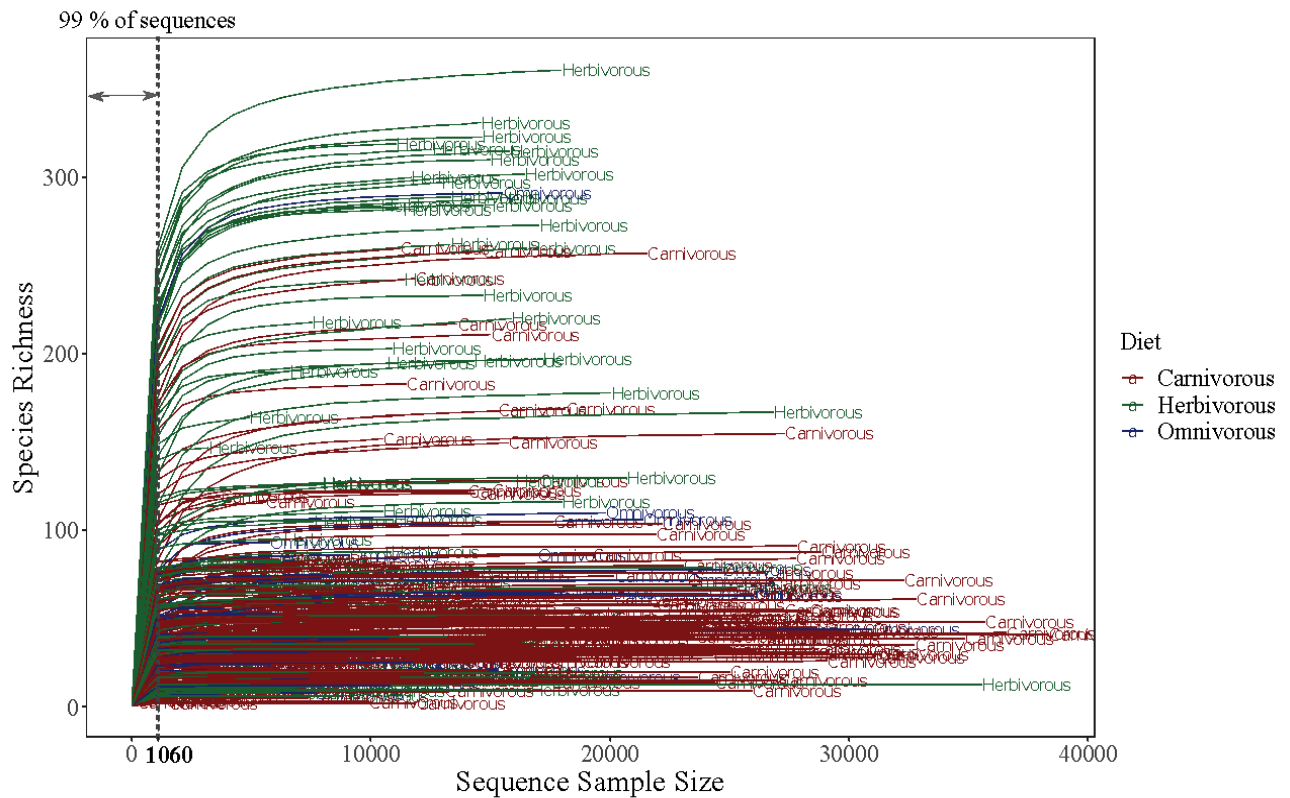
Supplemental Table 1 : Sampling size of host fish species with their corresponding diet (according to the prey items indicated in FishBase) and their diet predicted (following the model of Parravicini et al., 2020). *HMD = Herbivores Microvores Detritivores.

Family	Species	Diet	Prediction	n
Acanthuridae	Acanthurus bahianus	Herbivorous	HMD	1
	Acanthurus nigrofusus	Herbivorous	HMD	1
				2
	Ctenochaetus binotatus	Herbivorous	HMD	1
	Ctenochaetus striatus	Herbivorous	HMD	1
				8
	Zebrasoma desjardini	Herbivorous	HMD	4
Aulostomidae	Aulostomus maculatus	Carnivorous	Piscivores	3
Balistidae	Melichthys niger	Omnivorous	HMD	1
Carangidae	Carangoides fulvoguttatus	Carnivorous	Piscivores	1
	Carangoides plagiotaenia	Carnivorous	Piscivores	1
	Caranx melampygus	Carnivorous	Piscivores	2
	Decapterus macarellus	Carnivorous	Microinvertivores	4
Chaetodontidae	Chaetodon guttatissimus	Omnivorous	Corallivores	1
	Chaetodon striatus	Carnivorous	Corallivores	3
	Chaetodon trifasciatus	Carnivorous	Corallivores	5
Cirrhitidae	Paracirrhites forsteri	Carnivorous	Crustacivores	1
Diodontidae	Diodon holocanthus	Carnivorous	Macroinvertivores	3
Haemulidae	Haemulon chrysargyreum	Carnivorous	Crustacivores	3
	Haemulon flavolineatum	Carnivorous	Microinvertivores	6
	Haemulon vittatum	Carnivorous	Planktivores	1
Holocentridae	Holocentrus adscensionis	Carnivorous	Crustacivores	4
	Holocentrus rufus	Carnivorous	Crustacivores	2
	Myripristis adusta	Carnivorous	Crustacivores	1
	Myripristis berndti	Carnivorous	Crustacivores	3
	Myripristis jacobus	Carnivorous	Crustacivores	7
	Myripristis murdjan	Carnivorous	Crustacivores	3
	Myripristis pralinia	Carnivorous	Crustacivores	1
	Myripristis violacea	Carnivorous	Crustacivores	1
Kyphosidae	Kyphosus sectatrix	Herbivorous	HMD	1
Labridae	Calotomus carolinus	Herbivorous	HMD	6
	Cheilinus fasciatus	Carnivorous	Crustacivores	4
	Cheilinus trilobatus	Carnivorous	Macroinvertivores	3
	Chlorurus sordidus	Herbivorous	HMD	7
	Clepticus parrae	Carnivorous	Planktivores	2

	<i>Coris formosa</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	1
	<i>Epibulus insidiator</i>	Carnivorous	Crustacivores	1
	<i>Gomphosus caeruleus</i>	Carnivorous	Microinvertivores	7
	<i>Halichoeres garnoti</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	8
	<i>Halichoeres hortulanus</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	1
				0
	<i>Hemigymnus fasciatus</i>	Carnivorous	Planktivores	5
	<i>Oxycheilinus digramma</i>	Carnivorous	Crustacivores	5
	<i>Scarus caudofasciatus</i>	Herbivorous	HMD	1
	<i>Scarus falcipinnis</i>	Herbivorous	HMD	3
	<i>Scarus ghobban</i>	Herbivorous	HMD	7
	<i>Scarus iseri</i>	Herbivorous	HMD	2
	<i>Scarus niger</i>	Herbivorous	HMD	2
	<i>Scarus psittacus</i>	Herbivorous	HMD	1
	<i>Scarus rubroviolaceus</i>	Herbivorous	HMD	2
	<i>Scarus sp.</i>	Herbivorous	HMD	4
	<i>Scarus tricolor</i>	Herbivorous	HMD	2
	<i>Sparisoma aurofrenatum</i>	Herbivorous	HMD	5
	<i>Sparisoma axillare</i>	Herbivorous	HMD	1
	<i>Sparisoma viride</i>	Herbivorous	HMD	1
Lethrinidae	<i>Lethrinus enigmaticus</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	6
	<i>Lethrinus mahsena</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	1
				0
	<i>Lethrinus microdon</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	5
	<i>Lethrinus nebulosus</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	2
	<i>Lethrinus variegatus</i>	Carnivorous	Microinvertivores	2
	<i>Lethrinus xanthochilus</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	1
	<i>Monotaxis grandoculis</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	1
				6
Lutjanidae	<i>Aprion virescens</i>	Carnivorous	Piscivores	8
	<i>Lutjanus bohar</i>	Carnivorous	Crustacivores	7
	<i>Lutjanus fulviflamma</i>	Carnivorous	Crustacivores	2
	<i>Lutjanus gibbus</i>	Carnivorous	Crustacivores	8
	<i>Lutjanus griseus</i>	Carnivorous	Crustacivores	1
	<i>Lutjanus kasmira</i>	Carnivorous	Crustacivores	1
				4
	<i>Lutjanus vitta</i>	Carnivorous	Crustacivores	1
Monacanthidae	<i>Aluterus schoepfii</i>	Herbivorous	HMD	1
	<i>Aluterus scriptus</i>	Omnivorous	Corallivores	2
	<i>Cantherhines macrocerus</i>	Omnivorous	sessile invertivores	1
	<i>Cantherhines pardalis</i>	Omnivorous	sessile invertivores	2
	<i>Cantherhines striatus</i>	Omnivorous	sessile invertivores	1
Mullidae	<i>Mulloidichthys martinicus</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	1
				0
	<i>Parupeneus barberinus</i>	Carnivorous	Crustacivores	2

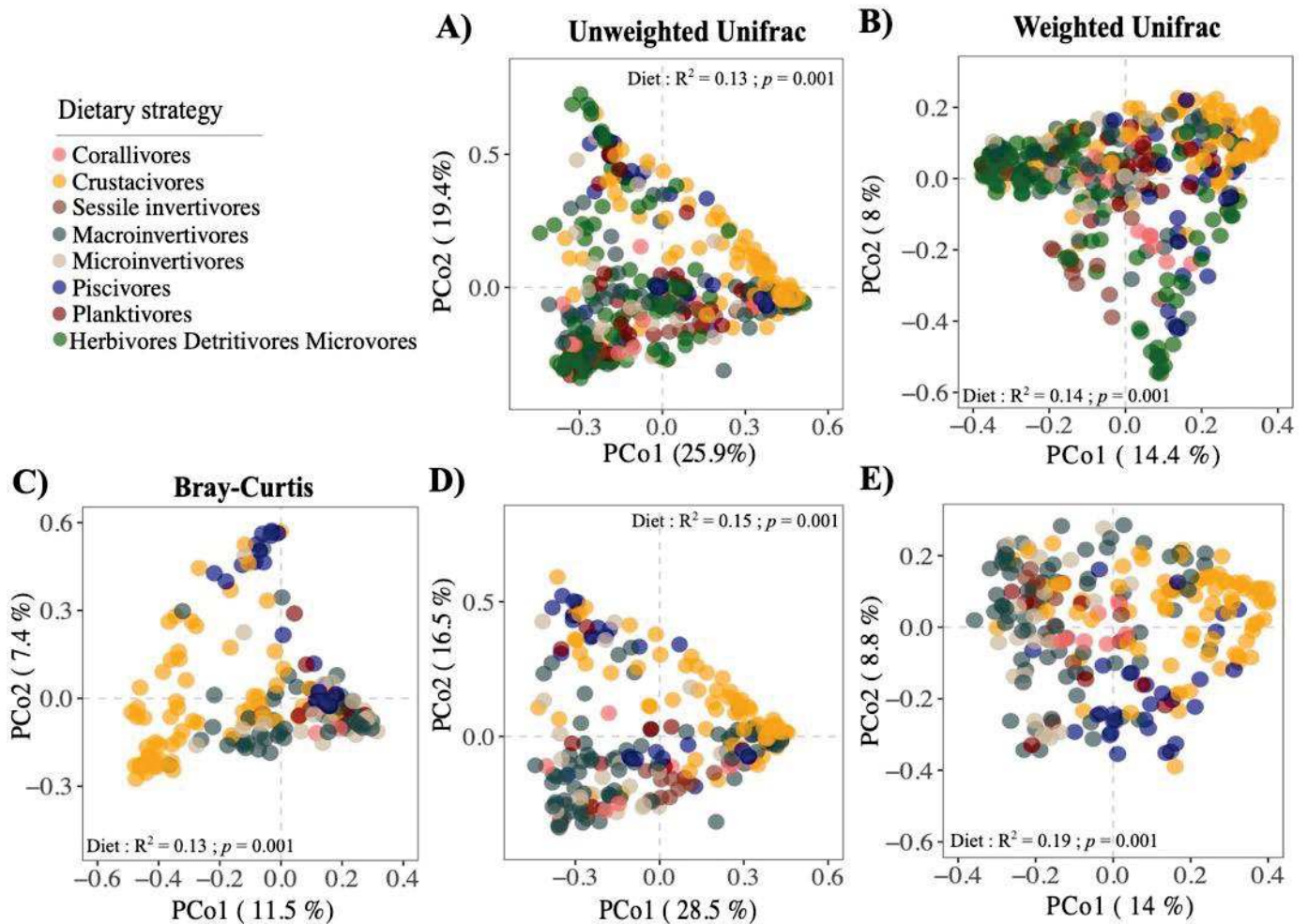
	<i>Parupeneus macronemus</i>	Omnivorous	Microinvertivores	3
	<i>Pseudupeneus maculatus</i>	Carnivorous	Crustacivores	1
Ostraciidae	<i>Lactophrys triqueter</i>	Carnivorous	Microinvertivores	4
Pinguipedidae	<i>Parapercis hexophthalma</i>	Carnivorous	Crustacivores	2
	<i>Abudefduf saxatilis</i>	Omnivorous	Planktivores	3
	<i>Abudefduf sparoides</i>	Omnivorous	Planktivores	2
	<i>Abudefduf vaigiensis</i>	Omnivorous	Planktivores	4
	<i>Amphiprion akallopisos</i>	Omnivorous	HMD	3
Pomacentridae	<i>Chromis opercularis</i>	Omnivorous	Planktivores	4
	<i>Chromis weberi</i>	Carnivorous	Planktivores	1
	<i>Dascyllus aruanus</i>	Omnivorous	Planktivores	3
	<i>Lepidozygus tapeinosoma</i>	Carnivorous	Planktivores	1
	<i>Microspathodon chrysurus</i>	Herbivorous	HMD	2
	<i>Stegastes partitus</i>	Herbivorous	HMD	1
Priacanthidae	<i>Heteropriacanthus cruentatus</i>	Carnivorous	Piscivores	2
	<i>Aethaloperca rogaa</i>	Carnivorous	Piscivores	5
	<i>Cephalopholis argus</i>	Carnivorous	Piscivores	2
Serranidae	<i>Cephalopholis nigripinnis</i>	Carnivorous	Crustacivores	1
	<i>Epinephelus guttatus</i>	Carnivorous	Crustacivores	2
	<i>Epinephelus spilotoceps</i>	Carnivorous	Crustacivores	1
	<i>Pseudanthias squamipinnis</i>	Carnivorous	Crustacivores	1
	<i>Siganus argenteus</i>	Herbivorous	HMD	3
Siganidae	<i>Siganus sp.</i>	Herbivorous	HMD	3
	<i>Siganus sutor</i>	Herbivorous	HMD	1
				1
Synodontidae	<i>Synodus intermedius</i>	Carnivorous	Piscivores	5
Tetraodontidae	<i>Sphoeroides spengleri</i>	Carnivorous	Macroinvertivores	1
Zanclidae	<i>Zanclus cornutus</i>	Carnivorous	sessile invertivores	1
				1

Supplementary material – Manuscript D



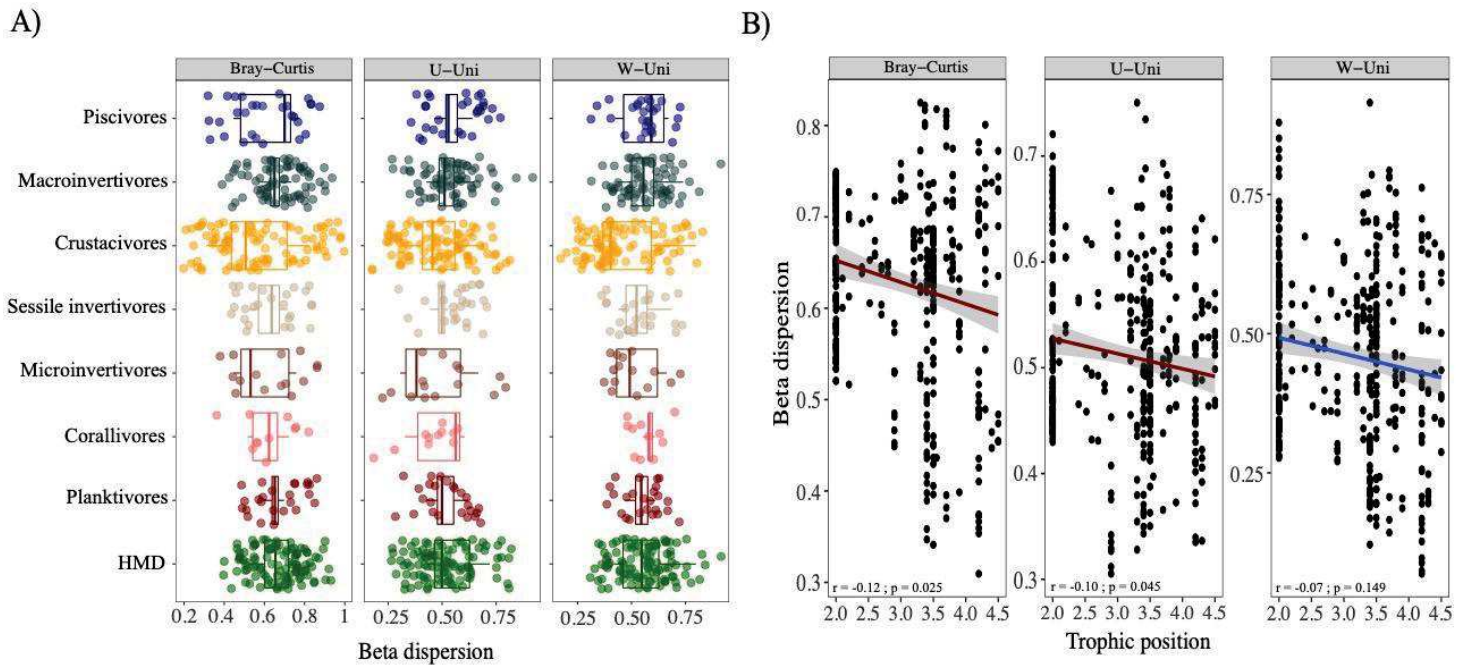
Supplemental Figure 1 : Rarefaction curve for gut bacteriome of herbivores (green), carnivores (red) and omnivores (blue), after a rarefaction at 1 060 sequences in each sample. The dotted line represents the number of sequences at which 99 % of the diversity is reached in all samples determined by the Good's coverage estimator.

Supplementary material – Manuscript D



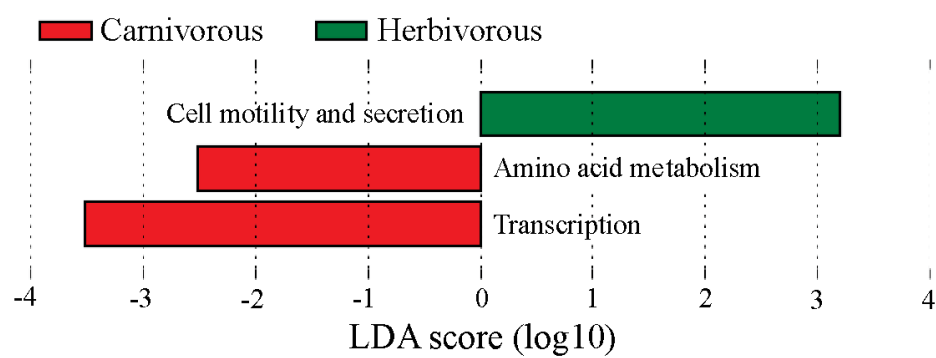
Supplemental Figure 2 : Beta diversity of fish gut core bacteriomes. Principal coordinates analysis (PCoA) plots illustrating distances between pairs of all bacteriome samples (A-B) and within bacteriomes of carnivorous samples (C-E) using Unweighted (A-D), Weighted (B-E) and Bray-Curtis (C) metrics. Bacteriomes are colored according to the dietary strategy predicted by Parravicini et al., 2020. The p and R² values of a PERMANOVA testing whether the dietary strategy has an influence are reported.

Supplementary material – Manuscript D



Supplemental Figure 3 : Effect of the trophic strategy (A) and the trophic position (B) on the beta-diversity for the Bray-Curtis, the Unweighted (U-Uni) and the Weighted Unifrac (W-Uni) distances. The Spearman rank test is used to test the correlation between the dispersion (distance to the centroid of each sample). Lines red indicate a significant correlation ($p \leq 0.05$).

Supplementary material – Manuscript D



Supplemental Figure 4 : Significant contribution (LDA score > 2) at functional level B in trophic guild after LEfSe algorithm.

8. II. E – Supplementary material – **Manuscrit E**

Supplementary material

**Microbial shift in the enteric bacteriome of coral reef fish
following climate-driven regime shifts.**

Marie-Charlotte Cheutin^{1*}, Sébastien Villéger¹, Christina C. Hicks², James P. W. Robinson²,
Nicholas A. J. Graham², Clémence Marconnet¹, Claudia Ximena Ortiz Restrepo¹, Yvan
Bettarel¹, Thierry Bouvier¹, Jean-Christophe Auguet¹

¹ UMR MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

Supplementary Material

1 Supplementary Tables

Table S1 : Inventory of the species collected in recovered coral reefs (RCR) and macroalgae shifted reefs (MSR) with their corresponding diet and taxonomy.

Family	Species	Diet	RCR	MSR
Monacanthidae (n = 2)	<i>Cantherhines pardalis</i>	Omnivore	2	0
Carangidae (n = 2)	<i>Carangoides fulvoguttatus</i>	Invertivore	0	1
	<i>Carangoides plagiotaenia</i>	Invertivore	0	1
Serranidae (n = 3)	<i>Epinephelus spilotoceps</i>	Invertivore	1	0
	<i>Aethaloperca rogaa</i>	Piscivore	0	1
	<i>Cephalopholis argus</i>	Piscivore	1	0
Labridae (n = 8)	<i>Oxycheilinus digramma</i>	Invertivore	1	0
	<i>Cheilinus fasciatus</i>	Invertivore	1	0
	<i>Cheilinus trilobatus</i>	Invertivore	1	2
	<i>Coris formosa</i>	Invertivore	1	0
	<i>Epibulus insidiator</i>	Invertivore	1	0
	<i>Hemigymnus fasciatus</i>	Invertivore	1	0
Lethrinidae (n = 26)	<i>Lethrinus enigmaticus</i>	Invertivore	3	3
	<i>Lethrinus mahsena</i>	Invertivore	3	7
	<i>Lethrinus microdon</i>	Invertivore	1	4
	<i>Lethrinus nebulosus</i>	Invertivore	1	1
	<i>Lethrinus variegatus</i>	Invertivore	2	0
	<i>Lethrinus xanthochilus</i>	Invertivore	1	0
Lutjanidae (n = 14)	<i>Aprion virescens</i>	Piscivore	3	4
	<i>Lutjanus fulviflamma</i>	Invertivore	2	0
	<i>Lutjanus gibbus</i>	Invertivore	0	1
	<i>Lutjanus kasmira</i>	Invertivore	0	3
	<i>Lutjanus vitta</i>	Invertivore	1	0
Scarinae (n = 22)	<i>Calotomus carolinus</i>	Browsers	5	0
	<i>Chlorurus sordidus</i>	Scrapers	1	0
	<i>Scarus falcipinnis</i>	Scrapers	3	0
	<i>Scarus ghobban</i>	Scrapers	4	3
	<i>Scarus niger</i>	Scrapers	2	0
	<i>Scarus psittacus</i>	Scrapers	1	0
	<i>Scarus rubroviolaceus</i>	Scrapers	1	0
	<i>Scarus tricolor</i>	Scrapers	2	0
Siganidae (n = 17)	<i>Siganus argenteus</i>	Browsers	0	3
	<i>Siganus sp.</i>	Browsers	1	2
	<i>Siganus sutor</i>	Browsers	0	11
Acanthuridae (n = 5)	<i>Ctenochaetus binotatus</i>	Grazers	0	1
	<i>Zebrasoma desjardinii</i>	Grazers	0	4

Supplementary Material

Family	Species	Diet	RCR	MSR
Macroalgae (n = 29)	<i>Sargassum</i>	.	3	6
	Turf	.	11	9
Total			61	67

Supplementary Material

2 Supplementary Figures

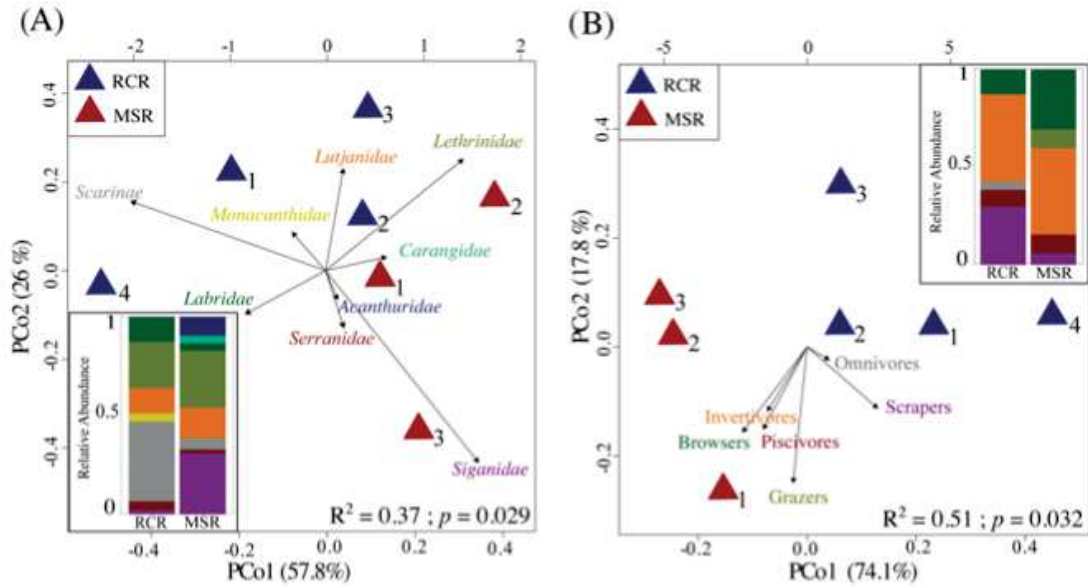


Figure S1: Principal coordinates analysis (PCoA) illustrating similarity of fish catch composition (A) and diets (B) between coral dominated reefs (RCR) and macroalgae shifted reefs (MSR).

Supplementary Material

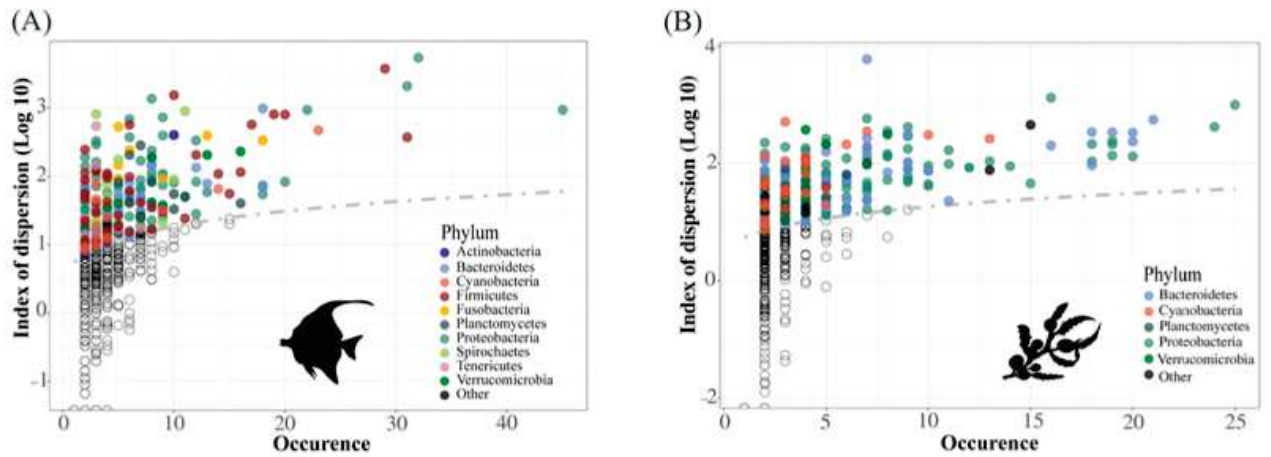


Figure S2: Species abundance distribution (SAD) pattern of bacterial ASVs in the fish gut (A) and macroalgae bacteriomes (B). Occurrence of each ASV is plotted against its dispersion index. The line depicts the 2.5% confidence limit of the Chi2 distribution: ASVs falling below this line follow a Poisson distribution and are randomly dispersed within bacteriomes.

Supplementary Material

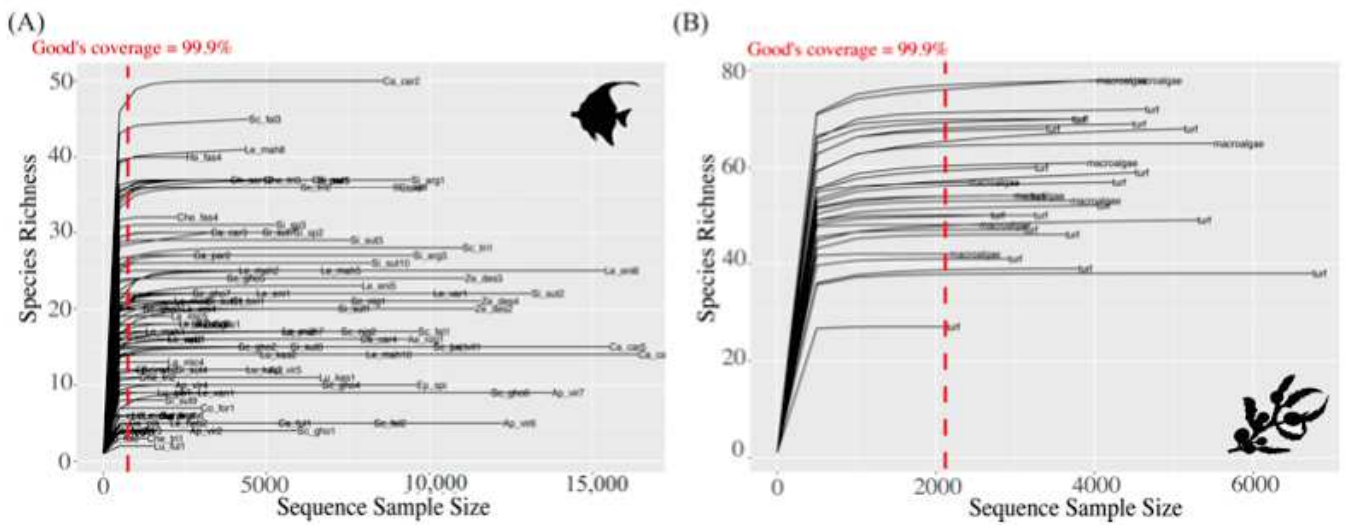


Figure S3: Rarefaction curves for each fish gut bacteriome (A) and macroalgae bacteriome (B) after a rarefaction at 1040 and 2621 sequences in each sample, respectively. The dotted line represents the number of sequences at which 99.9 % of the diversity is reached in all samples determined by the Good's coverage estimator.

Supplementary Material

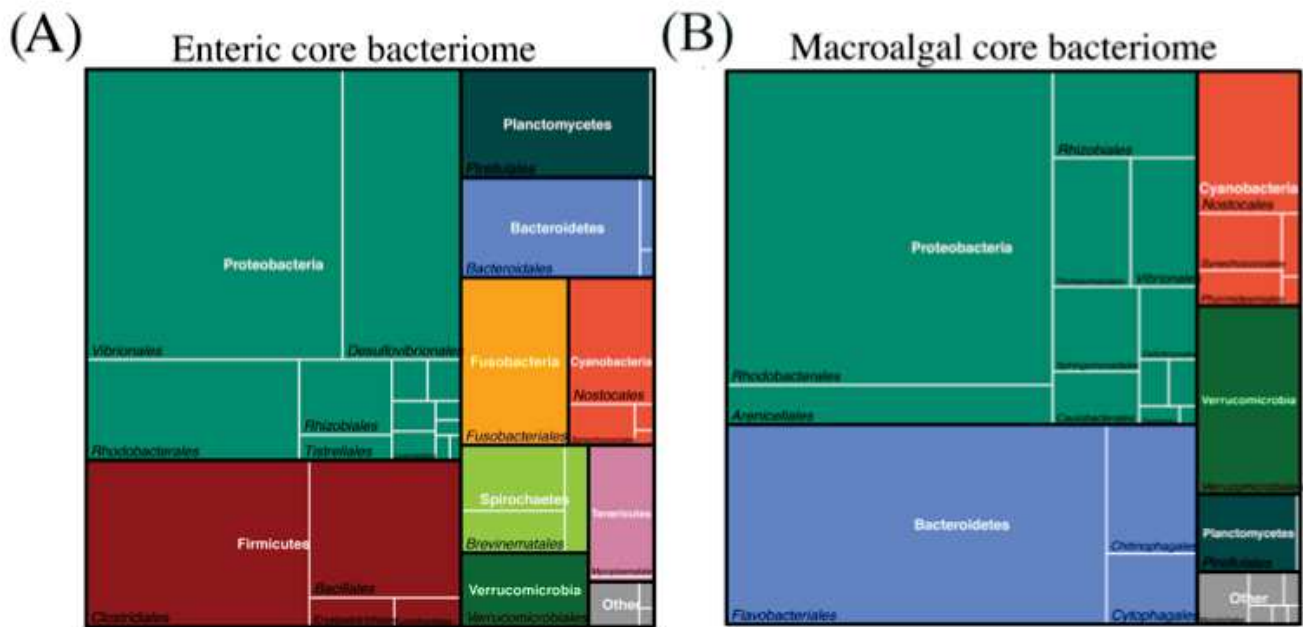


Figure S4: Treemaps of the constitutive phyla and their representative families in the enteric core bacteriome of reef fishes (A) and macroalgal core bacteriome (B).

Supplementary Material

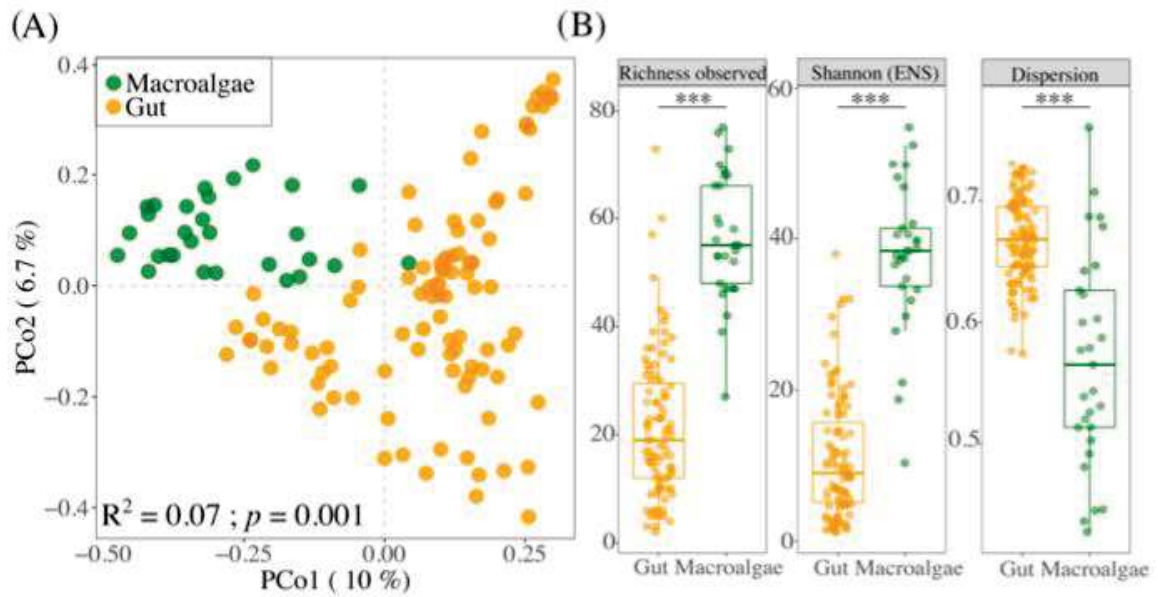


Figure S5: Beta and alpha diversity of fish gut and macroalgae bacteriomes. **(A)** Principal coordinates analysis (PCoA) plot illustrating Bray-Curtis distances between pairs of bacteriome samples. Bacteriomes are colored according to their origin: fish gut in orange and macroalgae in green. The p and R^2 values of a PERMANOVA testing whether the origin of the samples have an influence are reported. **(B)** Alpha diversity is expressed as the observed richness and the Shannon's index H – exponentially transformed in effective number of species (ENS). The dispersion of the beta diversity corresponding to the distance to the centroid for each sample type grouping is also shown. Horizontal brackets indicate pairs which differ significantly: *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05) or not (NS.) with a Wilcoxon test.

Supplementary Material

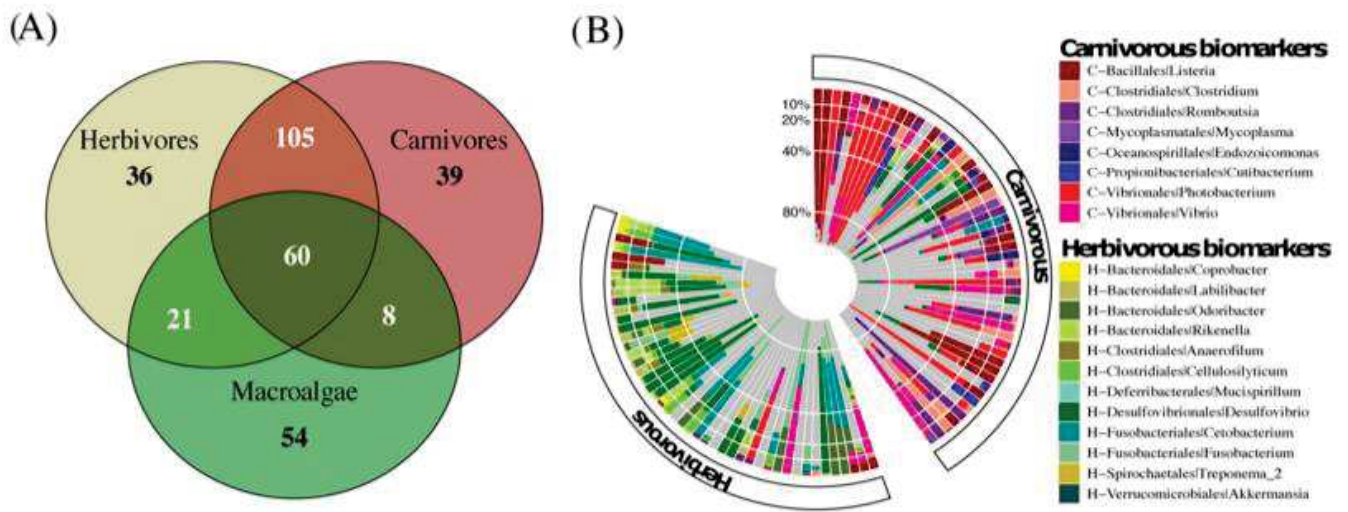


Figure S6: Venn diagram of the core ASVs between herbivores, carnivores and macroalgae bacteriomes (A) and Polar Histogram representing the relative abundance of the bacterial biomarkers for herbivores and carnivores bacteriomes (B). Biomarkers were delineated using a Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) at Genus level. Bacterial taxa were considered as biomarkers for LDA score ≥ 3 . Contribution of the non-biomarkers phyla is represented in gray.

Supplementary Material

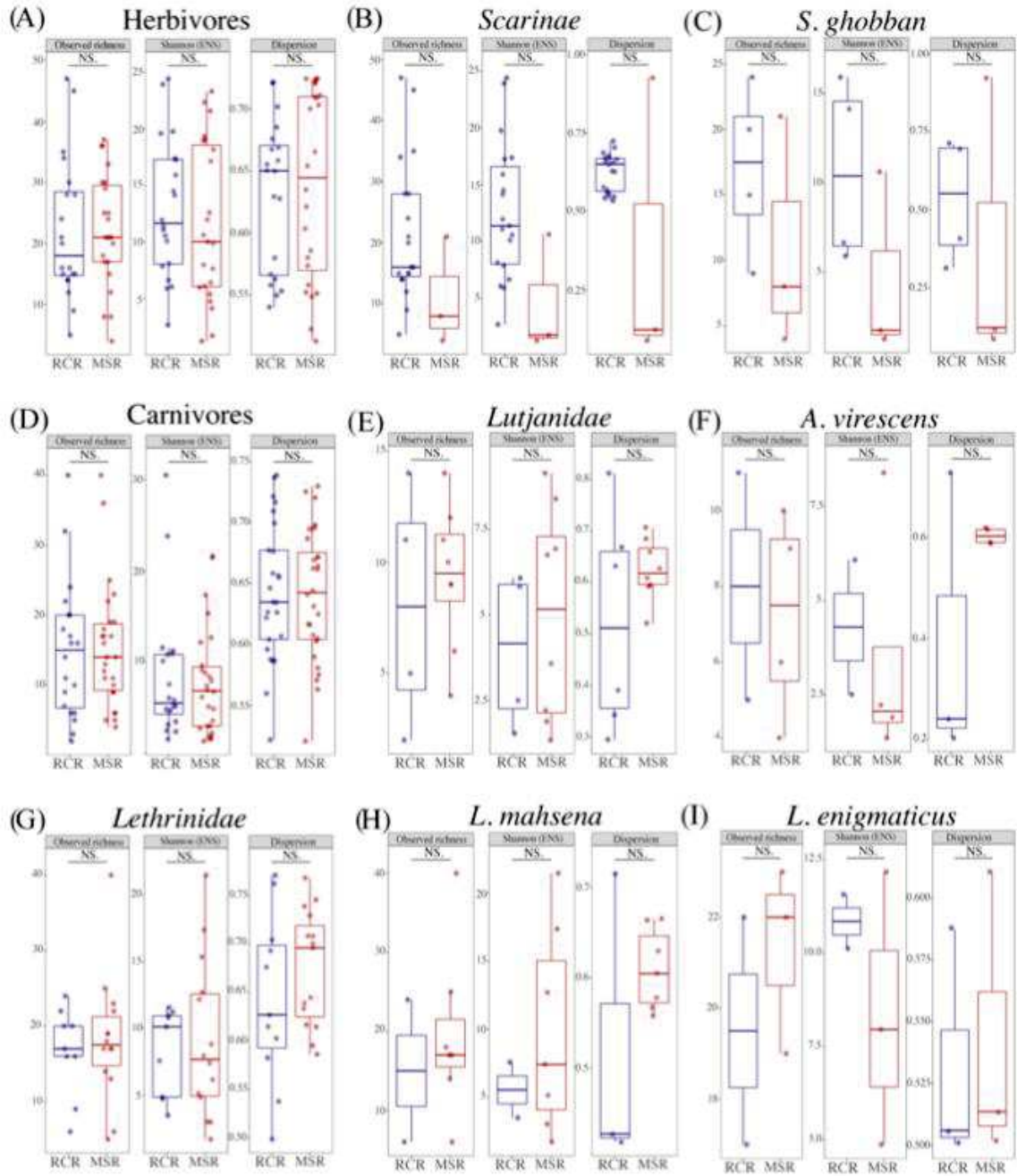


Figure S7: Boxplots representing the Alpha diversity, expressed as the observed richness and the Shannon's index H – exponentially transformed in effective number of species (ENS), and the dispersion (distance to centroid for each sample type grouping) calculated for each bacteriome sample. Horizontal brackets indicate pairs which differ significantly: *** ≤ 0.001 ; ** ≤ 0.01 ; * ≤ 0.05 or not (NS.) with a Wilcoxon test.

Supplementary Material

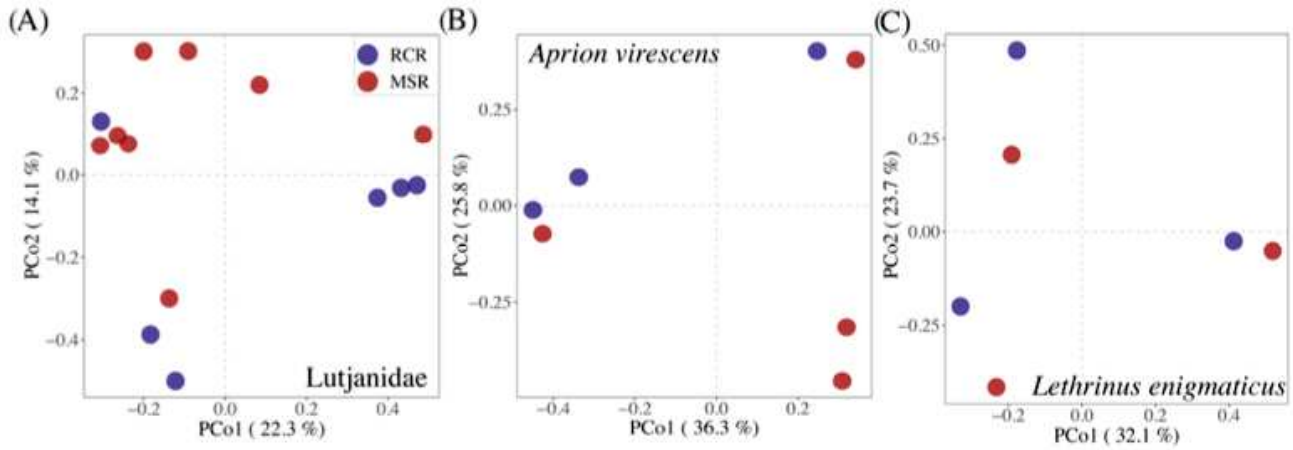


Figure S8: Principal coordinates analysis (PCoA) plot illustrating Bray-Curtis distances between pairs of bacteriome samples from the (A) *Lutjanidae*, (B) *A. virescens* and (C) *L. enigmaticus*. Bacteriomes are colored according to their origin: fish gut in orange and macroalgae in green. The p and R2 values of a PERMANOVA testing whether the origin of the samples have an influence are reported.

8. III – Collaborations *Megafauna*

Le projet *Megafauna*

La megafaune marine est la plus vulnérable face aux changements environnementaux actuels et face à la surexploitation des océans. Le projet *Megafauna*, piloté par David Mouillot de l'UMR Marbec, a pour but de comprendre la distribution de la megafaune marine dans les hot-spots de diversité (*i.e.* monts sous-marins, milieux insulaires).

Le principal outil innovant de ce projet est l'utilisation et l'optimisation des techniques d'ADN environnemental (ADNe) couplées à des observations par caméras. La technique ADNe offre une multitude d'avantages vis à vis des techniques d'observations habituelles. Elle n'est pas invasive, peut être utilisée dans des zones difficiles d'approches (*i.e.* les océans profonds), avec un coût plus réduit par rapport à un échantillonnage manuel fait à l'aide de ROV ou de pêche. Ceci-dit, son application reste assez limitée quant à la localisation précise de la source d'échantillon (*i.e.* les courants peuvent porter des échantillons d'ADN sur des kilomètres), aux approches analytiques (*i.e.* mise en place de pipelines bioinformatiques robustes) et surtout, elle reste limitée par le manque de référence dans les bases de données des marqueurs de détection (*e.g.* COI, ARNr 18S, ARNr 23S).

L'absence de référence dans les bases de données est particulièrement vraie pour les poissons coralliens. Ces missions avaient donc pour but d'échantillonner plusieurs espèces de poissons récifaux pour alimenter ces bases de données. Afin d'exploiter au maximum les échantillons, d'autres analyses se sont effectuées sur ces même poissons (*i.e.* microbiome, isotopie, morphologie), qui m'ont permis d'établir un inventaire microbien sur une large gamme d'espèces de poissons coralliens aux traits écologiques variés. J'ai donc eu la chance de pouvoir participer à deux des missions de *Megafauna*, à Santa Marta en Colombie (les échantillons de tractus intestinal n'ont pu être rapportés en France) et aux îles Eparses.

Liste des publications en collaboration, issues des missions de *Megafauna* :

1 Stauffer, S., Jucker, M., Keggin, T., Marques, V., Andrello, M., Bessudo, S., **Cheutin, M.**, Borrero-Pérez, G.H., Richards, E., Dejean, T., Hocdé, R., Juhel, J., Ladino, F., Letessier, T.B., Loiseau, N., Maire, E., Mouillot, D., Mutis Martinezguerra, M., Manel, S., Polanco Fernández, A., Valentini, A., Velez, L., Albouy, C., Pellissier, L., Waldock, C., 2021. *How many replicates to accurately estimate fish biodiversity using environmental DNA on coral reefs?*. Ecology and Evolution.. doi:[10.1002/ece3.8150](https://doi.org/10.1002/ece3.8150)

2 Polanco Fernández, A., Marques, V., Fopp, F., Juhel, J., Borrero-Pérez, G.H., **Cheutin, M.**, Dejean, T., González Corredor, J.D., Acosta-Chaparro, A., Hocdé, R., Eme, D., Maire, E., Spescha, M., Valentini, A., Manel, S., Mouillot, D., Albouy, C., Pellissier, L., 2021. *Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes*. Environmental DNA 3, 142–156.. doi:[10.1002/edn3.140](https://doi.org/10.1002/edn3.140)

3 Polanco F., A., Mutis Martinezguerra, M., Marques, V., Villa-Navarro, F., Borrero Pérez, G. H., **Cheutin, M.-C.**, Dejean, T., Hocdé, R., Juhel, J.-B., Maire, E., Manel, S., Spescha, M., Valentini, A., Mouillot, D., Albouy, C., & Pellissier, L. (2021). Detecting

aquatic and terrestrial biodiversity in a tropical estuary using environmental DNA. *Biotropica*, 00, 1– 14. doi: [10.1111/btp.13009](https://doi.org/10.1111/btp.13009)

4 Juhel, J.-B., Maire, E., Sucré, E., **Cheutin, M.-C.**, Marques, V., Benkwitt, C., Gunn, R.L., Richards, E., Albouy, C., 2019. *From the cradle to the grave: Green turtle hatchlings (Chelonia mydas) preyed upon by two-spots red snappers (Lutjanus bohar)*. Food Webs 21, e00129.. doi:[10.1016/j.fooweb.2019.e00129](https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2019.e00129)

Résumé

Le microbiome entérique est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière pour son rôle bénéfique apporté à l'hôte. Bien que les poissons téléostéens représentent l'un des plus vieux et diversifié groupe de vertébrés sur Terre, son microbiome entérique et les fonctions associées restent peu documentés en comparaison de leurs pairs terrestres. Ceci est d'autant plus vrai concernant les > 6 000 espèces coralliennes de plus en plus menacées par le changement climatique et les activités humaines. Cette thèse vise à caractériser et à quantifier la biodiversité microbienne intestinale des poissons coralliens pour identifier ses déterminants afin de mieux comprendre (i) comment les poissons téléostéens et leurs symbiotes ont co-évolué au cours de leur histoire mutuelle, et (ii) quelle est en retour l'influence de cette relation sur les flux de matière vers le milieu marin.

Dans un premier temps, nous avons pu démontrer que les archées, et principalement les méthanogènes, sont en présence de trace dans le microbiome entérique des poissons marins, suggérant une contribution négligeable dans les émissions de méthane. Cette absence semble être liée à l'abondance de bactéries sulfato-réductrices, plus compétitives dans l'utilisation d'un substrat commun (*e.g.* le dihydrogène). Nous intéressant aux mécanismes expliquant l'assemblage du bactériome intestinal des poissons téléostéens au cours de leur évolution, nos résultats apportent la première preuve d'un modèle cohérent de phyllosymbiose chez les poissons coralliens et soulignent l'effet combiné de la phylogénie de l'hôte et du régime alimentaire. Bien que jouant un rôle moins influent, le régime alimentaire structure les compositions bactériennes et leurs fonctions associées, avec une richesse et une variabilité du bactériome corrélée à la position trophique de l'hôte. Enfin, nous avons pu démontrer que la transition d'une couverture corallienne à une domination macroalgale dans les récifs influence les compositions entériques bactériennes des poissons, notamment des herbivores, avec une augmentation significative de bactéries et de métabolismes fermenteurs. Compte tenu de l'érosion croissante des systèmes coralliens, inventorier la biodiversité microbienne récifale et comprendre sa vulnérabilité face au changement climatique et aux pressions anthropiques est une problématique de conservation urgente pour le maintien des processus écologiques dans les systèmes coralliens.

Mots-clefs : Ecologie microbienne ; Poissons coralliens ; Diversité taxonomique, phylogénétique et fonctionnelle ; Méthanogenèse ; Co-évolution ; Perturbation environnementale.

Abstract

Microbes residing in the intestinal tract of teleost fish provide a range of essential functions for their host. Although fishes represent the most diverse and oldest group of vertebrates, our understanding of their gut microbiome and its functional significance is scarce in contrast to their terrestrial counterparts. This is particularly true for the >6 000 fish species living in coral reefs, whose status are severely threatened by climate change and human pressures. This thesis aims to characterise and quantify the microbial biodiversity associated to the gastro-intestinal tract of coral reef fish in order to identify its determinants to understand (i) how fish and their microbes coevolved, and (ii) what is the influence of this interaction on material flows into marine environments.

First, we demonstrated that archaea, of which methanogens, are in trace abundances in the gut microbiome of marine fishes, suggesting their negligible contribution to methane emission. This absence seems to be explained by the abundance of sulfato-reducing bacteria which compete for the utilization of common substrate (*e.g.* dihydrogen). Investigating the mechanisms underlying the bacterial assembly associated to reef fish guts, our results showed for the first time a phyllosymbiosis pattern in reef fish, supporting the combined effect of the host phylogeny and of the diet, which involves horizontal acquisition since first evolutionary steps of teleost fish. Even if its influence is lower, the diet structures bacterial compositions and their associated functions, with a richness and a bacterial variability which correlates with the host trophic positions. Finally, we investigated the influence of an environmental shift in a post-disturbed reef and demonstrated that macroalgal dominance in reefs influenced the enteric bacterial composition of coral fishes, mainly in herbivores, with a significant increase in the proportion of fermentative bacteria and associated metabolisms. Because of the ongoing erosion of coral systems, assessing the marine microbial biodiversity and its vulnerability under climatic and anthropogenic pressures is an imperative issue for their conservation.

Keywords: Microbial ecology ; Coral reef fish ; Taxonomic, phylogenetic and functional diversity ; Methanogenesis ; Phyllosymbiosis ; Environmental disturbance.