



HAL
open science

Traits écophysiologicals et comportementaux de trois espèces de crabes soumis à différents niveaux de stress anthropique dans les mangroves insulaires du Canal du Mozambique

Laura Mégevand

► **To cite this version:**

Laura Mégevand. Traits écophysiologicals et comportementaux de trois espèces de crabes soumis à différents niveaux de stress anthropique dans les mangroves insulaires du Canal du Mozambique. Ecosystèmes. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONG005 . tel-03664705

HAL Id: tel-03664705

<https://theses.hal.science/tel-03664705>

Submitted on 11 May 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 Ecophysiologie adaptative

École doctorale GAIA

Unité de recherche MARBEC

Traits écophysiologiques et comportementaux de trois espèces de crabes soumis à différents niveaux de stress anthropique dans les mangroves insulaires du Canal du Mozambique

Présentée par Laura Mégevand

Le 04 février 2022

Sous la direction de Jehan-Hervé LIGNOT
et Elliott SUCRÉ

Devant le jury composé de

Céline BOULANGÉ-LECOMTE, Professeure, Université le Havre Normandie, SEBIO

David RENAULT, Professeur, Université de Rennes, ECOBIO

Axelle CADIÈRE, Maître de Conférences HDR, Université de Nîmes, CHROME

Élodie FLEURY, Cadre de recherche, IFREMER, Laboratoire Physiologie des Invertébrés

Joséphine LEFLAIVE, Maître de Conférences HDR, Université de Toulouse, ECOLAB

Tarik MEZIANE, Professeur, MNHN Paris, BOREA

Jehan-Hervé LIGNOT, Professeur, Université de Montpellier, MARBEC

Elliott SUCRÉ, Professeur, Centre Universitaire de Mayotte

David MCKENZIE, Directeur de Recherche, CNRS, MARBEC

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

« La mangrove semble de prime abord hostile aux existences. Il est difficile d'admettre que, dans ses angoisses de racines, d'ombres moussues, d'eaux voilées, la mangrove puisse être un tel berceau de vie pour les crabes, les poissons, les langoustes, l'écosystème marin. »

Texaco, Patrick Chamoiseau

Remerciements

Ce travail représente un peu plus de trois ans d'aventures humaines et professionnelles ayant impliqué de nombreux collègues et amis. A l'heure de la rédaction de ces remerciements, je tiens à leur exprimer ma plus profonde gratitude et m'excuse d'avance pour les personnes que j'aurais oubliées.

Avant toute chose, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury ayant accepté de lire et d'évaluer cette thèse : Pr David Renault, Pr Céline Boulangé-Lecomte, Pr Tarik Meziane, Dr Joséphine Leflaive, Dr Axelle Cadière, Dr Elodie Fleury et Dr David McKenzie. J'en suis honorée.

Lorsque j'ai envoyé ma candidature au printemps 2018, je ne savais pas vraiment à quoi m'attendre. Merci à mes petites fées de Guyane car ce sont, entre autres, vos encouragements qui ont fait que j'ai osé candidater : Floriane (Maman Tortue !), merci pour les rires, ta motivation, ton sourire ! Mathilde, Dorian, Perle, Anar, Joy, Théo, Anne, Claudine, Luc, merci ! Séb L, je n'oublierai jamais ton soutien.

J'en arrive à la rencontre avec mes Directeurs de thèse, Jehan-Hervé Lignot et Elliott Sucré. Merci d'avoir fait ce pari un peu fou, et merci de votre implication jusqu'à la dernière minute. Comme dirait l'autre, « sur un malentendu, ça peut marcher » !

Jehan-Hervé, c'est toi qui as pris le temps de me préparer à l'oral du concours, et qui m'a permis pour la première fois de prendre du recul sur mon travail de Master et de le valoriser, cela a beaucoup compté pour moi. Nous avons vécu des aventures incroyables ensemble, ne serait-ce qu'un mois sur une île quasiment déserte à parcourir des mangroves magnifiques et à réfléchir à des solutions pour que nos expérimentations fonctionnent malgré les soucis logistiques ! Si la route a parfois été sinueuse, je suis aujourd'hui vraiment heureuse du travail que nous accompli ensemble ! Merci pour tout.

Elliott, merci de la confiance que tu m'as accordée, d'avoir cru en moi et merci de m'avoir accueillie lors de mes séjours à Mayotte ! Tu t'es révélé être un encadrant, puis co-directeur de thèse formidable. J'ai vraiment apprécié travailler à tes côtés et évoluer au fil du temps. Nous avons aussi partagé des moments magiques à Europa, et vécu des expériences plus ou moins étranges en période de COVID-19, notamment un élevage de poussins imprévu. Je suis heureuse de continuer à travailler avec toi au CUFR à partir de 2022 pour de nouvelles aventures ! Merci !

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon comité de thèse : Aurélie Célérier, Julien Issartel, Claire Golléty, Emma Michaud, Matthieu Jeanson, Catherine Alliaume. Merci pour vos conseils qui m'ont permis de prendre du recul et de mieux cadrer le sujet de thèse, mais aussi pour votre bienveillance. Vous m'avez aidée à grandir.

Dimitri, à ton tour ! Nous nous sommes rencontrés quelques jours avant ta soutenance à Montpellier, je ne connaissais rien à la physiologie, aux crabes, au CUFR. C'est toi qui m'as formée à mes premières manip en labo, aux stats, qui m'a appris à m'extasier devant une droite parfaite comme tu le dis si bien, et j'en fais encore des cauchemars. Tu m'as intégrée dans ton

monde lorsque je suis arrivée pour la première fois au CUFR, et tu m'as transmis énormément de tes connaissances : merci ! J'ai pu compter sur toi au quotidien pendant trois ans (et ce n'est pas terminé), et je sais que tous tes amis et collègues peuvent en dire autant. C'est une chance d'être devenue ton amie, ta mauvaise vache et de subir tes tartiflettes peu orthodoxes. C'est à chaque fois une joie de te retrouver que ce soit en Espagne, en Corse, à la montagne, à Mayotte, ou partout ailleurs, autour de quelques Triple K et Kasteel Donker. Je nous souhaite de rester amis et collègues encore longtemps ! Meuh !

Je tiens ensuite à remercier Marc Bouvy, Valérie Micard ainsi qu'Eric Blanchart de m'avoir accueillie au sein de l'école doctorale GAIA, dans la filière EFSA. Merci à Cendrine Jay-Allemand et Aïda Dubost d'avoir géré les péripéties administratives.

Mes remerciements vont ensuite à l'association Femmes & Sciences de Montpellier, et tout particulièrement à celles et ceux impliqué(e)s dans le programme de mentorat qui est une formation proposée par l'ED GAIA. Merci, Marie-Laure Navas, pour nos rencontres mensuelles au cours desquelles vous m'avez poussée à prendre du recul, à me construire et à prendre confiance en moi. Merci Martine, nos repas à Carnon m'ont apporté beaucoup de joie.

Cette thèse a été réalisée au sein de la grande équipe de l'UMR MARBEC, merci à la direction et à tous ses membres pour votre accueil ! Ces trois ans de travail sont aussi le fruit de discussions entre deux portes, de questions posées à la volée, de cafés, de repas. Merci Emilie de m'avoir fait découvrir Ethovision et les études comportementales, de m'avoir prêté le fameux Dongle voyageur, merci pour les pipettes, pour ta simplicité et tes rires. Sophie, merci d'avoir pris le temps de nous former sur les nouvelles machines magiques du plateau histologie, pour ton implication et pour nos chouettes conversations, au labo ou au téléphone ! Catherine, j'apprécie beaucoup nos discussions, merci pour tes conseils et ta bonne humeur, et vivent les réunions Ecophy ! Merci Béatrice, pour ta bonne humeur et ton humour. Merci Yann, c'était toujours un plaisir de descendre t'embêter avec mes questions et rigoler avec toi. David, quel plaisir d'avoir pu partager quelques moments ensemble, que ce soit à MARBEC, en congrès à Rennes et Séville, au pub et à Mayotte ! Merci pour ton humour fascinant, ton écoute et tes conseils. Guy, me voici arrivée au bout de cette thèse ! Merci pour tout. Vous avez été présent dans les moments difficiles, et nos échanges de mails tout au long de la thèse ont beaucoup compté. Merci pour votre pédagogie, et pour tout ce que vous avez apporté à l'écophysiologie.

Cette thèse a également été réalisée en partie au CUFR de Mayotte, qui représente à mes yeux une grande famille où j'ai été accueillie à plusieurs reprises. Merci au Directeur du CUFR, Aurélien Siri, d'avoir permis cet accueil, notamment en période de COVID-19 et de m'avoir autorisée à continuer la plupart des expérimentations en mars et avril 2020. Cela a été déterminant dans la réalisation de la thèse et j'ai conscience de la chance que j'ai eue. Merci aux collègues géographes de m'avoir donné l'opportunité de dispenser mes premiers enseignements, et merci aux étudiants ! Merci Matthieu pour ton humour, ton soutien et pour la photogrammétrie en tout début de thèse : je n'abandonne pas l'idée ! Merci Esméralda pour nos conversations, ta passion pour la Recherche, mais également pour les beaux week-ends passés ensemble dans des endroits magiques. Du côté des biologistes : Claire, les moments partagés ensemble au long de ces trois ans me sont très chers. Tu as fait partie de mon comité

de thèse, tu es une collègue de travail et tu es devenue une amie. Merci d'avoir fait en sorte que je puisse revenir au CUFR, et surtout : vivement la prochaine fondue ! Rémi, merci pour tes encouragements jusqu'à la dernière minute, pour ta passion pour les bulots (*gnagnagna Terebralia palustris*) et le club Med, pour les mangroves et nos discussions ! Les lignes filent et je vais devoir être plus synthétique alors : merci Thomas (Captain America), Miki, Manu (allez l'OEM), FX, Zaïnabou, Moussa, Matthieu, Aline, Damien, Jeff, Delphine, Anliati, Sophie, Sarah et tous les collègues/copains qui forment cette belle équipe. Manon : tu m'as accueillie chez toi à Mayotte et nous avons fait plein de choses ensemble : merci et belles navigations !

Aux deux membres les plus talentueux du Poujoutier responsable, Yann et Charles, merci pour tout ! Nos sorties en mer, ou ailleurs, ont été et seront toujours de purs moments de bonheur et de décompression. Votre amitié m'est très précieuse.

Amélie, tu es la première stagiaire que j'ai eu la chance d'encadrer, mais l'Histoire raconte que c'est l'inverse. Grâce à ta formation d'écologue, nous avons percé plus de 6000 trous dans des piézomètres artisanaux, la belle époque des « sœurs troueuses », et tu m'as appris ce qu'était un quadrat... Plus sérieusement, tu m'as suivie dans mes délires de photogrammétrie, tu as développé, presque seule, un protocole de suivi, tu as promené ta tarière dans toutes les mangroves de Mayotte, alors que tes encadrants fuyaient lâchement pour des mangroves moins vaseuses. Bravo et merci pour tout ! Je suis heureuse d'être ta colocataire, ma Gougousse préférée ! Longue vie à nos fous rires, au planteur, à Aquaman, et à Groquick !

Pauline, ce fut également un réel plaisir de participer à l'encadrement de ton stage, sur une thématique qui me tenait à cœur : les réponses comportementales des crabes. Tu as fait preuve d'une grande rigueur qui a permis d'améliorer les questions scientifiques et les protocoles, dans des conditions compliquées liées au COVID-19. Bravo pour ton courage face à l'eau usée et pour ton travail !

Lors de cette thèse, une parenthèse d'un mois nous a emmenés sur l'île presque inoccupée d'Europa, au Sud du Canal du Mozambique. Merci au Préfet des TAAF et aux TAAF, d'avoir permis l'organisation de cette mission au sein du Consortium îles Eparses.

Merci à Martin, Jonathan et Nicolas pour votre gestion incroyable et votre gentillesse, que ce soit sur le Marion Dufresne ou sur l'île. Merci à Jade (Lapinou !) pour l'amitié qui est née pendant ces quelques semaines, pour les missions et nos rires. Tu vas y arriver ! Merci à Gaby, pour les rires encore, et nos conversations.

Enfin, merci à la 13e demi-brigade de Légion étrangère de nous avoir intégrés avec autant de gentillesse. Plus particulièrement, merci au Lieutenant Carbonel, au Sergent Sillo pour votre accueil et nos conversations. Merci Martinov, Romila, Boprov et Dragan, pour les échecs, les rires, Céline Dion, vos histoires, pour tout.

Au sein de MARBEC, j'ai eu la chance de rencontrer des copains formidables. Merci à toute l'équipe des gogols du bout de table, pour tous les moments où l'on parlait de tout sauf de choses intelligentes ! Thibaut, tu as été le premier à m'emmener dans un labo et à me parler de tips, terme qui m'était alors obscur. Merci de m'avoir accueillie dans ton bureau, et pour tout ce que tu m'as appris. Pour les soirées, Jasmine et Aladin, les congrès et les kebabs, pour ton aide aussi à Mayotte désormais ! Thomas, merci pour ta gentillesse, ton soutien, tes goûts

musicaux surtout en période de Noël (Kammthaar !), les moments passés chez vous ! Justine, merci pour le lâcher-prise, les discussions et pour le superbe tabouret en acajou ! Tanguy : merci pour les placages de rugby, tes histoires drôles, ton sourire. Marie-Charlotte, toi qui es également arrivée ici par surprise : bravo, et vivent les moules au Maroilles, les moines et les pigeons (d'abord) ! Merci pour ton soutien et tes éclats de rire ! Elsa, Chouchou... Malgré ton regard noir lors de notre première rencontre (héhé), tu fais partie des merveilles de cette thèse ! Merci pour ton amitié et ton soutien. Merci d'avoir été là à chaque instant, à travers des attentions adorables, des mots, des appels ! J'ai une bonne nouvelle : c'est bientôt Noël !

Enfin, merci à tous les autres copains de MARBEC que j'ai eu le plaisir de rencontrer : Angela, Raphaël, Raquel, Mariam, Lucas, Virginie, Margot, Diana, Claire, Masroor, Fabien et merci Quanquan, mon collègue de bureau, pour nos échanges, et pour m'avoir sortie de problèmes administratifs ! Courage pour la fin !

Merci Jean-Luc, Béa, Gatien, Noémie pour ces moments à Carnon et vos encouragements !

Merci Gosette, Annick d'être entrés dans ma vie. Vous êtes formidables.

Sébastien, tu as cru en moi avant que je ne le fasse. C'est toi qui as trouvé le sujet de thèse, et qui m'a poussée à candidater. Merci pour ton soutien indéfectible, pour tous ces merveilleux moments passés ensemble et pour ta gentillesse extrêmement précieuse !

Les copains de Haute-Savoie et d'ailleurs, merci ! Aurélie, merci d'avoir parcouru ces années à mes côtés et d'être toujours la même femme fantastique et intéressante, de croire en moi jusqu'au bout ! Egor, give it to me baby !

Sophie, cela fait bientôt quinze ans que nos routes se sont croisées, à dos de poney dans un petit village de Haute-Savoie. Tu as été la témoin (et même l'artisane !) de mon tout premier mémoire en L3, il y a de cela sept ans, et nous nous sommes vues mutuellement grandir. Aujourd'hui encore, c'est à toi que je dois la présentation de cette thèse. Plus que cela, tu as été présente dans tous les moments de ma vie, les plus difficiles comme les plus heureux, et ces trois ans ne font pas exception. Merci pour tout, et bien plus encore. Nem !

Maman, Papa, je vous dédie cette thèse. Merci pour l'enfance formidable que vous nous avez fait vivre, pour tout ce que vous nous avez fait découvrir. Je sais que mes choix n'ont pas toujours semblés très cohérents, mais cela faisait partie d'un vaste plan dès le départ ! (Pas du tout). Dady, tu es fantastique, merci pour ta folie, ton énergie, les fondues réconfortantes et les soirées tarot ! Aurélie, j'ai rédigé une partie de cette thèse sur le bureau sur lequel tu avais rédigé la tienne, ça ne peut qu'être un bon signe, merci ! Tanguy, merci pour les messages rigolos à n'importe quelle heure, pour la musique et pour tout ce que nous avons vécu ensemble. Loulou, on se voit peu, mais tu réchauffes mon cœur. Merci infiniment Tata Jacqueline, toi qui m'as encouragée, toute jeune, à lire, à voyager, à découvrir ! Merci pour ton soutien. Papy, tontons, tatas, les cousins, les cousines, merci ! Il me tarde de vous retrouver.

Bernie, tu as fait entrer la magie dans ma vie. Boula !

Avant-propos

Cette thèse est organisée autour de trois chapitres présentés sous forme d'articles scientifiques rédigés en anglais.

Elle comporte d'abord une introduction générale, présentant les concepts mobilisés afin de replacer le sujet dans son contexte scientifique. Elle permet également de présenter les sites d'études, les espèces étudiées ainsi que des éléments clefs de leur physiologie. A la fin de l'introduction, une problématique et trois grands objectifs annoncent la structure de la thèse.

Le premier chapitre correspond à un article publié dans la revue « Environmental Science and Pollution Research » en juin 2021 : il est présenté selon le format du journal. Le second chapitre correspond à un article soumis en septembre 2021 et en cours de révision dans la revue « Ecotoxicology and Environmental Safety ». Enfin, le troisième chapitre correspond à un article soumis à Frontiers in Ecophysiology en décembre 2021.

Au début de chaque chapitre, une page de présentation propose un résumé de l'article en français, un matériel et méthodes sous forme de résumé graphique ainsi qu'un rappel des objectifs principaux. A la fin de chaque chapitre, une page de synthèse reprend les résultats et les messages principaux, ainsi que les communications dont ont fait l'objet les publications.

Ensuite, une discussion générale est proposée afin de mettre en perspective les résultats obtenus et de prendre du recul sur les méthodologies et conclusions issues des travaux de thèse.

Une conclusion générale vient synthétiser les travaux présentés dans le manuscrit et aborder les perspectives envisagées.

Table des matières

Remerciements	II
Avant-propos	VI
Principales abréviations	XII
Introduction générale	1
1. Cadre conceptuel : état de santé des écosystèmes, bioindication et écophysio­logie	3
1.1 État de santé des écosystèmes	3
1.2 Indicateurs, espèces sentinelles et biomarqueurs	5
1.3 Ecophysio­logie	8
1.4 Acclimatation, adaptation et traits d'histoire de vie	10
2. Contexte écologique	12
2.1 Les écosystèmes de mangroves	12
2.2 Les crabes	14
2.3 Fonctions écologiques des mangroves	18
2.4 Pressions et menaces sur les mangroves	19
3. Environnement scientifique de la thèse	22
3.1 Projets et contexte institutionnel	22
3.2 Présentation des sites d'étude	26
4. Ecophysio­logie des espèces étudiées	33
4.1 Le métabolisme énergétique	36
4.2 Stress oxydatif et défenses antioxydantes	39
4.3 Physio­logie respiratoire	41
4.4 Osmorégulation	47
4.5 Excrétion de l'ammonium	50
4.6 Les fonctions hépatopancréatiques	53
5. Enjeux et objectifs de la thèse	57
Chapitre 1	61
Validation et mise en œuvre de biomarqueurs physiologiques sur une espèce ingénieur de l'écosystème mangrove	61

Présentation.....	63
1. Introduction.....	65
2. Materials & Methods	67
3. Statistical analysis	68
4. Results.....	69
5. Discussion	70
6. Conclusion	74
Acknowledgments	74
References.....	75
Conclusion du chapitre	79
Chapitre 2.....	81
Les réponses individuelles pour mieux comprendre les variations des communautés de crabe en milieu naturel anthropisé : marqueurs métaboliques et comportementaux	81
Présentation.....	83
1. Introduction.....	87
2. Materials & Methods	89
3. Statistical analyses.....	94
4. Results.....	96
5. Discussion	102
6. Conclusion	106
Acknowledgements.....	107
References	108
Conclusion du chapitre	118
Chapitre 3.....	119
Réponses physiologiques de deux espèces de crabes en mangrove pristine et anthropisée face à une simulation d'apports anthropiques.....	119
Présentation.....	121
1. Introduction.....	125
2. Materials & Methods	128
3. Statistical analysis	132
4. Results.....	134

5. Discussion	141
6. Conclusion	147
Acknowledgements	147
Supplementary data	148
References	150
Conclusion du chapitre	164
Discussion	165
1. Retours sur les biomarqueurs utilisés et les résultats obtenus au regard des différents niveaux d'intégration étudiés	168
1.1 Mise en perspectives des résultats obtenus au regard des travaux antérieurs sur la thématique	168
1.2 Marqueurs biochimiques et histologiques au niveau cellulaire et subcellulaire	176
1.3 Le taux métabolique : un marqueur intégratif à l'échelle de l'organisme et au-delà	178
1.4 Traits comportementaux	181
2. Des biomarqueurs physiologiques en appui à la compréhension des dynamiques en milieu naturel : apports de l'écophysiologie.....	184
2.1 Du milieu naturel vers le laboratoire : simplification et reproductibilité.....	184
2.2 Approche écophysiologique pour le suivi de mangroves connaissant des pressions anthropiques opposées	187
2.3 Processus écophysiologiques à court et long terme : plasticité phénotypique et adaptation.....	192
3. Vers une potentielle mise en application : du biomarqueur à la bioindication opérationnelle	195
3.1 Des biomarqueurs applicables aux programmes de gestion des écosystèmes ?	195
3.2 Les crabes de mangroves : des espèces bioindicatrices ?	198
Conclusions et perspectives.....	205
Références bibliographiques de l'introduction et de la discussion	213

Principales abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine-5'-diphosphate
CAT	Catalase
CO ₂	Dioxyde de carbone
CS	Citrate synthase
DCE	Directive cadre sur l'eau
DCSMM	Directive cadre stratégie pour le milieu marin
EqH	Equivalent-habitant
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
EU	Eau usée
GT	<i>Gelasimus tetragonon</i>
GPX	Glutathion peroxydase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ind	Individu
LDH	Lactate déshydrogénase
MO	Matière organique
mOsm	Milliosmole
NADH	Nicotinamine adénine dinucléotide
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
OH·	Radical hydroxyle
pers.	Personnel(le)
PO	Pression osmotique
PC	<i>Paraleptuca chlorophthalmus</i>
TAAF	Terres Australes et Antarctiques Françaises
ANSES	Agence Nationale Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Introduction générale

1. Cadre conceptuel : état de santé des écosystèmes, bioindication et écophysiologie

Cette première partie a pour but de présenter et définir les concepts, notions ainsi que les positionnements qui seront abordés tout au long du manuscrit. Il a semblé important de replacer le sujet de thèse dans un contexte scientifique plus large afin de justifier les problématiques abordées, les questions posées ainsi que les méthodologies utilisées.

1.1 État de santé des écosystèmes

La notion de « santé des écosystèmes », popularisée par les médias, date du début du XIX^{ème} siècle. Elle fut probablement employée pour la première fois par James Hutton, qui adressa en 1788 un article à la *Royal Society of Edinburgh* concernant une théorie représentant la terre comme un super-organisme capable de s'auto-réguler et s'entretenir (Calow, 1992; Hutton, 1788; Lovelock, 1988). Cette notion, dans sa conception extrême, est parfois considérée comme un état d'équilibre de la nature. Cette métaphore fut, et est toujours, utilisée afin d'expliquer le fonctionnement des systèmes naturels des temps anciens, aussi bien dans la culture populaire que scientifique (Cuddington, 2001; Zimmerman and Cuddington, 2007). Les idées concernant cet équilibre de la nature sont nées de croyances religieuses selon lesquelles la stabilité des systèmes naturels serait déterminée par Dieu : avant Darwin, la nature était considérée comme interconnectée de manière à préserver un ordre prédestiné par une puissance divine. Ces approches sont controversées tant il a été prouvé que les systèmes écologiques, avec ou sans l'espèce humaine, sont dans un état provisoire résultant de dynamiques complexes, d'interactions nombreuses dès lors qu'une durée suffisante est considérée (Giraudoux and Lebreton, 2018). On peut en déduire qu'il s'agit, bien sûr et entre autres, d'une question d'échelles (spatiales et temporelles).

On retrouve par la suite la trace de « santé des écosystèmes » et de « nature malade » chez Aldo Leopold, en 1949, notamment dans l'« Almanach d'un Comté des Sables », considéré comme l'un des ouvrages fondateurs de l'éthique environnementale, de la pensée écologiste et de la biologie de la conservation (Giraudoux and Lebreton, 2018). Rapport, en 1995, évoque alors un second fleurissement de la notion de santé appliquée aux écosystèmes, qui se démarque du premier par l'abandon de l'idée de nature comme superorganisme : l'écosystème est désormais conçu comme un système dont les propriétés peuvent être (et souvent, sont) perturbées par l'action anthropique. Aldo Leopold, en 1941, invoque notamment le concept de « land doctoring », dont le but serait : « to determine the ecological parameter within which land may be humanly occupied without making it dysfunctional ». Le célèbre concept de *Wilderness*, autrefois justifié par des valeurs ludiques (tourisme), puis esthétiques, devient alors doté de valeurs scientifiques, et se transforme en « land laboratory » : ces terres inoccupées, non impactées, seront un moyen de contrôle

important pour juger des effets des impacts humains sur les écosystèmes (Waller, 2010).

Les écueils en matière de santé des écosystèmes sont nombreux, notamment parce que ces conceptions sont créées et perçues d'un point de vue anthropocentré. Calow, en 1992, concluait son article intitulé "Can ecosystems be healthy? Critical consideration of concepts" en appelant à la précaution lorsque des analogies entre des classes de systèmes (humains, naturels) sont utilisées, en conseillant d'appliquer le concept de « santé » à des organismes plutôt qu'à des écosystèmes. La notion de bonne ou mauvaise santé des écosystèmes ainsi que leur équilibre dynamique et provisoire apparaîtraient comme un choix de combinaisons entre des contraintes majoritairement économiques et un consensus social : ces équilibres seraient choisis parmi d'autres dynamiques possibles, que les composantes non-humaines de l'écosystème pourraient installer « durablement » à un temps donné (Giraudoux and Lebreton, 2018). Rapport (1995) insiste d'ailleurs sur la pluralité des définitions données à la santé des écosystèmes : certaines se baseraient uniquement sur des propriétés biophysiques, et d'autres incluraient explicitement des dimensions socio-économiques et de santé humaine, en fonction des caractéristiques des écosystèmes étudiés (non anthropisés ? Habités ? Sous pression ?). Costanza et ses coauteurs (1992) ont fourni dans un ouvrage pluridisciplinaire (où l'écologie devient étroitement liée à l'économie), des définitions de la santé des écosystèmes en analysant le plus objectivement possible ce concept. La santé des écosystèmes reposerait sur trois propriétés indépendantes : sa vigueur, son organisation et sa résilience. En 1997, dans un article publié dans *Nature*, et toujours selon une approche globale de la question, Costanza et ses co-auteurs ont eu pour objectif de fixer la valeur économique des écosystèmes et de quantifier les valeurs des « services écosystémiques »¹. Cette métaphore de la biodiversité représentée comme un flux de services marchands pour le bien-être de l'humanité s'est peu à peu imposée dans les discours des organisations internationales, relayée par les scientifiques et les acteurs du développement (Millenium Ecosystem Assessment, 2005, IPBES, rapports de la FAO...) (Méral, 2011).

C'est ainsi qu'en 2012, une nouvelle notion est ajoutée à la définition d'état de santé : un écosystème serait en bonne santé s'il « procure une gamme de services écosystémiques » (traduction de Giraudoux and Lebreton, 2018). Cette définition de la santé des écosystèmes, relève de temporalités arbitraires dépendantes de l'échelle humaine (temps court et moyen), et force à caractériser l'écosystème par les services écosystémiques qu'il

¹ Dix ans plus tôt, l'article "How much are nature's services worth?" ("Que valent les services rendus par la nature ?"), de l'écologue américain Walter Westman paru dans *Science* en 1977 était l'un des premiers à essayer de démontrer l'importance économique de ces 'services' écosystémiques et d'orienter les choix d'aménagement du territoire par certaines méthodes économiques, telles que l'évaluation des coûts de restauration d'écosystèmes détruits (Teyssède et al., 2010).

procure de manière anthropocentrée. Lorsque l'on considère la « biodiversité » comme un assemblage de différentes diversités (génétique, interactions, ...), en constatant l'instabilité des écosystèmes à des échelles de temps et d'espaces variées, la définition même du vivant et de la biodiversité s'opposent à toute vision fixiste des écosystèmes (Giraudoux and Lebreton, 2018).

Le concept de santé des écosystèmes est donc complexe, voire impossible à appréhender dans sa globalité. Dans leur article "How is ecosystem health defined and measured? A critical review of freshwater and estuarine studies", O'Brien *et al.* (2016) énoncent d'ailleurs un nombre important de biais relatifs à l'utilisation de ce concept dans la littérature scientifique : inconsistance voire absence de définition de l'état de santé, confusions entre concepts, choix d'espèces bioindicatrices ou d'indicateurs non justifiés, ... Les auteurs proposent des directives afin de guider les scientifiques et les gestionnaires dans la mise en place d'études et de suivis, en insistant sur l'importance de définir clairement les objectifs ainsi que les écosystèmes concernés, aussi bien spatialement qu'au niveau de leurs dynamiques historiques. Pour résumer, Giraudoux and Lebreton (2018) supposent que « veiller à la santé des écosystèmes supposerait, au-delà d'une préservation à court terme, de veiller à préserver leurs capacités évolutives en accompagnant leurs transitions ».

1.2 Indicateurs, espèces sentinelles et biomarqueurs

Les écosystèmes de mangrove sont de bons exemples témoignant de la variabilité des évolutions spatiales et temporelles, fortement liées à des forçages environnementaux et anthropiques, qui en font des écosystèmes à la fois complexes et passionnants à étudier. Ces écosystèmes peuvent en effet évoluer de manière considérable en quelques années, ou au contraire montrer une grande stabilité écologique sur plusieurs décennies (Alongi, 2008; Hogarth, 1999; Jeanson, 2009). Si l'on considère qu'il existe différents niveaux intégratifs d'état de santé, il serait envisageable d'essayer de l'évaluer à différentes échelles : écosystème, communauté, population ou espèce. Ces échelles dépendent des préoccupations et des choix réalisés par les acteurs pouvant être impliqués : populations locales, organisations non gouvernementales, scientifiques, gestionnaires d'espaces naturels, États, grand public (Burger, 2006). Il existe de multiples stratégies développées dans le cadre de la gestion des questions environnementales mondiales comme les changements climatiques, la perte et la fragmentation des habitats, la pollution et les contaminants, les épidémies ou encore la propagation des espèces envahissantes. Il convient, dès à présent, de distinguer des concepts allant être utilisés au cours de cette thèse, et pouvant parfois être confondus.

Parmi les stratégies mentionnées, l'une des plus populaires est l'adoption de techniques de surveillance capables de détecter les changements écologiques à un stade précoce et sur le long terme (Siddig et al., 2016). A ce titre, le développement **d'indicateurs de suivi**

comme “proxys” est apparu comme nécessaire afin de comprendre et mesurer les effets sur la santé des écosystèmes au sens large : il est en effet impossible de surveiller tous les organismes et leurs interactions au sein d’un écosystème donné (Polain, 2017). Le terme “**indicateur**” a été utilisé et défini aussi bien en écologie qu’en gestion de l’environnement, et il comporte de nombreuses définitions ne parvenant pas forcément à un consensus commun au sein et entre les disciplines (voir Heink and Kowarik, 2010 pour une revue et des propositions de classification). Selon Heink et Kowarik (2010), ces types d’indicateurs sont utilisés pour décrire les pressions que les activités humaines exercent sur l’environnement. Nous nous appuyons sur la synthèse des définitions **d’espèces bioindicatrices** (“Indicator species”) proposée par (Siddig et al., 2016) : “One or more taxa selected based on its sensitivity to a particular environmental attribute, and then assessed to make inferences about that attribute. Commonly used in the context of wildlife conservation, habitat management and ecosystem restoration” (Caro, 2010; Morrison, 2009; Simberloff, 1998). Les paramètres mesurés à travers ces espèces sont généralement la diversité, l’abondance, le succès reproductif et le taux de croissance d’une ou de plusieurs espèces habitant l’écosystème étudié (Burger, 2006; Siddig et al., 2016), même si plusieurs définitions des espèces bioindicatrices ont été proposées.

Les **espèces sentinelles** présentent des points communs avec les espèces bioindicatrices, et la limite entre les deux concepts est parfois floue. L’utilisation d’espèces sentinelles dans un but d’alerte précoce d’un risque environnemental et sanitaire est reconnue depuis longtemps. Elles peuvent être définies comme des espèces sensibles à la contamination, utilisées pour suivre les effets de la contamination sur les organismes à travers des mesures de réponses sub-individuelles de ces espèces à des niveaux de contamination assez faibles, avant que les communautés ne présentent des réponses apparentes (Lagadic et al., 1998). McCarty et al. (2002) les décrivent comme des espèces dont les réponses fonctionnelles, physiologiques ou populationnelles sont capables de prédire les réponses d’autres espèces présentes et exposées à un stress similaire, suivant des niveaux d’intensité identiques ou plus élevés. Les auteurs remettent très fortement en cause la pertinence de l’utilisation des espèces sentinelles appliquées à la qualification de l’état de santé des écosystèmes, parce qu’elles sont en général choisies pour leur valeur économique, leur statut protégé ou parce qu’elles représentent des espèces emblématiques (choix subjectif). Lorsque ces critères sont réfléchis de manière cohérente par rapport à l’écosystème et aux risques présents, cette approche peut s’avérer utile (par rapport à l’approche bioindicatrice) sous certaines conditions d’après les auteurs. Les relations entre les facteurs de stress et leurs effets au niveau de la population, et surtout au niveau de la communauté et de l’écosystème, doivent être rassemblées et évaluées afin d’établir des connaissances générales de l’écosystème étudié.

Les espèces de crabes étudiées dans cette thèse sont plutôt considérées comme des espèces sentinelles au regard des niveaux d’organisation étudiés, et de la recherche d’effets des

contaminants sur différents paramètres de l'organisme. Cependant, notre approche n'exclut pas les thématiques de bioindication et celles-ci seront discutées par la suite. Dans tous les cas, nous ne prétendons pas appréhender la complexité des écosystèmes de mangrove en nous basant uniquement sur les réponses d'une seule espèce de crabe de mangrove face à plusieurs stress. **Nous cherchons, ici, à mieux comprendre les impacts des rejets d'origine anthropique souvent constatés dans les mangroves, sur des espèces jouant un rôle majeur dans le fonctionnement de ces écosystèmes (crabes de mangrove), en adoptant une approche écophysiological reposant sur des biomarqueurs à différents niveaux d'intégration, selon différentes échelles spatiales.**

Les **biomarqueurs** sont des outils importants pour mesurer les effets sublétaux provoqués par un stress chez les organismes. Ce sont des indicateurs physiologiques, biochimiques ou histologiques de l'exposition ou des effets liés à des xénobiotiques (Forbes et al., 2006). Les paramètres comportementaux sont parfois considérés comme des biomarqueurs, mais sont souvent plutôt analysés comme des réponses à l'échelle de l'organisme entier au même titre que la croissance ou la reproduction² (Forbes et al., 2006; Monserrat et al., 2007).

Les biomarqueurs indiquent un dysfonctionnement au niveau cellulaire, d'un organe ou de l'organisme entier et peuvent donc fournir un signal précurseur du déclin de la santé et ou de la performance d'un organisme, et ainsi avoir des répercussions à plus grande échelle, par exemple au niveau de la population (Theuerkauff, 2019) (**Figure 1**).

² La croissance et la reproduction sont généralement considérées comme des « **traits d'histoire de vie** ». Ces traits représentent des caractéristiques quantitatives et démographiques des organismes directement liées aux deux composantes majeures de la « fitness », à savoir la survie et la reproduction. On trouve parmi les traits d'histoire de vie régulièrement étudiés : la taille à la naissance, la croissance, l'âge et la taille à maturité, la longévité, entre autres. Au contraire, d'autres traits morphologiques, physiologiques, ou comportementaux contribuent uniquement à la « fitness » de manière indirecte. Certains traits comme la taille du corps, ou celle des gonades, peuvent donc être considérés à la fois comme traits d'histoire de vie et traits morphologiques (Flatt and Heyland, 2011).

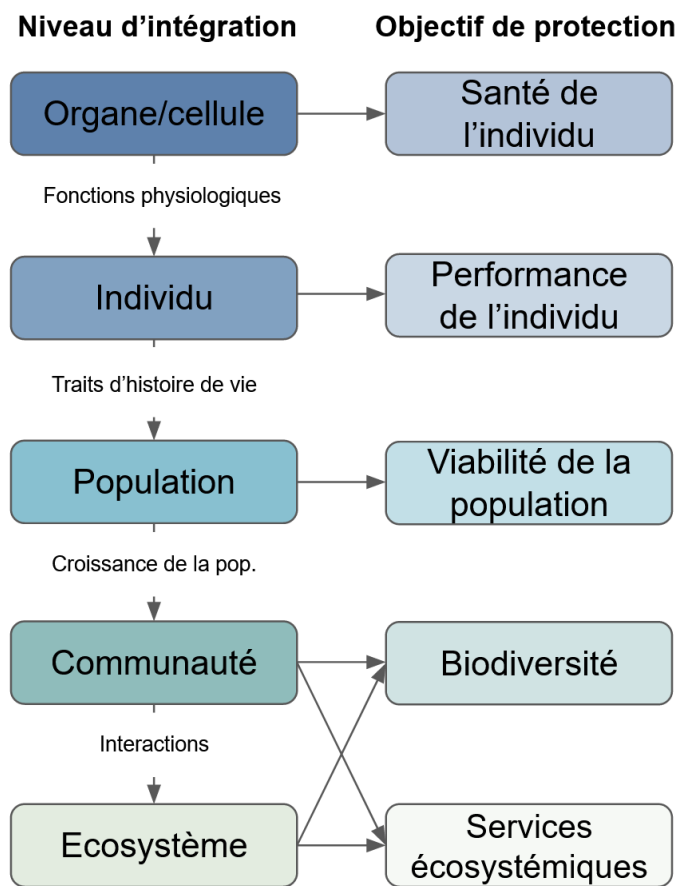


Figure 1. Modèle conceptuel de la propagation des effets écotoxicologiques à partir des niveaux biologiques inférieurs jusqu'à l'échelle de l'écosystème et influence de leurs effets à l'échelle correspondante. Ce diagramme permet de cibler les niveaux d'intérêt en fonction de l'objectif de protection des espèces et de l'environnement. Population (pop.), individu (ind.). Modifié d'après Baird et al. (2007); Theuerkauff, (2019).

1.3 Ecophysiologie

La définition de la **physiologie** repose sur l'étude des mécanismes utilisés par les organismes afin de maintenir un environnement interne stable et distinct de l'environnement externe qui connaît, lui, des variations. Le maintien de la stabilité de cet environnement interne malgré les fluctuations externes est appelé **homéostasie**, et celle-ci repose sur le développement de changements comportementaux et de régulations physiologiques internes à différents niveaux d'intégration : organisme, cellulaire, moléculaire (Ferry-Graham and Gibb, 2018). Lorsqu'un paramètre de l'environnement interne est maintenu à un niveau constant ou dans une fourchette relativement restreinte, il est dit régulé (exemple de la température corporelle chez la plupart des mammifères). En revanche, si un changement de l'environnement externe provoque des variations des paramètres internes de l'organisme, ce dernier est dit conforme. La physiologie permet ainsi d'étudier les potentiels compromis évolutifs entre le stress physiologique pouvant être engendré par la variation d'un paramètre donné en fonction des changements de l'environnement et la dépense métabolique engendrée par la régulation (Ferry-Graham and Gibb, 2018). Cette discipline implique généralement des observations et des

expérimentations en conditions très contrôlées, habituellement en laboratoire afin d'observer les mécanismes les plus proches de la réalité possible.

L'**écophysiologie** est une discipline plus récente, dont les frontières et les définitions ont été de nombreuses fois discutées et réajustées ces 50 dernières années (Degen, 2012). Elle a comme antécédents des disciplines telles que la "physiologie environnementale" et l'"écologie physiologique", qui se sont fortement développées aux Etats-Unis dans les années 1950 et 1960 (Bradshaw, 2003). Selon la définition de l'auteur, l'écophysiologie est une discipline "(...) qui cherche à clarifier le rôle et l'importance des processus physiologiques dans les relations écologiques des espèces dans leur habitat naturel". Les paramètres physiologiques sont alors utilisés pour quantifier l'interaction entre le milieu extérieur et le milieu interne de l'organisme (Ferry-Graham and Gibb, 2018). Selon Block and Vannier (1994), "l'écophysiologie implique l'étude à la fois descriptive des réponses des organismes (individus ou groupes) face aux conditions environnementales, et l'analyse ponctuelle des mécanismes physiologiques correspondant, dépendants de l'environnement, à tous les niveaux d'organisation" (**Figure 2**). Ainsi, le lien entre la physiologie et l'écologie est étudié à travers une approche descriptive mais également mécanistique, et ces mécanismes physiologiques sont interprétés non pas en tant que tels (comme cela pourrait être le cas avec une approche physiologique), mais par rapport à leur signification adaptative à la lumière de conditions environnementales données.

Le passage entre la physiologie et l'écophysiologie semble également s'être effectué à travers les changements de modèles d'étude et de cadres conceptuels utilisés. Les études plus anciennes d'écophysiologie semblaient s'intéresser davantage aux adaptations³ physiologiques des organismes en milieu extrême et examinaient les limites de leurs réponses physiologiques (Feder et al., 1987). Le choix des espèces étudiées se faisait principalement sur le critère d'adaptations physiologiques, comportementales ou morphologiques uniques. Par la suite, le choix des espèces étudiées se fit de plus en plus en fonction de leur distribution, soit dans des environnements extrêmes, soit pour les gradients environnementaux des habitats qu'elles occupaient (passage d'un intérêt pour des adaptations physiologiques extrêmes à des environnements extrêmes). Il en résulta une accumulation d'études créant une base de données physiologiques d'espèces distinctes, principalement tournées vers les réponses physiologiques permettant aux animaux de survivre dans des environnements hostiles (Degen, 2012). Cette accumulation de connaissances individuelles permit aux écophysiologistes de proposer des modèles généralistes décrivant les stratégies permettant aux animaux de s'adapter à leur environnement. Par exemple, Bartholomew (2005) proposa quatre types de comparaisons interspécifiques pouvant être utilisées dans ces "nouvelles" études écophysiologiques : 1)

³ Le terme « adaptations » est ici repris des ouvrages et articles d'écophysiologie, mais son sens sera discuté plus tard dans l'introduction.

la convergence et la divergence des réponses physiologiques parmi les animaux ; 2) les ajustements permettant à des espèces proches de coloniser des habitats très différents ; 3) des espèces apparentées habitant le même environnement extrême ; 4) des organismes éloignés s'adaptant au même environnement extrême. Ces cadres conceptuels permettent de révéler des stratégies adaptatives et de fournir des généralisations concernant les interrelations entre les organismes et leur environnement biotique et abiotique qui ne sont donc pas forcément dépendantes de l'espèce (Degen, 2012; Tracy, 1988). Ce passage à la généralisation des réponses physiologiques fut accéléré par l'émergence d'études en écologie à l'échelle des écosystèmes ainsi que par le développement des modèles mathématiques appliqués à l'analyse des systèmes.

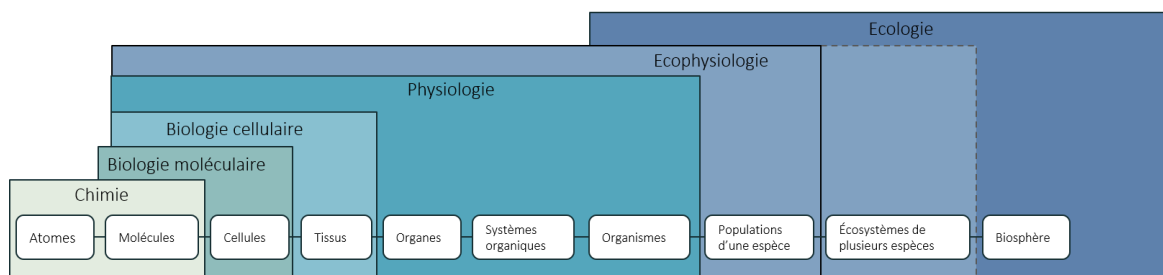


Figure 2. Mise en contexte de l'écophysiologie, discipline intégrative, parmi les disciplines de la biologie. Modifié d'après Silverthorn et al. (2015)

1.4 Acclimatation, adaptation et traits d'histoire de vie

Les réponses des organismes face à des conditions environnementales changeantes dont nous venons de discuter à travers la discipline de l'écophysiologie, sont étudiées notamment en termes de temporalité à travers les concepts **d'acclimatation et d'adaptation**. Le processus d'adaptation, est un processus se mettant en place à travers plusieurs générations. Ce processus répond à la sélection naturelle et se repose sur des bases génétiques et épigénétiques, en étant souvent irréversible (Garland and Carter, 1994). Il faut noter cependant qu'en physiologie et en écophysiologie, le terme d'adaptation a été (et est) régulièrement utilisé sans que les processus évolutifs inhérents au phénomène n'aient été étudiés sur plusieurs générations (Bennett, 1997; Kelly et al., 2012). En effet, ce terme est alors utilisé pour décrire un mécanisme physiologique singulier permettant une tolérance à long terme à une condition environnementale donnée ou à ses variations. Par exemple, chez les crustacés décapodes, l'osmorégulation est considérée comme la fonction principale ayant facilité les adaptations des organismes afin de pouvoir tolérer diverses gammes de salinités et donc de coloniser d'autres milieux théoriquement plus contraignants (Charmantier et al., 2001; Rahi et al., 2018). Pour parvenir à ce type de conclusions à travers des marqueurs physiologiques, sans occulter la dimension évolutive du concept d'adaptation, il apparaît désormais nécessaire d'étudier les réponses des organismes à

travers différents stades de vie et sur plusieurs générations. On pourra alors parler **d'adaptations écophysiologiques**.

Le processus d'acclimatation est, quant à lui, plus rapide et peut apparaître plusieurs fois au cours de la vie d'un individu. Il peut également être réversible et résulte de l'interaction de l'individu avec un changement de son environnement (Coles and Brown, 2003). Les processus d'acclimatation se traduisent par des modifications à différentes échelles : organe (modification du rythme cardiaque en réponse à un appauvrissement en oxygène par exemple), tissu (modification de l'épithélium branchial avec la salinité chez des espèces de poissons ou crustacés euryhalines engendrant des compromis osmo-respiratoires par exemple), protéines (modifications d'activités enzymatiques en lien avec des modifications du milieu externe), jusqu'à l'expression de certains gènes (Kelly et al., 2012; L'honoré, 2019). La capacité des organismes à produire, à partir de leur seul génotype, plusieurs phénotypes en réponse à des changements environnementaux est appelée plasticité phénotypique (Pfennig et al., 2010).

La compréhension de la manière dont les changements environnementaux influencent les réponses des organismes dépend, à différentes échelles temporelles dépendent des traits d'histoire de vie, des mécanismes adaptatifs et des processus d'acclimatation. Colinet et al. (2015) ont ainsi montré que les réponses des insectes face à des fluctuations de températures (en comparaison à des températures constantes) divergent à de nombreux niveaux d'organisation : des niveaux physiologiques jusqu'aux traits d'histoire de vie et à la *fitness* des populations. Ainsi, afin de maintenir une homéostasie fonctionnelle, les ajustements phénotypiques s'expriment tout au long de la vie de l'organisme et comprennent une série de réponses au cours de la vie des individus, allant des ajustements physiologiques aux modifications de la phénologie et aux changements d'aires de répartition (Renault et al., 2018).

Au cours de cette thèse, nous avons principalement étudié des réponses à court terme (entre 6 et 96h) qui sont présumées relever davantage d'acclimations que d'adaptations, en considérant différents niveaux d'organisations et de temporalités.

Cette thèse en écophysiologie mobilise les concepts que nous venons d'aborder afin de répondre aux questions scientifiques qui seront posées, à travers une approche basée sur :

- 1) **L'exposition contrôlée de crabes à des contaminants stressants mais représentatifs des aléas du milieu naturel sous influence anthropique (rejets d'eau usée domestique)**
- 2) **L'analyse des réponses physiologiques de différentes espèces de crabes, au moyen de biomarqueurs à différents niveaux d'intégration (des activités enzymatiques au comportement)**

- 3) La prise en considération dans nos travaux des acclimations spécifiques au milieu intertidal contraignant (stress osmotique - mangrove) nécessitant des compromis physiologiques importants dès lors que les organismes sont exposés à d'autres contraintes non environnementales (stress anthropique - eaux usées)

2. Contexte écologique

2.1 Les écosystèmes de mangroves

Les mangroves sont des forêts de vasières considérées comme des écosystèmes écotones permettant le lien entre les milieux terrestres et marins. Elles se développent dans les zones côtières des régions intertropicales (entre 30° S et 30° N), dans la zone de balancement des marées (zone intertidale). Elles sont colonisées par des arbres spécifiques capables de croître en présence d'eau douce et/ou d'eau de mer : les palétuviers, mais sont également composées de palmiers, d'épiphytes et de fougères (Capdeville, 2018; Tomlinson, 1986). Ces végétaux partagent une variété d'adaptations leur permettant de croître dans un environnement particulier, plutôt instable, rigoureux et salé ou saumâtre (Blasco et al., 1996; Herteman, 2010). Ces adaptations peuvent être d'ordre :

- Morphologiques (racines échasses pour le genre *Rhizophora*, racines secondaires verticales émergeant de l'eau appelée pneumatophores pour les genres *Avicennia* et *Sonneratia*)
- Physiologiques (facilitation de la respiration et tolérance au sel : blocage de l'entrée du sel au niveau racinaire ou présences de glandes foliaires excrétrices)
- Reproductives : caractère de viviparité : après fécondation, l'embryon se développe sur la plante-mère (Tomlinson, 1986).

Les mangroves se développent principalement dans les zones littorales peu profondes, le long des deltas fluviaux, des lagunes, des îles et des estuaires (Snedaker and Snedaker, 1984) sur près d'un quart des côtes mondiales (plus de 110 pays), représentant 0,4 % des forêts mondiales et 0,7 % des forêts tropicales (Giri et al., 2011). Au vu de leur vaste répartition et de leurs aires de développement (**Figure 3**), il est important de préciser qu'elles sont à même de croître dans des habitats très différents, aux caractéristiques physico-chimiques variables, du moment que la température de l'eau de mer en période hivernale ne descend pas au-dessous de 20°C et que des apports d'eau douce sont présents. Les mangroves étudiées dans cette thèse se situent dans l'aire Indo-Pacifique-Ouest, sur les rivages occidentaux de l'océan Indien où se développent 7 espèces de palétuviers, présentant une

relativement faible diversité spécifique en comparaison des mangroves Indo-Malaises ou Indo-Pacifiques (**Figure 3**).

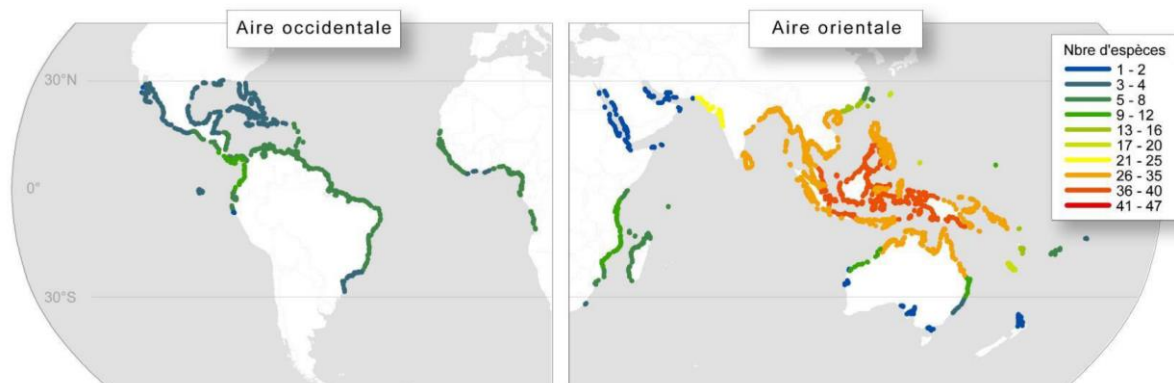


Figure 3. Répartition mondiale des espèces végétales de mangrove appartenant aux deux aires biogéographiques : l'aire orientale (Indo-Pacifique-Ouest) et l'aire occidentale (Atlantique-Pacifique-Est). Il n'existe aucune espèce commune à ces deux aires. L'échelle de couleurs est indicatrice du nombre d'espèces de palétuviers (Fromard et al., 2018).

Les progrès en matière d'analyse d'image, notamment de télédétection depuis les années 2000 ont permis d'améliorer les connaissances des dynamiques spatiales globales de ces écosystèmes. Le « World Atlas of Mangroves » estimait l'aire totale des mangroves à 152361 km² en 2000-2001 (Spalding et al., 2010). La première analyse uniquement basée sur la télédétection estima la surface mondiale de mangroves à 137760 km² pour l'an 2000 (Giri et al., 2011), actualisée à 137600 km² pour l'année 2010 (Bunting et al., 2018). Pour l'année 2014, Hamilton et Casey (2016) ont mis à jour cette surface qui s'élevait à 83495 km². Les auteurs expliquent cependant que la diminution de plus de 54000 km² par rapport à Giri et al., 2011 est principalement due à des différences méthodologiques.

Les mangroves sont constituées de quatre compartiments majeurs en interaction permanente : deux compartiments abiotiques (l'eau et les sédiments), et deux compartiments biotiques (la végétation et la faune). Ce sont des écosystèmes ouverts, et des flux de matière traversent ces différents compartiments, en particulier grâce à l'écoulement de l'eau. Les variations de niveau d'eau sont provoquées par les marées et la houle, ainsi que par les apports en eau douce (cours d'eau, pluie) (Herteman et al., 2011). Si le compartiment végétation est composé d'un faible nombre d'espèces d'arbres, celles-ci sont spécifiques de cet habitat et représentent le compartiment principal des mangroves. La végétation permet d'augmenter la stabilité du substrat vaseux en favorisant le dépôt des matières en suspension. Le compartiment faune est beaucoup plus diversifié que le compartiment végétal.

Au-dessus de l'eau, les palétuviers abritent de nombreuses espèces d'oiseaux, d'insectes, de mammifères, de reptiles et de champignons. Sous l'eau, les racines sont le support de nombreux épibiontes (tuniciers, éponges, algues, bivalves) et ses anfractuosités permettent

le refuge d'espèces mobiles : crustacés (crevettes, crabes) et poissons (Nagelkerken et al., 2008; Theuerkauff, 2019). Les plus nombreuses sont certainement les espèces liées aux sédiments, dites "benthiques" : méiofaune (copépodes, nématodes, turbellariés, etc.) ou macrofaune : mollusques, crustacés. Certaines d'entre elles sont considérées comme **ingénieurs de l'écosystème** : ce sont les espèces dont les actions ont un "impact significatif sur la structure physique de leur habitat et les organismes qui y vivent" (Jones et al. (1994), traduction personnelle). Les crabes de mangrove en font partie et jouent un rôle important dans la structure et le fonctionnement des mangroves de par leur **activité bioturbatrice**⁴ (Kristensen, 2008; Kristensen et al., 2012; Penha-Lopes et al., 2009). En effet, ces crabes enterrent, broient et ingèrent la litière et les films de micro-algues tout en favorisant les processus de décomposition de la matière organique qui n'est pas emportée par les marées (Emmerson and McGwynne, 1992; Kristensen and Alongi, 2006; Lee, 1997). Le compartiment des sédiments est quant à lui le siège des processus biogéochimiques et soutient les autres compartiments de la mangrove. Il contient de nombreux micro-organismes, bactéries et enzymes permettant le recyclage de la matière organique. Ceux-ci sont fortement influencés par l'écoulement de l'eau et par les phénomènes de bioturbation réalisés par la méiofaune (Lee, 1998).

Il existe une forme de zonation dans la distribution spatiale des différentes espèces de palétuviers, qui occupent des étages distincts avec peu de chevauchement. Les espèces de palétuviers sont organisées en bande de végétation en fonction de la topologie du terrain, de la hauteur des marées, et de la durée d'immersion des palétuviers dans l'eau de mer (Robertson and Alongi, 1992). Des gradients environnementaux entrent aussi en jeu, tels que la salinité du substrat, la composition du sol et de l'eau de surface, la disponibilité en nutriments et la température (Ball, 1998). Cette structure de mangroves ne repose pas sur des zonations types mais dépend exclusivement des conditions du milieu (Capdeville, 2018). Les espèces sensibles à de fortes salinités telles que celles du genre *Rhizophora* vont préférer le front de mer alors que d'autres telles que celles du genre *Avicennia* tolèrent ces conditions et peuvent se développer en arrière mangrove sursalée (Tomlinson, 1986).

2.2 Les crabes

Il est communément admis que la distribution spatiale des crabes est liée à cette zonation végétale observée en milieu intertidal. Ces points de vue ont été développés après des études comme celles de Hartnoll et al. (2002), Macnae, (1969) ou encore Sasekumar (1974) qui ont divisé les mangroves en zones classées selon les niveaux des marées, le temps d'inondation, la composition florale, la texture du sol et qui ont ensuite décrit les

⁴ La bioturbation a été définie par Kristensen et al. (2012) comme "tous les processus de transport effectués par les animaux qui affectent directement ou indirectement les matrices sédimentaires. Ces processus comprennent à la fois le remaniement des particules et la ventilation des terriers."

assemblages de crabes typiques de chaque zone (Cannicci et al., 2018). Par la suite, de très nombreuses publications ont confirmé ces schémas de distribution des crabes de mangrove de l'aire indo-pacifique, rassemblant de grandes quantités de données sur la zonation des brachyours dans les mangroves. Si les crabes de mangrove adultes sont généralement inféodés aux zones intertidales, la dispersion du groupe est presque entièrement déterminée par leur stade larvaire pélagique avec des facteurs abiotiques tels que les marées, la température de l'eau, la salinité étant susceptibles de faire partie des facteurs critiques contrôlant le littoral où les juvéniles vont s'installer (voir Rosenberg (2020) pour une review). Ainsi, les crabes libèrent généralement les larves pendant la nuit lors des grandes marées afin qu'elles soient transportées vers les eaux océaniques qui assureront leur dispersion (Emmerson, 2014 ; Papadopoulos et al., 2002). Au cours de leur vie océanique, les larves vont se développer et passer par un nombre de stades zoé déterminé (2 à 5 selon l'espèce) ayant chacun une capacité différente de migration verticale dans la colonne d'eau, leur permettant de suivre des courants, de maintenir une certaine capacité à se guider dans la colonne d'eau (Queiroga and Blanton, 2004) et ainsi permettre de coloniser un habitat adéquat lors de leur dernier stade larvaire : le stade mégaloïde.

Les Eubranchia (les "vrais crabes") constituent l'infra-ordre des crustacés décapodes, qui comprenait 7188 espèces en 2014 (Schram and Castro, 2015) et de nombreuses espèces sont encore régulièrement découvertes. La faune benthique des mangroves est dominée par des décapodes fouisseurs herbivores tels que les crabes violonistes (famille des Ocypodidae) et les crabes sesarmides et grapsides (famille des Sesarmidae et des Grapsidae) (Kristensen, 2008). Les crabes étudiés dans cette thèse appartiennent à la famille des Ocypodidae et des Sesarmidae : les Grapsidae et Sesarmidae occupent davantage le haut de mangrove (faciès *Avicennia* et *Ceriops*) et les Ocypodidae occupent plutôt la partie médiane (faciès *Ceriops* et *Rhizophora*) (Hartnoll et al., 2002). Afin de mieux appréhender les enjeux concernant les espèces étudiées ainsi que leurs habitats, une brève présentation en est proposée.

Les crabes violonistes (Ocypodidae) sont caractérisés par la présence chez les mâles de chélicères dissymétriques, avec une pince beaucoup plus grande que l'autre d'où leur surnom (on trouve encore 'crabe appelant' à La Réunion, 'sémafot' en Guadeloupe, ou 'Siho maneki' au Japon : celui qui appelle la marée) (**Figures 13B** et **13C**, p :33). Cette pince joue un rôle important dans les comportements sociaux : les mâles agitent cette pince ("claw-waving") afin d'attirer les femelles dans leurs terriers, et s'en servent pour combattre les autres mâles rivaux, ou pour marquer leur territoire. La plupart des crabes violonistes sont plus actifs à marée basse (Crane, 1975; Weis and Weis, 2004), lorsqu'ils sortent de leur terrier. Ils peuvent parfois représenter de très fortes densités (jusqu'à 70 individus par m²) dans les mangroves d'Asie du Sud-Est, et l'on a dénombré entre 120 et 160cm³ de sol brassé par m² et par jour lorsque ces densités sont rencontrées (Kristensen, 2008). Cette activité de bioturbation influence fortement la structure et le contenu du sol de mangrove (Spalding

et al., 2010), justifiant en partie de les considérer comme espèce ingénieur de l'écosystème. Ils privilégient les zones ouvertes d'arrière-mangrove, généralement sous les *Avicennia* ou les *Heritiera* et les zones de tannes (Bouchard et al., 2013) où l'intensité lumineuse est forte et stimule la croissance du micro-phyto-benthos (Capdeville, 2018). Ces crabes sont en effet détritivores et se nourrissent d'un mélange de micro-algues benthiques et péripHYtiques, de bactéries, de débris de feuilles et de détritus en grattant la surface des éléments (Cannicci et al., 2008).

Les **Sesarmidae** et les **Grapsidae** sont quant à eux des consommateurs de litière, de feuilles ainsi que de propagules qu'ils transportent et stockent dans leurs terriers (Cannicci et al., 2008; Capdeville, 2018; Lee, 1998). Les Sesarmidae privilégient les zones de mangrove fermée, où la nourriture est abondante et où le réseau de pneumatophores et de racines offre une protection contre les prédateurs et les fortes températures (Kristensen, 2008). Ces crabes creusent aussi des terriers. Leur densité est généralement plus faible que les crabes violonistes (1-5 individus.m⁻², mais ils sont plus gros et la quantité de sédiment bioturbée est similaire (80-210.cm⁻³) (**Figure 4**).

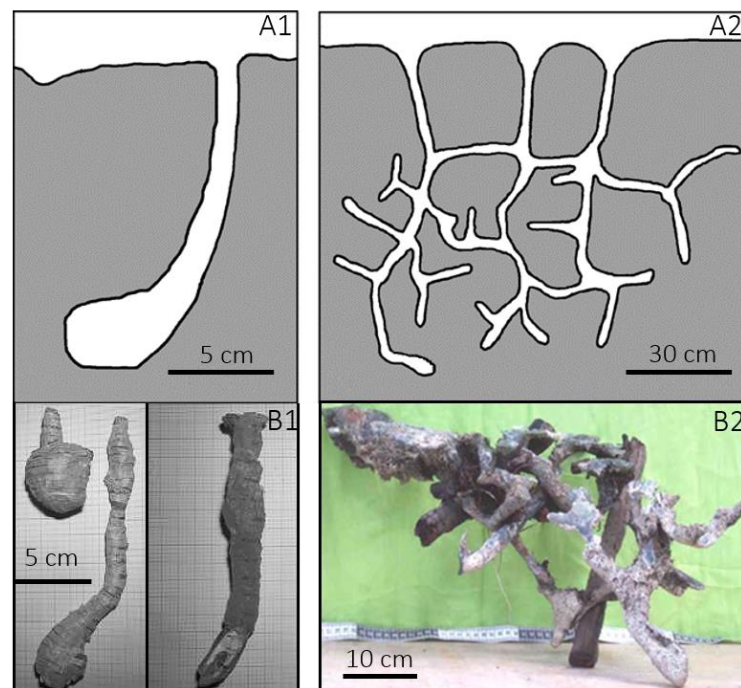


Figure 4. Schémas (A) et photographies de moulages de terriers (B) de crabes : 1) violonistes, 2) Sesarmidae. A : modifié de Kristensen et al. (2008). B1 : modifié de Bartolini et al. (2011). B2 : modifié de Herteman (2010).

Ces crabes, nous l'avons mentionné, sont considérés comme des espèces ingénieurs, c'est-à-dire des espèces ayant des "impacts significatifs" sur la structure physique de leur habitat et sur les organismes qui y vivent (Jones et al., 1994). Ce sont des espèces capables de lier les aspects trophiques et physiques (habitat) des communautés à travers leurs réseaux d'interaction, en ayant impact plus important que les autres espèces en raison de leur rôle

central dans le maintien de l'écosystème (Coggan et al., 2018; Sanders et al., 2014). Cette activité d'ingénierie, la bioturbation, est considérée comme une fonction écologique pouvant être prise en compte dans l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes ou de gestion des risques environnementaux (Coggan et al., 2018) (**Tableau 1**). Ces informations fournissent des raisons pertinentes d'étudier ces crabes dans une optique de meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes de mangroves et de leur vulnérabilité face à des pressions anthropiques.

Tableau 1. Variables pouvant être utilisées dans le choix et l'évaluation de certaines fonctions écologiques à visée de conservation des écosystèmes, modifié d'après Brodie et al. (2018).

Fonctions	Variable indépendante	Variable réponse immédiate	Variable réponse finale
Dispersion des graines par zoochorie	Densité des animaux frugivores	Nombre de graines dispersées par zoochorie.	Risque d'extinction des espèces d'arbres à dispersion zoochore
		Distance de dispersion des graines.	Stockage du carbone par les forêts
Prédation	Densité des prédateurs	Taux d'herbivorie	Risque d'extinction des espèces de plantes vulnérables aux herbivores.
		Densité de proies	Diversité des consommateurs primaire Productivité végétale
Atténuation des zoonoses	Densité des grands mammifères	Densité de tiques infectées	Probabilité de transmission de zoonose
Transport du phosphore (P)	Densité des grands mammifères	Taux de transport du phosphore (P)	Productivité ou densité végétale
Pollinisation	Densité des pollinisateurs	Graines semées dans des plantes croisées	Risque d'extinction des plantes croisées
Ingénierie écosystémique	Densité des espèces ingénieurs	Ampleur des modifications structurelles de l'habitat	Diversité de la communauté
Espèces fondatrices	Couvert forestier de mangroves	Force des vagues pendant les tempêtes	Erosion côtière
		Abondance de juvéniles de poissons	Productivité de la pêche côtière

2.3 Fonctions écologiques⁵ des mangroves

Les écosystèmes de mangrove font partie des écosystèmes les plus productifs au monde (Alongi, 2002; Mohamed et al., 2016). Ils sont caractérisés par une productivité élevée, une biomasse importante ainsi qu'une production de litière élevée par rapport aux autres écosystèmes terrestres (Mohamed et al., 2016). Depuis de nombreuses années, les fonctions des écosystèmes de mangrove sont étudiées et reconnues : nous n'en ferons pas ici la revue détaillée. Elles représentent notamment de zones de reproduction, d'alimentation et d'abri pour diverses espèces terrestres et aquatiques, notamment les poissons, les crevettes et les crabes qui passent au moins une partie de leur cycle de vie dans les mangroves (Igulu et al., 2014; Lugendo and Kimirei, 2021). Pour les communautés humaines, elles représentent des ressources alimentaires, du bois, des produits chimiques et de pharmacopée (Cannicci et al., 2009). De plus, les forêts de mangroves forment une zone tampon protégeant le littoral contre l'érosion liée à la force des vagues, et réduisent l'impact du vent et des événements climatiques extrêmes tels que les tempêtes, tsunamis et ouragans (Ouyang and Guo, 2016; Zhang et al., 2012). Grâce à leur grande surface d'échange, aux capacités de filtration des nutriments par la végétation et aux fortes capacités d'absorption des sols, ces écosystèmes participent à la minéralisation de la matière organique et des matières en suspension des eaux estuariennes et côtières (Capdeville, 2018; Ewel et al., 1998; Nagelkerken et al., 2008). Le piégeage du carbone organique dissous, de l'azote et du phosphore ainsi réalisé contribue à améliorer la qualité des eaux estuariennes et côtières (Wang et al., 2010). Ces dernières fonctions, ainsi que la position des mangroves à l'interface terre-mer (donc, souvent à proximité des zones anthropisées), confèrent aux mangroves des conditions aérobies et anaérobies nécessaires à la réduction des polluants contenus dans les eaux usées domestiques (Tam and Wong, 1995; Wong et al., 1997). Il est ainsi considéré que les mangroves possèdent un réel potentiel pour être utilisées comme traitement naturel final des eaux usées domestiques, permettant la réduction de la pollution côtière et les risques d'eutrophisation et de bloom algal (Clough et al., 1983; Ouyang and Guo, 2016; Tam, 1998; Tam and Wong, 1996). La bioturbation réalisée par les crabes de mangrove joue alors un rôle très important : la construction des terriers permet tout simplement l'infiltration des eaux usées, rendant possible les processus de **bioépuration** en augmentant considérablement la surface d'échange entre le sédiment et les eaux usées,

⁵ Nous retiendrons la définition proposée par Brodie, Redford and Doak (2018) : une fonction écologique est une interaction entre espèces, ou un rôle écologique par lequel une espèce ou un groupe d'espèces (groupe fonctionnel) prévient une extinction secondaire ou une mise en danger, maintient un flux ou un pool biogéochimique, ou soutient la productivité de l'écosystème (traduction personnelle)

la rendant davantage disponible aux micro-organismes et aux racines de palétuviers, et empêchant son écoulement vers le lagon (Theuerkauff, 2019).

2.4 Pressions et menaces sur les mangroves

Nous l'avons vu, il existe de nombreuses mangroves à l'échelle de la planète présentant des caractéristiques biotiques et abiotiques différentes en fonction des différents forçages environnementaux, mais également en fonction des pressions anthropiques qu'elles subissent. Ainsi, les pressions peuvent être très différentes d'une région à l'autre, voire d'une mangrove à l'autre. La position d'interface terre-mer occupée par les écosystèmes de mangroves en font des réceptacles des rejets d'activités anthropiques telles que l'aquaculture, l'agriculture, les pollutions urbaines, le tourisme ou la pollution côtière (Alongi, 2002; Lugendo and Kimirei, 2021; Thomas et al., 1996; Xiang et al., 2020). La déforestation a également un impact important sur ces écosystèmes avec des causes variées : aquaculture, agriculture, développement urbain, coupe pour l'utilisation du bois (pharmacopée, charbon, feux)... (Friess et al., 2019). Les taux de déforestation ont été si élevés qu'une perte de 35 % des mangroves mondiales aurait eu lieu entre les années 1980 et 1990, même si des études récentes montrent également que les dynamiques de conservation mise en place à l'échelle mondiale depuis des années portent leurs fruits et laissent de la place pour une conservation plus "optimiste" (Friess et al., 2020). Le périmètre d'étude de cette thèse se situe dans le Canal du Mozambique où l'on trouve de nombreux linéaires côtiers de mangroves. On retrouve par exemple à Madagascar 2 % (3000 à 4000 km²) de la surface mondiale des mangroves (Giri and Muhlhausen, 2008) sur la côte Ouest. Ces mangroves connaissent une déforestation croissante due à l'utilisation du bois pour la construction des habitations, la fabrication du charbon ou par leur conversion en surfaces agricoles et aquacoles (Scales et al., 2018). Même si l'on garde en tête qu'il existe de très nombreuses variations géographiques dans les dynamiques socio-économiques de ces écosystèmes (Jones et al., 2016), les mangroves jouent un rôle central dans les moyens de subsistance des communautés humaines à Madagascar (Scales et al., 2018). De l'autre côté du Canal, les mangroves du Mozambique forment l'une des plus grandes mangroves d'Afrique (3054 km²) juste derrière le Nigeria. Les pêcheries semblent représenter une part importante dans l'usage des mangroves : en 2016, les crevettes représentaient la 9^{ème} denrée la plus exportée du pays et les mangroves proches soutiennent les zones de pêches les plus importantes (Sofala Bank, delta du Zambèze ou encore celles de la baie de Maputo) (Macamo, 2018). Les plus récentes estimations de déforestation des mangroves ont indiqué une réduction de 27 % des mangroves entre 1972 et 2002 (Fatoyinbo et al., 2018), dans les zones fortement anthropisées. Les principales raisons de ces destructions sont liées à la surexploitation du bois pour le feu, l'extension urbaine et le développement des activités côtières (Barbosa et al., 2001; Macamo and Siteo, 2017; Taylor et al., 2003). La conversion des mangroves pour la production de sel

représente également une menace pour plusieurs mangroves du Nord du Mozambique, et la construction de fermes aquacoles aurait engendré d'importants problèmes d'érosion. Le pays est également soumis à de fortes pressions environnementales (cyclones, inondations, érosion) qui contribuent également à la dégradation des mangroves. On retrouve les mêmes types de pression un peu plus au Nord dans les mangroves de Zanzibar (Tanzanie), où en 40 ans (avant 1989), 7 % des mangroves ont été détruites et où la demande de bois pour le feu était, en 2002, 100 fois supérieure à celle de 1950 (Bandeira et al., 2009; Taylor et al., 2003). Plus récemment, les destructions de mangroves côtières ont été liées aux constructions d'habitations et d'espaces touristiques sur la côte, l'industrie du tourisme s'était rapidement développée ces 20 dernières années (Mabula et al., 2017). Au Kenya, la dégradation et la transformation des mangroves sont liées à la surexploitation du bois de palétuviers, la conversion des forêts en terres aquacoles et en marais salants, ainsi qu'à la pollution (Abuodha and Kairo, 2001). On pourrait alors penser que les mangroves du Canal du Mozambique sont soumises à des pressions de nature similaire, notamment car les communautés humaines se reposent beaucoup sur les ressources des mangroves, comme nous venons de le voir. Ce n'est pas forcément le cas de Mayotte, notre site d'étude principal, où la plupart des familles locales s'appuient sur des activités d'agriculture (maraîchage) et où les écosystèmes de mangroves sont moins sollicités (Longépée et al., 2021). Les activités de pêche sont moins communes et reposent plus sur l'exploitation des récifs coralliens, ou sur des combinaisons d'espèces ciblées et de types de pêches précis (exemple : pêche du poulpe au djarifa) (Longépée et al., pers. comm.) Avant les années 2010, les plus grandes destructions de mangroves furent dues aux travaux importants d'infrastructures : construction du port de Longoni (destruction totale de la mangrove), du terre-plein de M'tsapéré (destruction de 8,5 ha), route nationale d'Ironi Bé qui coupe la mangrove en deux, construction de la zone industrielle de Kaweni sur 7,5 ha de mangrove (Thongo, 2016) (**Figure 5**).

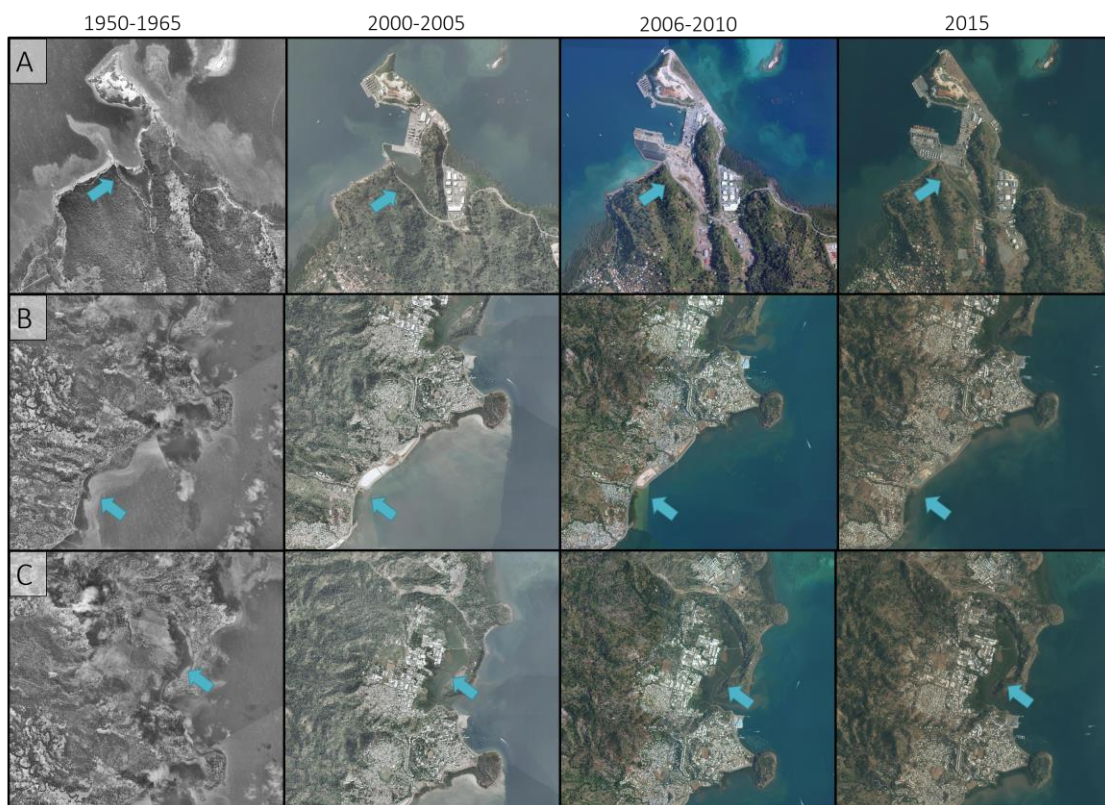


Figure 5. Exemples d'évolution de surfaces de mangroves à Mayotte au fil des aménagements urbains entre 1950 et 2015 A : Port de Longoni. B : Terre-plein de Mtsapéré. C : Zone industrielle de Kaweni. Sources : IGN. Les flèches bleues indiquent les mangroves impactées par les travaux.

D'après Longépée et al. (2021), l'augmentation des importations ces dernières années (nourriture, carburant, matériau de construction) et l'interdiction de coupe de mangrove (décret n° 98-935 promulgué en 1998 à Mayotte) ont fortement réduit les pressions anthropiques sur ces écosystèmes. Cependant, ils sont bel et bien le réceptacle de pollutions, notamment domestiques. L'arrière-mangrove (côté terre) est dominée par des macro déchets provenant des habitations avoisinantes tandis que le côté mer piège les déchets transportés par la mer ou la rivière entre les pneumatophores des palétuviers (Longépée et al., 2021). Les mangroves se situant généralement à l'embouchure des cours d'eau, elles reçoivent également la pollution véhiculée par les eaux de surface. C'est notamment le cas des eaux usées domestiques à Mayotte, qui présentent un problème majeur puisqu'en 2016, 85 % des habitations n'étaient pas raccordées à un réseau d'assainissement (Capdeville, 2018; Thongo, 2016). C'est ce type d'apport d'origine anthropique, revêtant une importance environnementale et sanitaire, que nous avons étudié au cours de cette thèse.

3. Environnement scientifique de la thèse

3.1 Projets et contexte institutionnel

Bioremédiation des mangroves mahoraises : le projet “Malamani”

Afin de mieux comprendre les enjeux de cette thèse, il est important d'évoquer les projets et thématiques de recherche dans lesquels elle s'inscrit, même de manière indépendante. C'est pourquoi nous présentons ici rapidement l'historique du projet pilote d'assainissement *in situ* associant le SIEAM⁶ et le laboratoire EcoLab (Toulouse), visant à valider le principe d'utilisation de la mangrove du village de Malamani (Mayotte) comme un exutoire pour le rejet d'eau usée domestique prétraitée par décantation-digestion. Ce projet “Mangrove et Bioremédiation” a donné lieu à deux thèses de doctorat en écologie. La première, publiée en 2011 (soit 3 ans après le début du projet) par Mélanie Herteman, visait à évaluer les **capacités bioremédiatrices**⁷ de la mangrove de Malamani, impactée par l'eau usée domestique déversée de manière contrôlée dans le cadre du site pilote. Cécile Capdeville (2018) a évalué, sur le même site après 10 ans de rejets contrôlés, les capacités de résistance et de résilience de l'écosystème mangrove en réponse à ces apports d'eaux usées domestiques. Les quatre compartiments de l'écosystème de mangrove ont été pris en compte dans ces études structurales et fonctionnelles du site de Malamani. De manière très synthétique, les résultats observés ont révélé une augmentation de la productivité végétale dans les parcelles impactées par les eaux usées. Concernant le compartiment faune, les crabes de mangrove ont été préférentiellement étudiés du fait de leur rôle important pour le fonctionnement de l'écosystème, comme indiqué plus tôt. Les résultats obtenus en 2014 ont révélé une diminution de la diversité spécifique des crabes présents au niveau des parcelles recevant les eaux usées, mais aucun effet sur les densités n'a été observé (Capdeville, 2018).

⁶ Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte

⁷ La bioremédiation est définie comme le processus par lequel les déchets organiques sont biologiquement dégradés dans des conditions contrôlées à une concentration inoffensive, ou au-dessous des limites de concentration établies par la réglementation (Anderson et al., 1997; Mueller et al., 1996; Vidali, 2001)

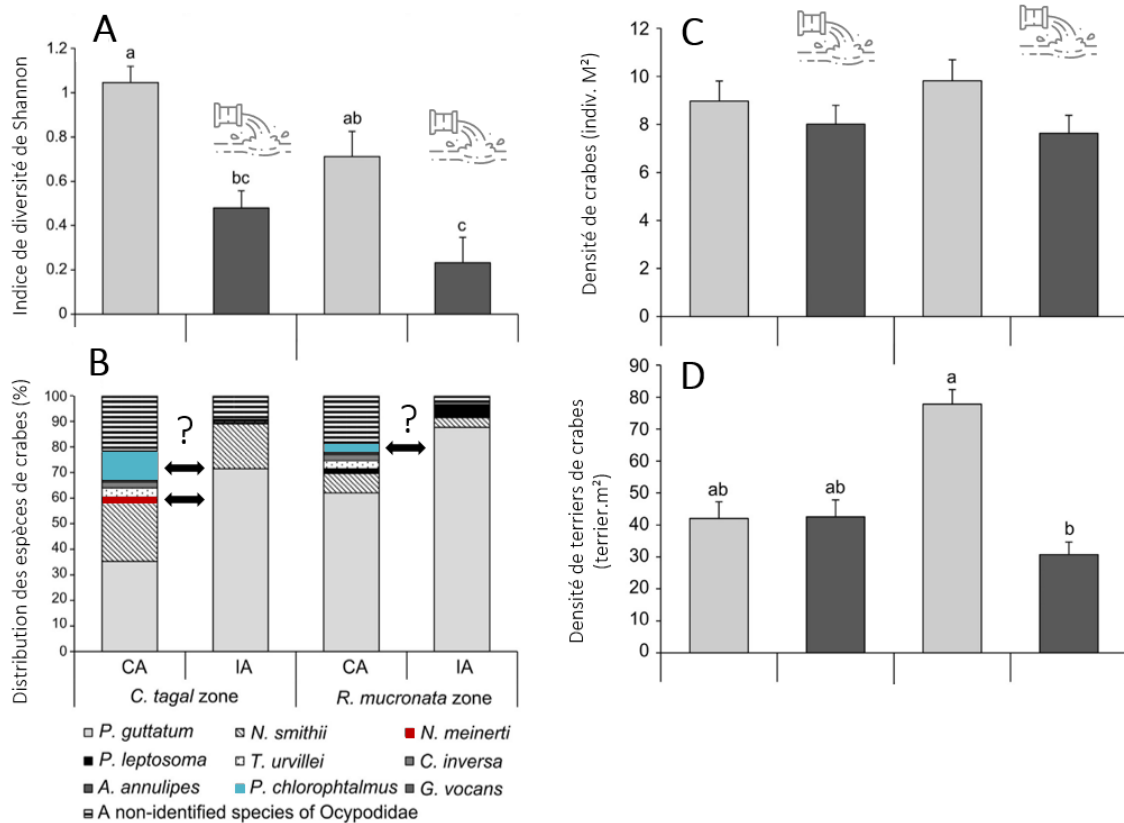


Figure 6. Observations réalisées sur la diversité et la distribution des crabes et des terriers dans les zones de contrôle (CA) et les zones impactées (IA) de la mangrove de Malamani en fonction des faciès de végétation entre 2012 et 2014, par Capdeville (2018). A : Indice de diversité de Shannon ; B : Distribution des espèces de crabes. En bleu et en rouge, *Paraleptuca chlorophthalmus* et *Neosarmatium africanum*, deux espèces de crabes étudiées au cours de cette thèse. C : Densité de crabes par m² ; D : Densité de terriers de crabes par m².

Ces résultats suggèrent des modifications dans les assemblages des communautés de crabes, certaines espèces ayant pu profiter de la disparition ou de la diminution des autres. Dans ce contexte, il est apparu intéressant voire crucial de mieux comprendre les effets de ces rejets d'eau usée sur les crabes de mangroves, notamment à travers l'étude de leur physiologie et de leurs réponses individuelles à l'échelle de l'organisme. Dimitri Theuerkauff (2018) (Université de Montpellier, CUF de Mayotte) a ainsi cherché à comprendre les effets des rejets d'eaux usées domestiques sur la physiologie de ces crabes de mangrove (Sesamidae et Ocypodidae) lors de sa thèse, en adoptant une approche écophysiologique. Différents marqueurs de stress ont été développés sur trois espèces différentes présentes sur le site, différemment impactées *in situ* à l'échelle des communautés. Des réponses spécifiques à l'espèce ont été mises en évidence, notamment au niveau du taux métabolique des animaux exposés à l'eau usée pendant de courtes périodes se traduisant :

- soit pas une très forte consommation d'O₂ chez des espèces disparaissant quasiment des zones impactées (**Figure 6.B**) telles que *Tubuca urvillei*, *Paraleptuca chlorophthalmus* et *Neosarmatium africanum* ;
- soit par une diminution de la consommation d'O₂ chez une espèce dont l'abondance augmente en zone impactée (*Persisesarma guttatum*).

Ces résultats permettent de considérer différentes stratégies physiologiques pour tolérer les rejets anthropiques.

Le présent manuscrit de thèse s'inscrit, en partie, dans la poursuite de ces études sur l'impact des eaux usées sur l'écophysiologie des crabes de mangroves tout en étant indépendant du projet "Malamani" conduit par Ecolab. Plusieurs missions à Mayotte ont été organisées afin de répondre aux objectifs de recherche qui seront présentés dans la 5^{ème} partie de cette introduction.

Le projet MANMAC: Impact des apports nutritifs d'origine anthropique sur le fonctionnement des mangroves insulaires. Définitions de suivi du compartiment macrofaune

Les crabes de mangrove étant considérés comme des ingénieurs de l'écosystème, leur étude à visée de suivi et de protection des écosystèmes de mangrove en tant qu'espèces bioindicatrices (dans le sens défini en première partie de cette introduction, à notre échelle) est pertinente. Cette thèse s'inscrit au sein d'un projet de recherche co-financé par le Consortium de recherches "Îles Eparses 2017-2020" des TAAF (Terres Australes et Antarctiques Françaises) et l'Ambassade de France au Mozambique (91 000€).

Le projet MANMAC vise à évaluer l'impact de l'apport d'éléments nutritifs (composants des eaux usées domestiques) sur le compartiment de la macrofaune benthique des écosystèmes de mangroves dans le Canal du Mozambique. Cette problématique est abordée selon une échelle temporelle et intégrative à l'aide d'une double méthodologie écologique et écophysiologique. Cette approche repose sur :

- 1) une évaluation de la diversité des organismes ainsi que des fonctions et de la structure trophique associée.
- 2) à l'échelle individuelle, il s'agit de comprendre s'il existe une vulnérabilité différente des crabes de mangroves face aux apports azotés selon leur localisation et les conditions environnementales dans lesquelles ils se sont développés.

Initialement, les travaux devaient être menés sur trois sites présentant des degrés de pressions anthropiques différents, mais la situation politique du Mozambique a restreint les écosystèmes étudiés à deux sites. D'une part, l'île d'Europa qui nous offrait l'opportunité unique d'observer le fonctionnement d'une mangrove « témoin » très peu

impactée par les activités humaines ; et l'île de Mayotte, avec certaines de ses mangroves anthropisées et connaissant des rejets réguliers d'origine anthropique (eaux usées). Outre l'amélioration des connaissances fondamentales, il s'agissait également de contribuer à la production d'indicateurs de l'anthropisation par enrichissement des mangroves. Ce type d'outil est devenu indispensable pour les gestionnaires des espaces littoraux du canal du Mozambique et des îles associées. Cette thèse s'inscrit dans l'axe 2 de ce projet qui a été clôturé en août 2021 et qui nous a donné l'opportunité unique d'installer un laboratoire durant un mois sur l'île quasiment inhabitée d'Europa (**Figure 7 et 8**).



Figure 7. Hélicoptère des caisses de matériel sur la base des TAAF et mise en place du laboratoire pour une durée d'un mois (avril 2019) dans le cadre du projet MANMAC (photos : JH Lignot, D Theuerkauff, TAAF).

3.2 Présentation des sites d'étude

Les deux sites d'étude de la thèse (île de Mayotte et d'Europa) se situent respectivement à l'extrémité Nord et Sud du Canal du Mozambique (**Figure 8**).

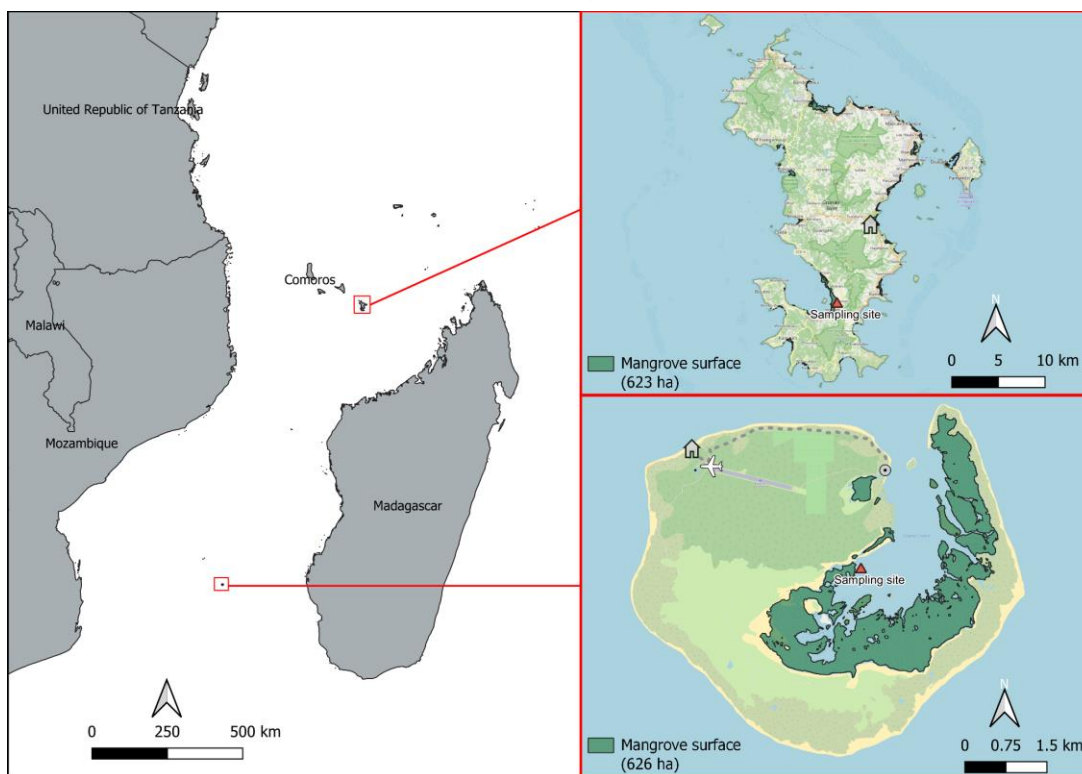


Figure 8. Localisation des deux principaux sites d'études : l'île Europa, et l'île de Mayotte.

Mayotte et la mangrove de Malamani

Mayotte est un département français (depuis 2011) situé dans l'archipel des Comores dans l'Océan Indien, au Nord du Canal du Mozambique, entre Madagascar et le continent africain (**Figure 8**). Cette île volcanique de 374 km² datant de huit millions d'années est la plus vieille de l'archipel des Comores. Elle est en fait constituée de deux îles principales (Grande Terre et Petite Terre), et d'une trentaine d'îlots d'origine volcanique ou corallienne. L'environnement côtier de Mayotte se caractérise par l'existence d'un vaste complexe récifo-lagonaire au sein duquel se développe un littoral diversifié et marqué par la présence de nombreuses mangroves (623 ha) (Jeanson, 2009). Le lagon et le récif de Mayotte représentent l'une des formations récifales les plus grandes et les plus variées de l'océan indien, avec une superficie de près de 1500 km² et environ 270 km² de structures récifales. A l'échelle de Mayotte, l'environnement littoral et lagonaire abrite environ 600 espèces de poissons, 254 espèces de coraux, plus de 530 espèces de mollusques, 270 espèces d'algues, 5 des 7 espèces mondiales de tortues marines, et 22 espèces de mammifères marins, soit plus de 2300 espèces peuplant le littoral et le lagon de Mayotte (Dinhut et al., 2008; Rolland and Boulet, 2005; Wickel et al., 2016).

Le climat de l'île est de type tropical humide, fortement influencé par l'environnement maritime et par la direction des vents. Les températures moyennes journalières varient en fonction des saisons, entre 20 et 30°C, et les précipitations y sont abondantes : on enregistre plus de 1500 mm de pluie par an en moyenne. Deux saisons rythment l'année : l'une chaude et pluvieuse qui s'étend de novembre à avril, l'autre plus fraîche et sèche entre juin et septembre (saison des alizés). Les deux saisons sont séparées par deux intersaisons plus brèves d'avril à mai et d'octobre à novembre (Jeanson, 2009). L'ensemble de l'île comporte 124 cours d'eau répartis dans 72 bassins versants bien individualisés du fait de la taille modeste de l'île et de son relief accidenté. On dénombre 24 rivières pérennes rejoignant le lagon, essentiellement dans le nord de l'île (90 % de l'écoulement total). En fait, seulement cinq rivières du sud ont un écoulement permanent, cependant associé à un débit spécifique très faible ($< 2 \text{ l.s.km}^{-2}$) (Jeanson, 2009; Lapègue, 1999). Le cours d'eau de la mangrove de Malamani (site d'étude) en fait partie, alimentant une partie de la mangrove en eau douce de manière continue.

En 2017, l'INSEE reportait 256 518 habitants sur l'île, dont la moitié avait moins de 18 ans, avec une moyenne d'âge de 23 ans⁸. Mayotte est le département français ayant la plus forte croissance démographique et la plus forte densité de population des départements hors Ile de France, fait généralement expliqué par la natalité élevée (indice de fécondité de 5 enfants par femme) et une forte immigration provenant des îles voisines (Comores, Madagascar) (INSEE, 2017). Près de la moitié de la population est de nationalité étrangère, dont 95 % est d'origine comorienne : Mayotte fait géographiquement partie de l'Archipel des Comores mais a été la seule île de l'Archipel à ne pas proclamer son indépendance en 1974, puis 1976, avant de devenir le 101^{ème} département français en 2011. Cette explosion démographique entraîne un développement urbain important essentiellement sur le littoral ainsi qu'une hausse de la consommation d'eau, et donc une augmentation de la quantité d'eaux usées produite (Capdeville, 2018). En 2017, quatre logements sur dix étaient en décrépidité et 29 % des ménages n'avaient pas l'eau courante (INSEE Mayotte, 2020; Longépée et al., 2021). Mayotte est confrontée à des difficultés foncières, économiques et environnementales qui ne facilitent pas la mise en place de systèmes d'assainissement conventionnels de type station d'épuration (Capdeville, 2018). En 2018, seulement deux stations d'épuration classiques étaient en place pour collecter et traiter les eaux usées domestiques de l'île. Le taux de raccordement à l'assainissement collectif est très faible, comme nous l'avons vu 85 % des habitations ne sont pas raccordées. Seulement 6 % des 120 mini-stations d'épuration mises en place dans des lotissements sont aux normes et fonctionnent correctement (Thongo, 2016). La grande majorité des eaux usées

⁸ <https://www.insee.fr/fr/statistiques/3713016#titre-bloc-14>

domestiques s'écoule donc librement dans les rivières et les mangroves, jusqu'à déversement dans le lagon sans réel traitement préalable (Capdeville, 2018).

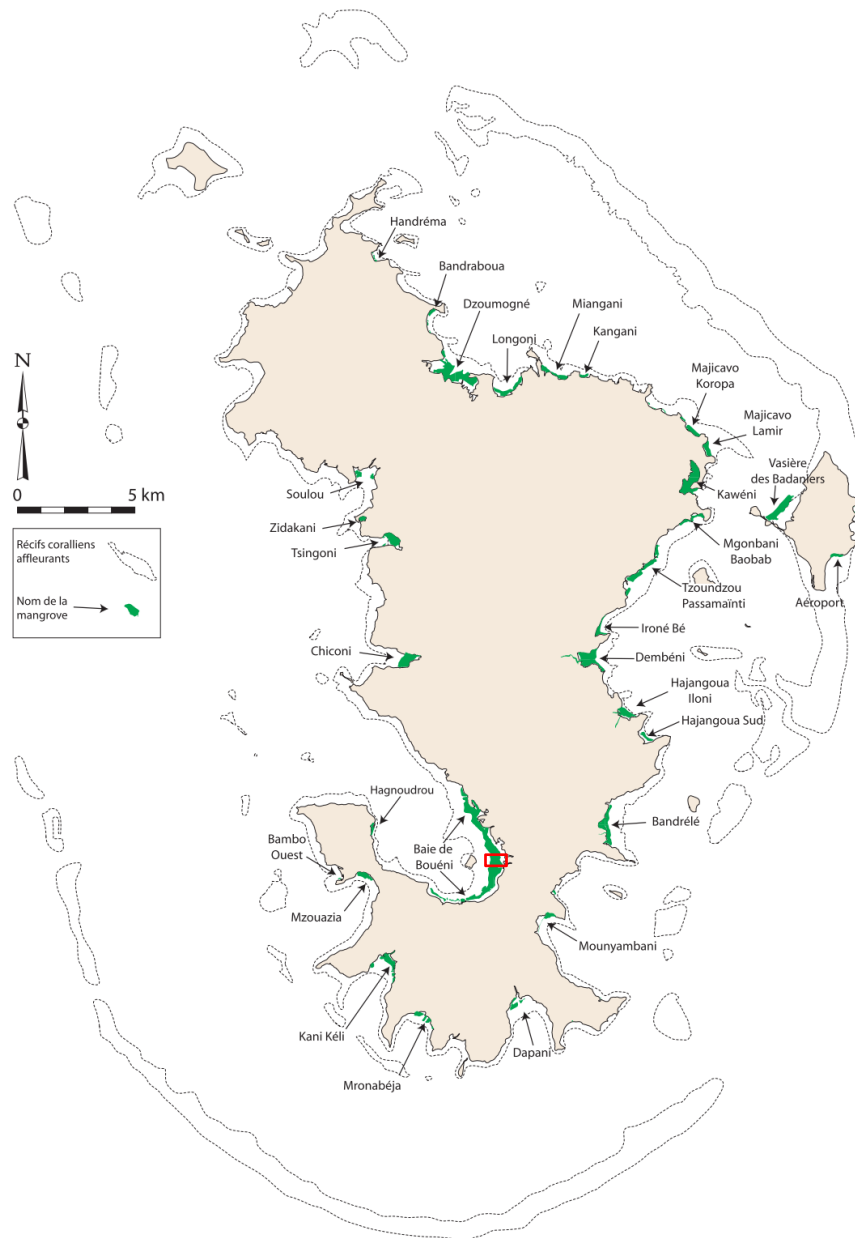


Figure 9. Représentation des mangroves de Mayotte (en vert), d'après Jeanson (2009). Le rectangle rouge représente le site d'étude de Malamani, dans la baie de Bouéni.

Les mangroves de Mayotte peuvent être regroupées en deux types en fonction de leur localisation : (1) les mangroves de fond de baie, installées dans des anses plus ou moins profondes où débouchent un ou plusieurs cours d'eau. Ces mangroves sont caractéristiques des côtes sud-ouest de l'île (Kani-Kéli, Chiconi, Dembéni, baie de Bouéni où se situe notre site d'étude); (2) les mangroves littorales ou de front de mer qui forment une ceinture parallèle au rivage, protégée par les récifs coralliens. Ce type se rencontre principalement sur la côte nord et nord-ouest de Grande Terre (Tsoundzou, Majicavo ou Miangani)

(Capdeville, 2018; Jeanson, 2009). Les mangroves mahoraises occupent environ 20 % du linéaire côtier, avec des surfaces très variables de quelques mètres carrés jusqu'à 200 ha pour la mangrove la plus importante (Thongo, 2016). Celle-ci occupe le fond de la baie de Bouéni et s'étend sur près de 8 km de côte (**Figure 9**) : notre site d'étude en fait partie.

On trouve huit espèces de palétuviers à Mayotte (Jeanson et al., 2019), caractéristiques des mangroves de Madagascar et de l'Afrique de l'Est, appartenant à l'aire Indo-Pacifique-Ouest, la plus riche en termes de diversité de palétuviers. Ces espèces se répartissent selon une succession d'étages de végétation correspondant aux différents étages intertidaux.

La mangrove de notre site d'étude, située dans la baie de Bouéni au niveau du village de Malamani, est une mangrove de fond de baie à sol vaseux principalement constituée d'une succession de quatre espèces de palétuviers (Herteman, 2010), représentés sur la **Figure 10**.

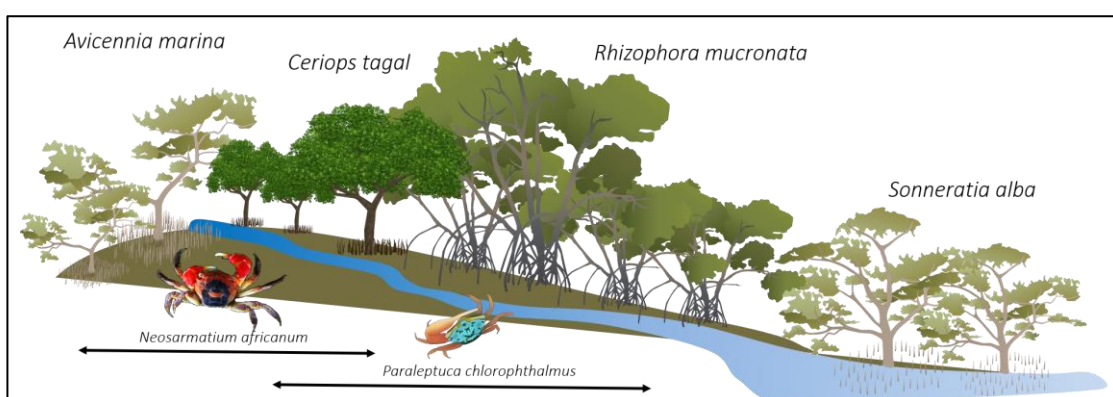


Figure 10. Schéma représentant la succession des quatre principales espèces de palétuviers de la mangrove de Malamani, d'amont vers l'aval, ainsi que les zones de distributions des deux espèces étudiées à Malamani (modifié d'après Theuerkauff, 2018, illustration de *P. chlorophthalmus* par Justine Courboulès).

C'est dans cette mangrove qu'en 2008 le projet d'assainissement *in situ* associant le SIEAM et le laboratoire EcoLab (Toulouse) a vu le jour (projet "Malamani"). Entre 2008 et 2018, les eaux usées domestiques d'un lotissement du village de Malamani (**Figure 11**) ont été collectées et stockées dans une unité de traitement primaire, le décanteur-digesteur. Ces eaux usées représentaient une charge journalière de 250 EqH sur la base de 45 g de DBO_{5,j}¹⁹ et 100 L.j⁻¹. Une fois prétraitées par digestion anaérobie par le décanteur-digesteur, les eaux usées passaient par un bassin tampon servant de bassin de stockage, avant d'être acheminées par un réseau aérien de tuyaux vers deux parcelles de mangrove de 675 m² (Capdeville, 2018; Herteman, 2010). Ces deux parcelles dites "impactées" sont dominées soit par des *Rhizophora mucronata*, soit par des *Ceriops tagal* (**Figure 11** : les parcelles

¹⁹ Demande Biologique/Biochimique en Oxygène pour 5 jours. La DBO est la quantité d'oxygène nécessaire aux micro-organismes présents dans un milieu pour oxyder (dégrader) les substances organiques contenues dans un échantillon d'eau maintenu à 20° C et dans l'obscurité, pendant 5 jours (www.services.eaufrance.fr).

impactées apparaissent en vert plus foncé, signe d'une plus forte productivité végétale avec l'augmentation des apports azotés. La parcelle foncée la plus au Nord correspond à la zone de trop-plein). L'eau usée était alors déversée par aspersion lente (tuyaux percés) pendant une heure avant la marée basse, une marée basse sur deux afin d'éviter un ennoisement trop important des terriers de crabes (Capdeville, 2018). Les deux parcelles recevaient donc 10 m³ d'eau usée prétraitées par 24 heures. Deux parcelles situées à 15 mètres de chaque parcelle impactée ont été délimitées et utilisées comme parcelles témoins, et en septembre 2015 les parcelles impactées ont été modifiées afin d'étudier la résilience de la mangrove (Capdeville et al., 2019) : elles ne sont pas représentées sur la figure ci-dessous.

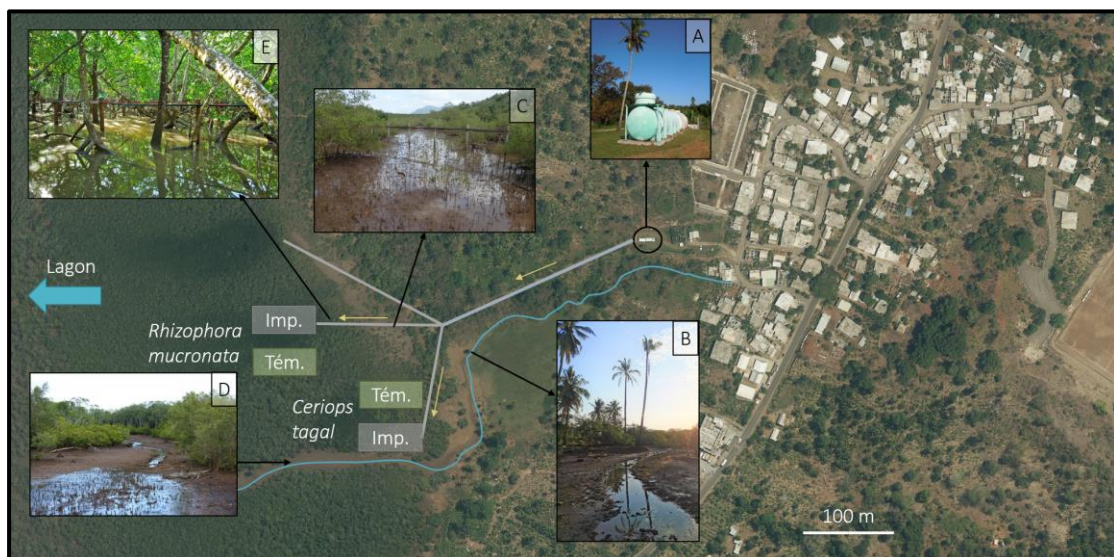


Figure 11. Représentation du dispositif expérimental de distribution des eaux usées domestiques prétraitées dans les faciès de mangrove *C. tagal* et *R. mucronata* mis en place par Ecolab (2008-2018). Les lignes grises représentent les tuyaux transportant l'eau usée vers la mangrove. Les rectangles gris représentent les parcelles impactées à partir de 2008 (Imp.), les verts représentent les parcelles témoins (Tém.). Les flèches jaunes représentent le sens d'écoulement depuis le village vers les parcelles. A : décanteur-digesteur permettant un premier traitement des eaux usées domestiques (crédit : J. Roques). B : Vue du cours d'eau de Malamani depuis l'arrière-mangrove. C : dispositif de rejet traversant le faciès à *C. tagal*. D : cours d'eau de Malamani vu depuis la mangrove à marée basse, le long duquel se trouve le site d'étude pour les chapitres 2 et 3 (crédit : JH. Lignot). E : dispositif de rejet traversant le faciès à *R. mucronata* (crédit : F. Fromard). Les parcelles correspondant à l'étude de la résilience (Capdeville et al., 2019) ne sont pas représentées. D'après Capdeville (2018), Herteman (2010) et Theuerkauff (2019).

Au sud de la mangrove de Malamani coule un cours d'eau permanent au débit faible, traversant le village. Ce petit exutoire génère un apport d'eau douce quasi continu (voir **Figure 11B, 11D**), et draine ainsi potentiellement des contaminants domestiques provenant du village comme les eaux de lessive, de vaisselle, ou issues du métabolisme humain et des eaux de ruissellement issues du lessivage des parkings, voies de circulation, toitures, terrasses, zones agricoles qui se chargent de résidus ou de contaminants. Ce cours

d'eau traverse les différents étages de la mangrove de Malamani sous une canopée ouverte sur environ 260 mètres avant d'être recouvert par les *Rhizophora mucronata*.

L'île d'Europa et le site d'étude

L'île Europa est une petite île tropicale (27 km²) de l'océan Indien, isolée dans la partie sud du Canal du Mozambique, à 300 km de Madagascar et 500 km du Mozambique (Boullet, 2014) (**Figure 8**), d'origine certainement volcanique et entourée d'une couronne corallienne quasiment circulaire. On trouve en son centre une vaste dépression soumise aux marées, quasiment vide à marée basse et constituée d'un lagon frangé de mangroves, et plus en arrière de sansouires et de steppes graminées inondées seulement lors des grandes marées (Boullet, 2014). Le climat de l'île est sec (type semi-aride) avec une pluviosité moyenne annuelle de 540 mm/an et une température moyenne annuelle de 21,4°C. On retrouve, comme à Mayotte, un régime d'alizés de sud-est mais avec une longue période de sécheresse de 7 mois où la pluviosité mensuelle est inférieure à 30 mm (Délépine et al., 1977). La saison des pluies s'étend de novembre à mai et consiste principalement en épisodes violents, orageux ou cycloniques. Europa est un territoire français depuis 1896 qui fait partie, avec d'autres îles coralliennes de l'ouest de l'océan indien (Juan de Nova, Bassas da India, Glorieuses, Tromelin), des Îles Éparses sous administration des Terres australes et antarctiques françaises. La colonisation humaine de l'île au cours du XIX^e et début du XX^e siècle a été limitée en raison des contraintes climatiques, maritimes et biologiques, et probablement à cause du manque d'eau douce. L'occupation plus stable de l'île est récente (1950-1970) et principalement liée aux activités météorologiques, militaires et scientifiques (Caceres, 2003).

L'île est également sous protection environnementale depuis 1975 mais n'a toujours pas obtenu le statut de réserve naturelle nationale, en réflexion depuis 2002. Depuis 2011, Europa est cependant un site Ramsar du fait de l'intérêt de ses zones humides. L'occupation humaine uniquement temporaire fait qu'Europa peut être considérée comme un **écosystème pristine**, connaissant peu de pressions anthropiques. Les écosystèmes de l'île peuvent être considérés comme "témoins" pouvant être étudiés comme points de comparaisons lorsque l'on s'intéresse à l'état de santé des écosystèmes et des organismes. A Europa, le système de mangroves lagunaires coralliennes occupe principalement les marges orientales et méridionales du grand lagon et s'étend sur 700 hectares, soit près de 25 % de la surface totale de l'île. On y retrouve quatre espèces de palétuviers, à large répartition indo-pacifique, se développant sur des matériaux coralliens en suivant une répartition typique des variations écologiques du domaine mangroviens : *Avicennia marina* en haut de mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*, *Ceriops tagal* puis *Rhizophora mucronata* en bordure de lagon (Boullet, 2008). Les mangroves basses, à caractère arbustif constituent l'essentiel des mangroves du lagon et sont difficilement pénétrables du fait des racines entrelacées et

de la densité des troncs (**Figure 12**) : ces mangroves forment les premières ceintures qui bordent les chenaux et les digitations du lagon central. Elles se développent sur des boues coralliennes à texture sablo-limoneuse à limono-argileuse issues du démantèlement du récif corallien, donnant cette couleur très claire aux sédiments. Nos deux sites d'étude se situent en bordure de lagon et le long de chenaux, dans des mangroves accessibles à pied et en kayak, à dominante de *Rhizophora mucronata* et *Ceriops tagal* à canopée ouverte ou semi-ouverte régulièrement inondées, comme pour le site d'étude de Malamani à Mayotte.



Figure 12. Illustrations des différents faciès de mangrove rencontrés lors de la mission d'avril 2019 (liste non exhaustive). Les typologies utilisées sont reprises de l'article de Vincent Boulet (2008) A : Tanne à *Avicennia marina* développé sur karst récifal plus ou moins nappé de boues coralliennes. B : Manteau mangrovién perhalin à *Avicennia marina*, en situation pionnière de fortes contraintes écologiques (sécheresse, très forte salinité). C : Mangrove pionnière de bas niveau topographique à *Rhizophora mucronata*, longuement inondée et développée en frange le long des chenaux de marée. D : mangrove à caractère arbustif en contact avec le massif dunaire située sur les bancs de sables plus élevés (*Bruguiera gymnorhiza*, *Ceriops tagal*). E : Mangrove éparses de jeunes *R. mucronata* le long des chenaux de marée. F : manteau mangrovién de niveau moyen à *Rhizophora mucronata* et *Ceriops tagal* : mangrove arbustive post-pionnière. Type de mangrove le plus répandu dans le lagon. G, H : *Ceriops tagal* et *Avicennia marina* épars en limite de lagon. I : vase corallienne en bordure de lagon constituant l'habitat de *G. tetragonon*, en bordure de mangrove (*R. mucronata*, *Ceriops tagal*). Clichés : JH. Lignot, L. Mégevand.

4. Ecophysiologie des espèces étudiées

Au cours de cette thèse, trois espèces de crabes de mangrove ont été étudiées. Le chapitre 1 se concentrera sur les réponses physiologiques de *Neosarmatium africanum*, un Sesarmidae, face à l'exposition aux eaux usées domestiques et à l'ammonium. Dans le chapitre 2, nous présenterons les résultats obtenus concernant les réponses physiologiques et comportementales à court terme (exposition à l'eau usée domestique et à l'ammonium) de *Paraleptuca chlorophthalmus*, un Ocypodidae présent à Malamani et dont les effectifs ont diminué dans les parcelles impactées (Capdeville et al., 2018). Dans le chapitre 3, seront présentés les résultats concernant l'étude de la vulnérabilité potentielle de deux espèces connaissant des niveaux opposés de pressions anthropiques : *Gelasimus tetragonon* sur l'île « pristine » Europa et, *Paraleptuca chlorophthalmus* sur l'île de Mayotte (animaux issus site de Malamani). La **figure 13** ci-dessous présente les trois espèces ainsi que le type d'habitat dans lequel elles sont rencontrées.

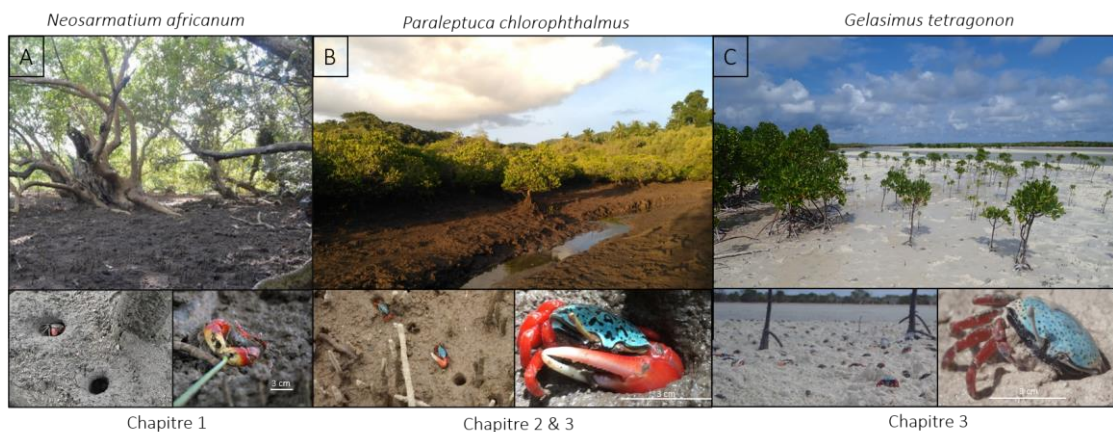


Figure 13. Habitats, terriers et portraits des trois espèces de crabes étudiées. A : *Neosarmatium africanum* occupe les étages hauts de la mangrove, dans les faciès à *Avicennia marina* et *Ceriops tagal* de la mangrove de Malamani. B : *Paraleptuca chlorophthalmus* est une espèce occupant souvent les bordures de cours d'eau, comme c'est le cas à Malamani entre les faciès à canopée ouverte de *Ceriops tagal* et *Rhizophora mucronata*. C : *Gelasimus tetragonon* occupe les bordures des chenaux de marée dans la mangrove d'Europa, dans les faciès à *C. tagal* et *R. Mucronata* sous canopée ouverte.

***Neosarmatium africanum* (Figure 13.A)** appartient à la famille des Sesarmidae, dont 7 espèces sont présentes à Malamani. Il est à noter que l'espèce étudiée dans la thèse de Dimitri Theuerkauff est indiquée comme étant *Neosarmatium meinerti*, mais le séquençage des échantillons des individus étudiés réalisé à la fin de sa thèse a confirmé qu'ils appartenaient bien à *Neosarmatium africanum* (Theuerkauff et Ragioneri, pers.comm.). C'est une espèce de crabe terrestre semi-aquatique qui occupe la frange en haut de mangrove, inondée seulement lors des marées hautes, dans les faciès fréquemment dominés par *Avicennia marina* et *Ceriops tagal* (Hartnoll, 1975; Macnae, 1969), comme c'est le cas dans notre site d'étude de Malamani. Les Sesarmidae y sont largement dominants dans le faciès

à *C. tagal*, avec une moyenne de $60,2 \pm 4,2$ % dans les zones non impactées étudiées par Capdeville (2018). Les densités de *N. africanum* peuvent atteindre vingt individus par m². D'après Ragionieri et al. (2012), son aire de répartition s'étend de la moitié Sud de la Somalie jusqu'à Natal (Afrique du Sud), en passant par la côte Nord-Ouest de Madagascar et Mayotte (**Figure 14**). Il est probable que l'espèce soit présente plus au Sud de Madagascar mais les données sont pour l'instant manquantes.



Figure 14. Aire théorique de répartition (en rouge) de *Neosarmatium africanum*, espèce étudiée dans le chapitre 1. L'espèce est potentiellement présente sur les côtes plus au Sud de Madagascar. D'après (Ragionieri et al., 2012).

Paraleptuca chlorophthalmus, appartient, lui, à la famille des Ocypodidae et fait partie des crabes violonistes (**Figure 13.B**), ayant une aire de répartition limitée à la province d'Afrique de l'Est du domaine du pacifique indo-occidental, dont il est considéré comme endémique, selon la typologie proposée par Rosenberg (2020) (**Figure 15.A**). Cette espèce occupe généralement les bancs vaseux près des niveaux de marée haute, ou les zones basses à proximité des estuaires, souvent à proximité de cours d'eau (Crane, 1975). C'est le cas à Malamani ou dans les autres mangroves de Mayotte : on la retrouve systématiquement sur les berges des cours d'eau, sous des canopées relativement ouvertes, avec d'autres espèces de crabes violonistes telles que *Tabuca urvillei*. Les représentants de l'espèce *P. chlorophthalmus* ont été décrits comme « léthargiques » par Crane (1975), et ce trait a été confirmé par Weis and Weis (2004), indiquant qu'ils passaient la majorité de leurs temps à se nourrir, tandis que d'autres espèces de violonistes occupent plus de temps à l'exploration

de l'habitat, la construction ou l'entretien des terriers, ou encore la défense du territoire et la recherche de partenaires en plus de se nourrir.

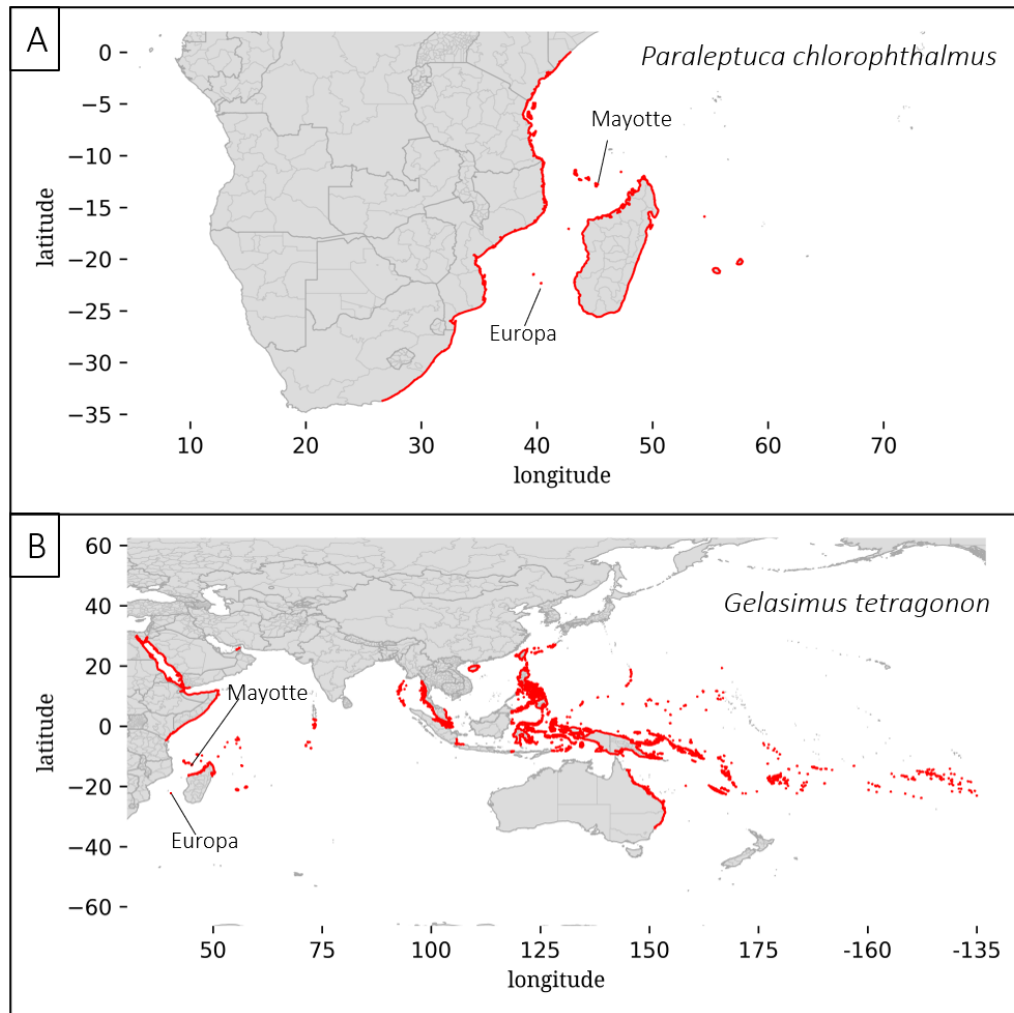


Figure 15. Aires de répartition des deux espèces de crabes violonistes étudiées dans les chapitres 2 et 3. A : *P. chlorophthalmus*, principalement distribué sur les côtes d'Afrique de l'Est. B : *G. tetragonon*, possédant une aire de répartition très étendue. Cartographie générée d'après site www.fiddlercrab.info (Rosenberg, 2020, 2014).

Gelasimus tetragonon, étudié dans le troisième chapitre (**Figure 13.C**), fait également partie des crabes violonistes. Cette espèce occupe plutôt les parties aval de mangrove, à proximité de la mer. A Europa, on la retrouve le long des chenaux de marée, où des centaines de terriers et de crabes sont observables sur les bancs de sable vaseux corallien, dans des faciès à canopée ouverte. *G. tetragonon* est considéré comme une espèce très intéressante car c'est le crabe violoniste possédant la plus grande amplitude longitudinale en termes de répartition (quasiment 193°, occupant les sous-régions de l'océan Indien et du Pacifique occidental) (**Figure 15.B**). Parmi les espèces de crabes violonistes possédant des aires de répartition exceptionnellement grandes (« long-ranging species »), plusieurs ont finalement été fractionnées en espèces distinctes au fil des révisions taxonomiques. Seule

L'espèce *G. tetragonon* reste inchangée sur l'ensemble de l'aire de répartition, où les analyses révèlent peu de divergence entre des lieux géographiques pourtant éloignés (Madagascar, Taïwan, Polynésie française) (Rosenberg, 2020; Shih et al., 2016). Cette espèce est considérée comme insulaire, et les raisons de sa cohésion génétique (contrairement aux autres espèces vivant sur les mêmes îles) au vu d'une aire de répartition aussi grande demeurent encore inconnues. Comme le flux génétique chez les crabes violonistes est essentiellement mené par la dispersion larvaire, Rosenberg (2020) évoque un aspect inhabituel du cycle biologique (développement larvaire inhabituellement long ?), du comportement (déplacement vertical dans des zones plus profondes, à plus forts courants ?), ou de la morphologie pour en expliquer la cause. Cependant, l'hypothèse d'un artefact n'est pas exclue et des analyses génétiques plus larges sont encore nécessaires dans l'hypothèse de révéler des espèces cryptiques avec une plus grande divergence génétique que celle actuellement rapportée.

Ces trois espèces font partie des crabes de mangrove creusant des terriers pouvant être considérés comme des ingénieurs de l'écosystème bien que leurs rôles soient différents : les Sesamidae comme *N. africanum*, en consommant les propagules et les feuilles des palétuviers, recyclent la matière organique et régulent la régénération des palétuviers tandis que les Ocypodidae comme *P. chlorophthalmus* et *G. tetragonon*, régulent les populations de microorganismes en consommant le biofilm. Leur activité bioturbatrice est également différenciée du fait de la taille et de la complexité des terriers qui varient entre les espèces (Theuerkauff, 2019 et **Figure 4**). Les crabes bioturbateurs vont répartir leur temps entre l'alimentation, la reproduction et l'entretien du terrier (Nordhaus et al., 2009) et utiliser leurs terriers lorsqu'ils sont menacés ou lors des phases de reproduction (Berti et al., 2008; Cannicci et al., 1999; Crane, 1975; Hemmi, 2005). Il est important de noter qu'il existe une grande variété de comportements liés aux terriers et à la territorialité des crabes de mangroves qui sont très souvent espèce-spécifiques (Nobbs and Blamires, 2017).

Après avoir présenté les espèces étudiées et leurs aires de répartition, nous abordons dans la partie suivante des éléments de physiologie concernant les trois espèces étudiées, qui sont importants pour la bonne compréhension des problématiques et enjeux de la thèse.

4.1 Le métabolisme énergétique

L'ensemble des processus biochimiques et physiologiques impliqués dans le cycle vital des organismes dépend étroitement du métabolisme énergétique (Dedourge et al., 2008). Chez les organismes hétérotrophes, l'obtention de l'énergie est conditionnée par la prise de nourriture et la dégradation de celle-ci afin de libérer l'énergie qu'elle contient (assimilation). Une fois la nourriture ingérée, les aliments sont soumis notamment à l'action d'enzymes, par le processus de digestion représentant l'ensemble des processus par lesquels les aliments bruts (glucides, protéines, lipides) sont transformés en de plus petites

molécules assimilables, les nutriments (Dedourge et al., 2008). Ces molécules sont ingérées ou synthétisées et certaines peuvent être oxydées afin de produire l'adénosine triphosphate (ATP). Les réserves de lipides, glucides et protéines jouent un rôle important dans le maintien de la balance énergétique, en particulier lors des périodes de réduction d'ATP ou lors d'augmentations de la demande en ATP (Jimenez and Kinsey, 2015). Chez les crustacés, le glucose est stocké sous forme de glycogène et la majorité des réserves se trouve dans l'hépatopancreas et les muscles (Buckup et al., 2008; Oliveira et al., 2003; Vinagre and Silva, 1992). Lorsque le taux de glucose dans l'hémolymphe est faible, le glycogène stocké dans les tissus est dégradé en glucose et mobilisé dans l'hémolymphe. A l'inverse, lorsque les niveaux de glucose sont élevés, la synthèse du glycogène s'effectue via la néoglucogénèse (Santos and Keller, 1993). Les glucides sont généralement absorbés par les cellules après avoir été préalablement digérés en oses¹⁰.

Brièvement, en condition aérobie, le glucose est totalement oxydé en CO₂ via la glycolyse et le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs), et l'ATP est produit par phosphorylation oxydative à travers la chaîne respiratoire (Jimenez and Kinsey, 2015) (**Figure 16**). Les mitochondries jouent un rôle clé dans ces processus : ce sont des organiques considérés comme le moteur de la cellule, car ils permettent la production d'énergie chimique sous forme d'ATP (Osellame et al., 2012; Pigneret, 2018). Lors du cycle de Krebs, une succession de dix réactions enzymatiques permet la formation de CO₂ et d'H₂O₂, de GTP (isoforme de l'ATP) et d'intermédiaires énergétiques (comme le NADH et le FADH₂) qui seront par la suite utilisés par la chaîne respiratoire (Pigneret, 2018) (**Figure 16**). Certaines de ces réactions, catalysées par des enzymes spécifiques (**citrate synthase**, isocitrate déshydrogénase et alpha-cétoglutarate déshydrogénase), sont irréversibles et constituent les points de contrôle des flux globaux du cycle de Krebs. Au cours de cette thèse, l'activité enzymatique de la citrate synthase sera mesurée dans les branchies et les muscles de *P. chlorophthalmus*. Cette enzyme intervient à la première étape du cycle de Krebs, où elle catalyse une réaction irréversible qui engage la voie métabolique : la condensation du résidu acétyle de l'acétyl-CoA sur l'oxaloacétate pour former du citrate en libérant la coenzyme A (Wiegand and Remington, 1986). Elle est couramment utilisée comme un biomarqueur d'efficacité mitochondriale, témoin du **métabolisme aérobie**.

¹⁰ Ose, ou monosaccharide est un monomère de glucide.

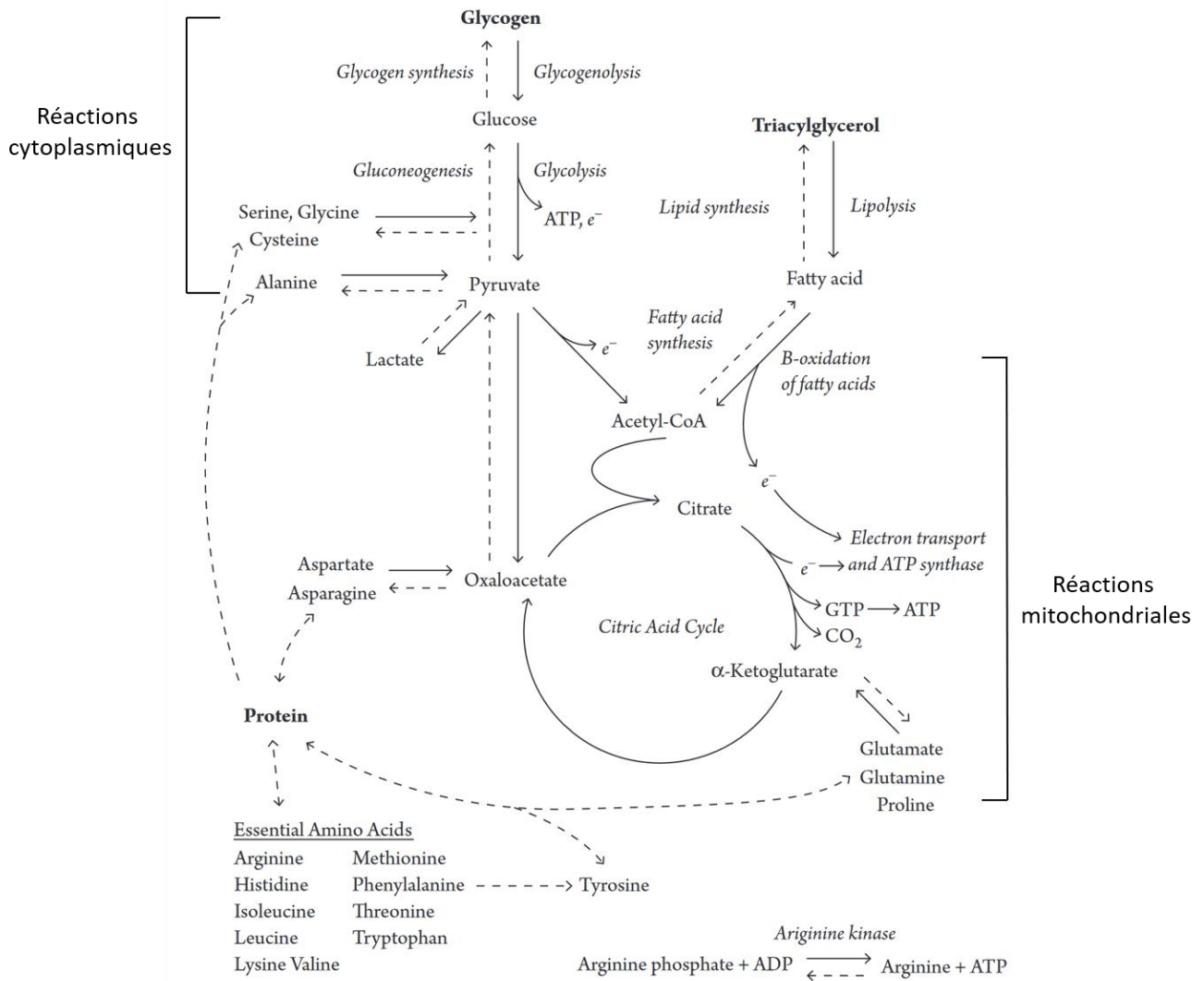


Figure 16. Aperçu du métabolisme énergétique chez les crustacés. Les formes de stockage des principales molécules énergétiques sont en gras, les voies métaboliques associées sont en italique et les principaux métabolites sont également représentés. Les voies associées à la production d'ATP sont désignées par des lignes pleines. Ces voies comprennent la glycolyse et l'oxydation des acides gras qui oxydent toutes deux partiellement les substrats carbonés et introduisent l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs, où les groupements acétyles sont entièrement oxydés en CO₂. Ces voies permettent la production directe d'ATP ainsi que d'électrons (e⁻) qui sont transportés vers le système de transport d'électrons par le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) et le FADH₂ (flavine adénine dinucléotide). Le transport d'électrons dans la mitochondrie conduit à une force motrice protonique, qui est utilisée pour produire de l'ATP à travers l'ATP-synthase. Les lignes en pointillé indiquent les voies de biosynthèse, ainsi que d'autres voies pouvant interconvertir les molécules chez les crustacés. Les acides aminés sont oxydés pour produire de l'ATP en étant convertis en un intermédiaire de la glycolyse ou du cycle de Krebs. En plus de ces voies, la réaction de l'arginine kinase peut fournir de l'ATP en transférant un phosphate de l'arginine phosphate à l'ADP. D'après Jimenez and Kinsey (2015)

Lors de certains changements environnementaux [milieux devenant pauvres en oxygène par exemple (Hervant et al., 1996, 1995)] ou d'un dysfonctionnement du métabolisme aérobie lié à un stress chimique (Lauer et al., 2012), la production d'énergie (ATP) par les voies aérobies peut fortement diminuer, voire s'arrêter. Dans certains cas, les organismes aérobies peuvent utiliser totalement ou partiellement les voies anaérobies pour compenser ce déficit de production d'énergie, et ainsi maintenir l'homéostasie des processus physiologiques (Pigneret, 2018). La glycolyse anaérobie (ou fermentation lactique) permet de produire 2 ATP et 2 molécules de pyruvate qui pourront ensuite être transformées en lactate via le **lactate déshydrogénase**. En conditions anaérobies, le lactate représente l'unique produit terminal métabolique de la glycolyse anaérobie, tout comme chez les vertébrés. L'activité de cette enzyme sera également mesurée dans les branchies et le muscle de *P. chlorophthalmus*, comme marqueur potentiel de passage à un **métabolisme anaérobie**. Le lactate peut aussi s'accumuler lorsque la demande en ATP dépasse les réserves disponibles du métabolisme oxydatif parce qu'un effort intense entraîne une hausse des besoins (Jimenez and Kinsey, 2015).

4.2 Stress oxydatif et défenses antioxydantes

L'oxygène peut se révéler toxique lors de sa transformation en espèces radicalaires très réactives : les **espèces réactives de l'oxygène (EROs, ROS** pour 'Reactive Oxygen Species' en Anglais). Ces composés sont formés par voie endogène en petite quantité (2 à 5 %) au cours de la respiration cellulaire qui met en jeu un transfert d'électrons, et peuvent également être générés à la suite d'un stress oxydant ou au cours de toute réaction mettant en jeu un transfert d'électrons (Cossu-Leguille, 1996; Dawson et al., 1993). Les ERO's portent un nombre impair d'électrons sur leur couche périphérique (Sies, 1997; Zorov et al., 2014). Cette présence d'électrons de valence non appariés confère à ces molécules une grande réactivité et ainsi le potentiel d'oxyder ou de réduire d'autres espèces chimiques afin de stabiliser leur orbite externe (Theuerkauff, 2019). Tous les organismes vivants les produisent via le métabolisme aérobie à différents niveaux, principalement les mitochondries et le réticulum endoplasmique contenant les cytochromes P-450 (Lesser, 2006).

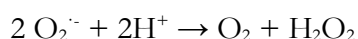
Les trois principaux mécanismes d'action antioxydante développés par les organismes vivants aérobies consistent à (1) éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, (2) induire les systèmes antioxydants, et (3) augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées (Cossu-Leguille, 1996).

En condition normale, les EROs produites sont détoxifiées en H₂O par des systèmes de défenses (molécules et enzymes antioxydantes, notamment) qui permettent d'atteindre un équilibre appelé la balance oxydative. Ces systèmes de défense sont constitués par des enzymes antioxydantes dont principalement la **superoxyde dismutase (SOD)**, la

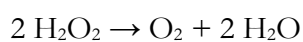
catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et des molécules antioxydantes telles que le glutathion (GSH forme réduite, GSSG forme oxydée) et les vitamines C et E (Theuerkauff, 2019) (**Figure 17**).

Au cours de cette thèse, nous avons plus spécifiquement étudié les activités enzymatiques de la SOD, la CAT et de la **GST (glutathion S-transférase)** :

— Les SOD sont des métalloprotéines (elles contiennent un atome métallique : cuivre, zinc, manganèse, fer et/ou nickel dans leur site actif) ayant une activité enzymatique catalysant la dismutation des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction suivante :



— La CAT est une enzyme homotétramère constituée de quatre sous-unités protéiques comportant chacune un groupement héminique avec une molécule de Fe^{3+} liée au site actif. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et dioxygène selon la réaction suivante :



— Les GST forment un groupe d'isoenzymes qui interviennent dans la biotransformation des xénobiotiques en conjuguant le glutathion réduit (GSH) permettant d'éliminer le composé. Elles catalysent des réactions de conjugaison pour former un thio-ester entre un glutathion tripeptide endogène et un xénobiotique (Jancova et al., 2010).

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) a été défini par Sies (1997) comme « un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, et source d'effets toxiques potentiels », comme par exemple lors de l'exposition à certains contaminants. Ainsi, la production d'EROs est connue pour augmenter lorsque les organismes subissent un stress environnemental ou lié à des apports de contaminants. Une forte concentration d'EROs induit un stress oxydatif causant des dommages à des molécules comme les protéines, l'ADN ou les lipides. (Foucreau, 2015; Monaghan et al., 2009). Les CAT, SOD et GST vont intervenir dans les processus anti-oxydants en contribuant à l'élimination des radicaux libres. Leur dosage est donc utilisé afin de détecter si les organismes sont exposés à des contaminants chimiques, ou identifier quels sont les effets de ces contaminants sur les défenses antioxydantes des organismes. Chez les invertébrés aquatiques, le lieu privilégié de la métabolisation des xénobiotiques est l'hépatopancréas, alors que chez les vertébrés, ces réactions se déroulent principalement dans le foie (Poisson et al., 2011).

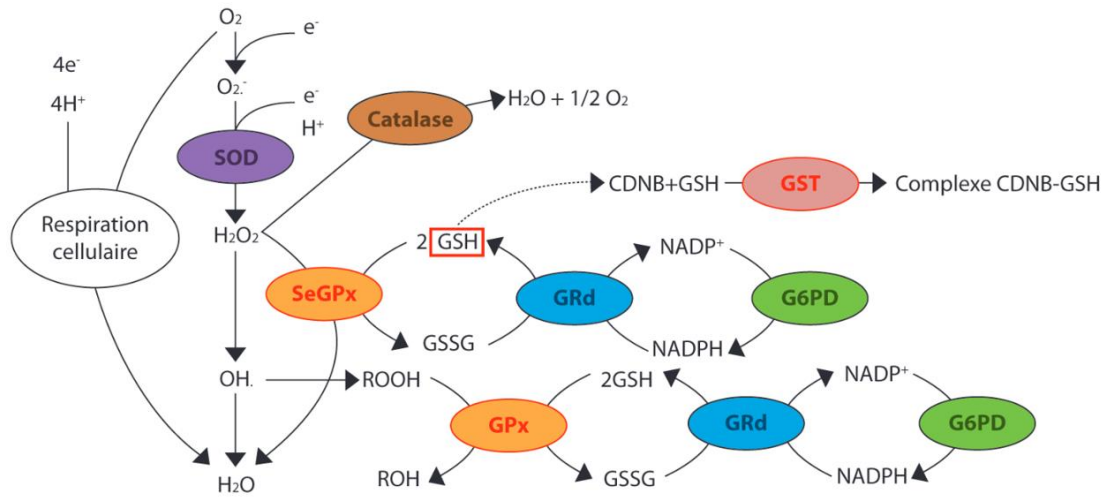


Figure 17. Action des enzymes anti-oxydantes dans la lutte contre les espèces radicalaires. Le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) est un radical organique issu ou précurseur de l'activité des ERO's (Espèces Réactives de l'Oxygène). ROOH : peroxyde organique, ROH : un alcool, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé (disulfure de glutathion), e⁻ : électron, H⁺ : proton, H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène, OH[•] : radical hydroxyl (radical libre le plus réactif), O₂^{•-} : radical superoxyde, GST : glutathion S-transférase, SOD : superoxyde dismutase, GPx : Glutathion peroxydase, SeGPx : Glutathion peroxydase sélénium dépendante, GRd : Glutathion réductase, G6PD : glutathion-6-phosphate déshydrogénase (D'après Cossu-Leguille, (1996) modifié par Poisson et al., (2011) (GIP Seine-aval).

4.3 Physiologie respiratoire

Les habitats intertidaux des crabes étudiés ont conduit ces animaux à développer des adaptations pour vivre en milieu à la fois terrestre et aquatique, les terriers étant inondés jusqu'à deux fois par jour au gré du balancement des marées et de leur amplitude. Ce sont des organismes aérobies qui ont donc besoin d'un accès à l'oxygène et doivent le transporter du milieu extérieur vers les cellules, tout en évacuant le dioxyde de carbone produit. Ces flux interviennent toujours en sens opposé par diffusion des gaz selon leurs gradients de pression partielle successifs chez les organismes des plus simples (unicellulaires) aux plus complexes (pluricellulaires). Ces derniers peuvent, par exemple, utiliser un système circulatoire et des pigments respiratoires qui fixent l'O₂ au niveau d'organes spécialisés dans les échanges gazeux : les branchies et/ou les poumons (Theuerkauff, 2019). L'efficacité de ces échanges dépend de plusieurs facteurs tels que la nature et l'épaisseur de l'épithélium, le débit d'eau (et/ou d'air) ventilé, les pressions partielles de part et d'autre de l'épithélium, le débit du système circulatoire et la capacitance du liquide interne (hémolymphe dans notre cas). Il a été démontré depuis de nombreuses années qu'il existe chez les animaux aquatiques, marins ou d'eau douce, crustacés, poissons ou mollusques, une stratégie adaptative visant à maintenir les pressions partielles d'O₂ dans le sang artériel à des valeurs de 1 à 3 kPa dans des conditions hypoxiques, normoxiques, voire hyperoxiques.

Afin de maintenir cette pression partielle en O₂ dans leurs fluides en cas de diminution de la concentration externe, ou en cas d'augmentation de la consommation des cellules (pouvant être due à un stress par exemple), les animaux peuvent augmenter la ventilation de leurs organes respiratoires. Des chémorécepteurs sensibles à l'oxygène ont ainsi été mis en évidence, y compris chez les crustacés. Ainsi, la tolérance de certains organismes à des stress peut être évaluée à l'échelle de l'organisme en mesurant des marqueurs énergétiques (Collier et al., 2017): une partie des marqueurs développés dans cette thèse en fera partie.

Nous allons d'abord nous focaliser sur les **branchies**, qui sont les principaux organes respiratoires des crabes intertidaux et qui ont développé des adaptations morphologiques et fonctionnelles particulières afin de permettre la survie en milieu intertidal. Chez les crustacés, les différents types de branchies (leur permettant, au départ, de respirer dans l'eau) sont classés selon leur degré d'amplification de surface et leur structure (Charmantier et al., 2009; Freire et al., 2008). Chez les crabes de mangroves et les crustacés brachyours en général, on parle de phyllobranchies : lamelles plates, larges comme des feuilles et disposées en deux rangées, dont le nombre peut varier en fonction de l'espèce et du mode de vie. En fonction de leur positionnement, on trouvera les podobranchies (attachées aux coxopodites), les arthrobranchies (attachées à la membrane articulaire qui relie les appendices au thorax) et les pleurobranchies (attachées au pleurite, la paroi latérale du thorax).

Les caractéristiques particulières du milieu intertidal de mangrove, où les crabes vivent alternativement dans l'air ou dans l'eau et connaissent des épisodes anoxiques et des variations de température importantes, ont conduit la plupart des espèces à évoluer vers une **respiration bimodale** ayant nécessité, notamment, des adaptations morpho et physiologiques.

Les animaux possédant une respiration bimodale ont la capacité de réaliser des échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone à la fois dans l'air et dans l'eau. La respiration aérienne chez les organismes aquatiques semble provenir d'une évolution liée à des facteurs abiotiques de certains habitats aquatiques contraignants : conditions hypoxiques, forte concentration de dioxyde de carbone ou d'ammonium, températures élevées, mais aussi à des facteurs biotiques : compétition, prédation pouvant avoir amené les animaux à exploiter le milieu aérien (Fusi et al., 2016; Sayer and Davenport, 1991). Ces stratégies évolutives qui semblent donc fortement liées aux conditions des milieux de vie, se sont développées de manière indépendante entre les espèces : tous les organismes à respiration bimodale ne descendent pas du même ancêtre commun. Certains respirent toujours avec des branchies, d'autres disposent de **poumons** développés et vascularisés. Certains vivent les premiers stades de développement dans l'eau avant de vivre exclusivement dans l'air, tandis que d'autres passent leur vie entière en circulant dans les deux milieux (Maina, 1998; Morris, 2002). Une grande variété d'invertébrés aquatiques possède une respiration

bimodale avec différents types d'adaptations qui sont souvent considérés comme un tremplin dans la transition évolutive du milieu aquatique vers le milieu terrestre (Dejours, 1994; Fusi et al., 2016; Minelli and Fusco, 2013).

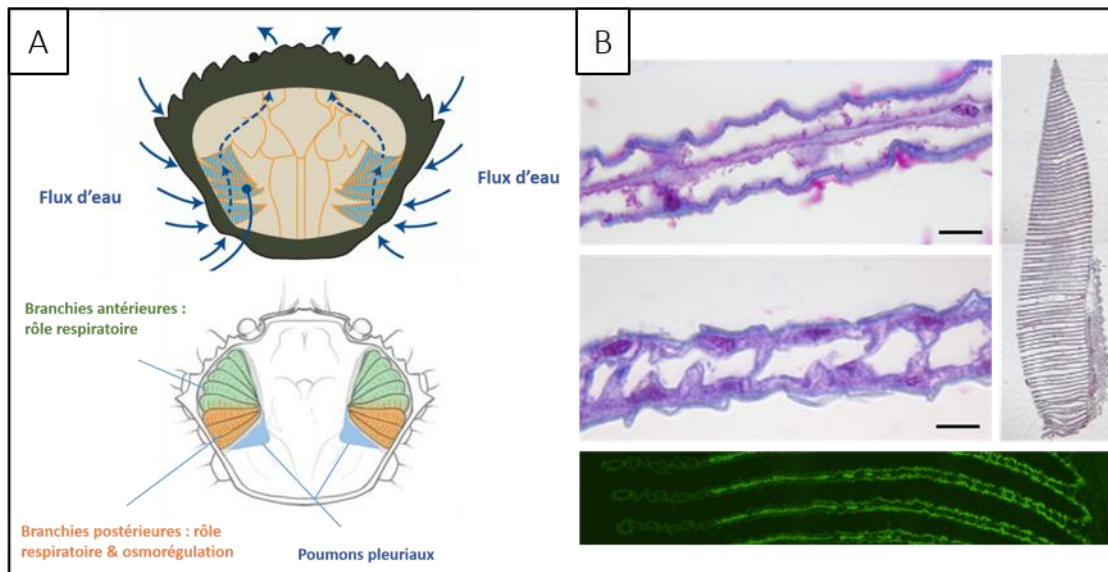


Figure 18. A : Flux d'eau entrant dans les cavités branchiales des crabes. L'eau passe entre les pattes locomotrices et pénètrent dans la cavité branchiale. Le mouvement d'eau est lié à la dépression occasionnée par le mouvement de pièces spécialisées (scaphognathites) en avant de la cavité branchiale faisant ainsi sortir l'eau vers l'avant de l'animal. Dans la cavité branchiale, les branchies antérieures et postérieures et les poumons pleuraux sont représentés sur le deuxième schémas de crabe en vue dorsale. Au niveau des lamelles branchiales, l'épithélium délimitant la lacune hémolympatique peut être fin (rôle respiratoire) ou plus épais (rôle dans l'osmorégulation). Cette différenciation fonctionnelle antéro-postérieure est également visible au sein même des branchies postérieures puisque les lamelles peuvent posséder un épithélium épais proche du raphé et plus fins en périphérie (visible avec le marquage de l'ATPase Na^+/K^+ le long de l'épithélium des lamelles branchiales (B).

Chez les crustacés, ce sont les branchies et les **branchiostégites**¹¹ (Figure 18 et 21) qui assurent majoritairement les échanges gazeux, bien que l'on trouve parfois d'autres organes respiratoires non branchiaux (développement de poumons par exemple) (Figures 18, 19 et 20). Il existe généralement une séparation entre l'absorption d'oxygène et l'excrétion du dioxyde de carbone, au niveau du milieu (air ou eau) et de la surface respiratoire à travers laquelle ces gaz sont échangés. L'oxygène sera préférentiellement absorbé dans l'air à partir du branchiostégite, et le CO_2 sera excrété dans l'eau à travers les branchies (Henry, 1994). Ces mécanismes impliquent donc une dépendance, au moins partielle, au milieu aquatique pour les échanges gazeux, même chez les crustacés semblant montrer un haut degré de terrestrialisation (Henry, 1994). Ainsi, lors de leurs explorations aériennes, les crustacés à respiration bimodale conservent de l'eau dans leur cavité branchiale, qui recouvre les

¹¹ Chez les crustacés, désigne la partie latérale de la carapace thoracique qui délimite la paroi extérieure de la cavité branchiale, et qui abrite et protège les branchies

branchies en permettant aux échanges gazeux de se réaliser. Le cas des crustacés vivant en milieu intertidal, comme nos trois espèces de crabes étudiées dans cette thèse, est intéressant. En effet, il existe une distinction entre la respiration dans l'air dite facultative et la "vraie" respiration bimodale.

Certains crustacés purement aquatiques peuvent se trouver amenés à respirer dans l'air de manière ponctuelle suite à des contraintes environnementales telles que des conditions hypoxiques ou une hausse importante de la température (Henry, 1994; Taylor et al., 1973). Cette respiration facultative dans l'air permet aux crustacés aquatiques de survivre à de relativement courtes périodes d'exposition à l'air, mais il n'existe pas forcément de preuve de leur adaptation terrestre leur conférant la possibilité de coloniser ce milieu. Il s'agit plutôt d'un état physiologique de stress temporaire provoqué par des conditions extrêmes (Henry, 1994). On a souvent constaté lors d'expositions à l'air à court ou long terme chez des animaux aquatiques, un effondrement des lamelles branchiales qui se collent entre elles, une diminution de la tensions artérielle d'O₂, une augmentation de la tension en CO₂ ainsi que l'acidification de l'hémolymphe, et dans certains cas, on trouve également une augmentation des taux d'acide lactique (Burger, 2006; DeFur et al., 1988; deFur and McMahon, 1984; Depledge, 1984; Hawkins and Jones, 1982; Innes and Taylor, 1986; Taylor and Butler, 1978; Taylor and Wheatly, 1981).

Les crabes possédant une "vraie" respiration bimodale développent des adaptations tant morphologiques que physiologiques leur permettant plus qu'une tolérance à court terme au milieu aérien. Brièvement, ces modifications morphologiques se regroupent en trois catégories :

- 1) La réduction de la surface branchiale (compromis physiologique entre les échanges gazeux et la régulation des ions permettant de limiter la perte d'eau et l'effondrement des lamelles),
- 2) L'augmentation du volume de la cavité branchiale et de la surface des branchiostégites,
- 3) La diminution de la distance de diffusion du tissu branchiostégal par rapport à celle de la branchie (Henry, 1994; Takeda et al., 1996; Taylor and Taylor, 1992).

La présence d'organes respiratoires de type poumon est également une potentielle modification induite importante, pouvant prendre différentes formes et différents niveaux de complexité entre les espèces (Maina, 1998; Taylor and Taylor, 1992) (**Figures 18, 19 et 20**). Cette structure permet d'améliorer les échanges gazeux en milieu aérien et de compenser la diminution des zones respiratoires des branchies, impliquant une plasticité physiologique pour permettre la régulation des ions par les branchies. Les crabes devront ainsi adapter cette régulation avec des durées d'immersion et d'émersion variables (Farrelly and Greenaway, 2005, 1994; Innes and Taylor, 1986; Santos et al., 1987).



Figure 19. Localisation du poumon de type pleural sur différentes espèces de crabes de Mayotte impliqué dans la respiration aérienne de ces crabes intertidaux. Ce poumon pleural (flèche) se situe dans la cavité branchiale, en arrière des branchies et est connecté au pleurite en position postérieure.

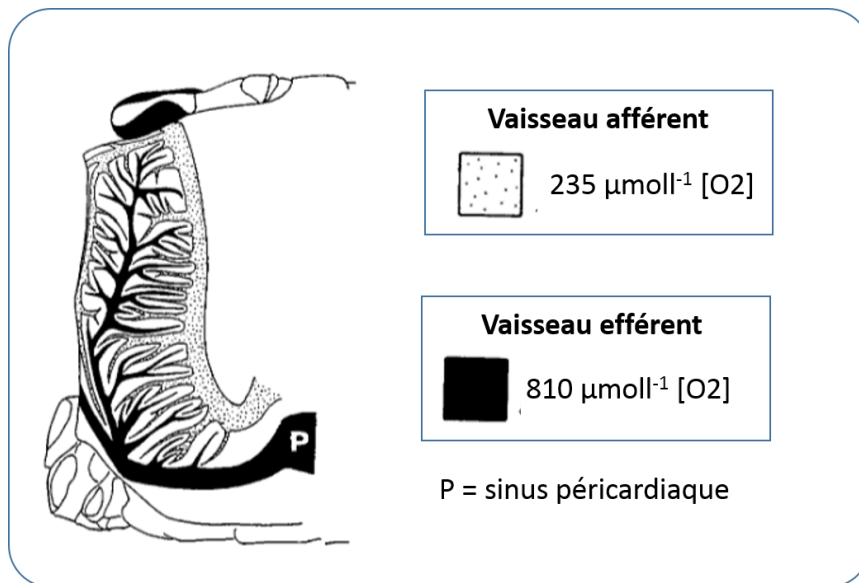


Figure 20. Schématisation d'un poumon branchiostégial (illustré sur la partie anatomique gauche d'un crabe de type Ocypodidae) présentant la vascularisation du système de circulation de l'hémolymphe afférent au sein du branchiostégite. A noter, la différence de pression partielle d'oxygène entre les deux types de circulation. Le sinus péricardique (P) indique la position médiane et dorsale du cœur. D'après Farrelly et Greenaway, 1994; adapté de von Raben, 1934.

Les crabes violonistes (Ocypodidae), dont font partie deux de nos espèces étudiées, sont généralement considérés comme possédant une respiration bimodale issue de l'utilisation des surfaces épibranchiales humides comme "poumons", bien adaptée à leur position moyenne à basse dans la mangrove, puisqu'ils connaissent de relativement longues

périodes d’immersion (Eshky et al., 1996; Fusi et al., 2015; Jimenez and Bennett, 2005; Vianna et al., 2020). Fusi et al. (2015) ont démontré qu’une espèce, *Tubuca urvillei*, partageant le même habitat que *P. chlorophthalmus* sur notre site d’étude de Mayotte, ne possédait plus la capacité de respirer dans l’eau. En effet, les échanges gazeux aériens chez cette espèce seraient devenus plus efficaces que dans l’eau, avec la cavité branchiale jouant, dans l’air, le rôle de vrai poumon (Farrelly and Greenaway, 1992). Cette espèce occupe tout de même le milieu intertidal de par sa capacité à piéger une bulle d’air dans son terrier à marée haute afin de l’utiliser comme réserve d’air (Fusi et al., 2015). Cette capacité a été démontrée chez plusieurs espèces de crabes du milieu intertidal (de la Iglesia et al., 1994; Teal, 1959). *N. africanum*, qui occupe la partie plus haute de la mangrove, moins souvent immergée, est aussi considéré comme une espèce à respiration bimodale (Fusi et al., 2017; Theuerkauff et al., 2018b).

Les évolutions respiratoires ne sont pas les seules entrant en jeu dans l’adaptation de ces animaux aux milieux intertidaux : l’osmorégulation et les modes d’excrétion sont également des éléments très importants dans les stratégies de (sur)vie des espèces étudiées, qui s’appuient elles aussi partiellement ou totalement sur l’organe branchial multifonctionnel.

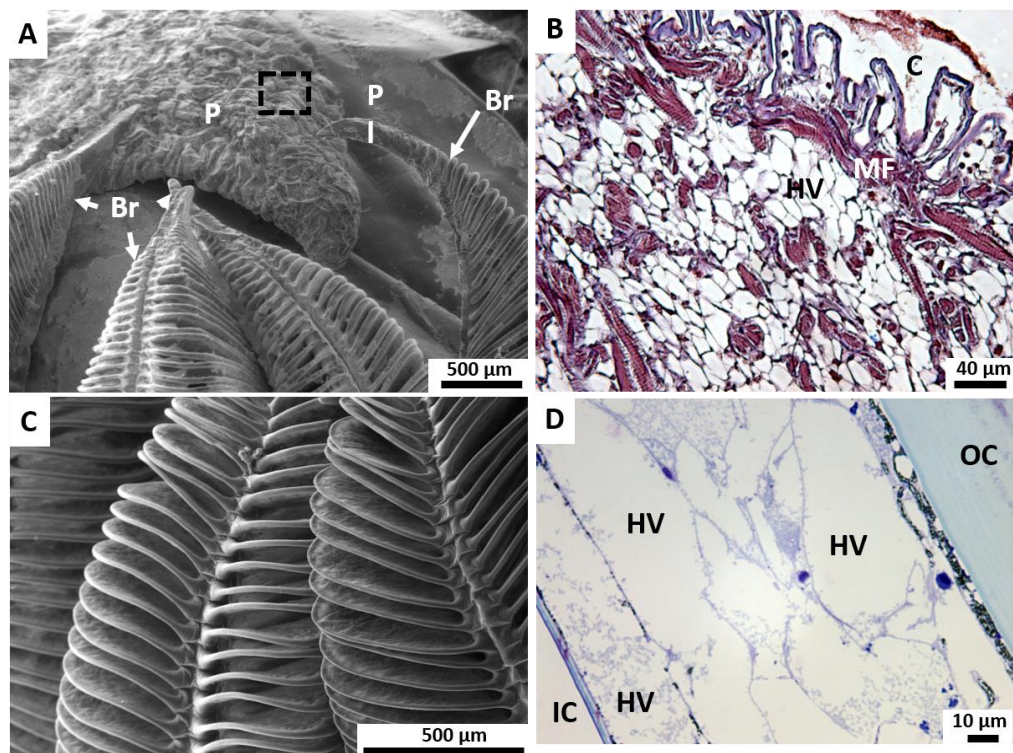


Figure 21. A : Vue d’un poumon pleural et de branchies d’un crabe *P. guttatum* (MEB). L’encart est détaillé en B ; B : Coupe histologique d’un poumon pleural de *P. guttatum* colorée au trichrome de Masson ; C : détail de lamelles branchiales d’une branchie antérieure (à droite) et postérieure (à gauche) de *Gelasimus tetragonon* (MEB) ; D : coupe semi-fine colorée au bleu de méthylène du branchiostégite de *P. chlorophthalmus*. Br : branchie ; C: cuticule ; HV : vaisseau hémolympatique; IC: cuticule interne du côté de la cavité branchiale ; OC : cuticule externe.

4.4 Osmorégulation

Chez les crustacés aquatiques, la **salinité** et ses variations potentielles font partie des facteurs importants avec lesquels les organismes doivent composer. Nous l'avons vu, les crabes de mangrove sont particulièrement soumis à de fortes variations de salinité, à l'échelle de leur cycle de vie (stade larvaire pélagique, recrutement en mangrove), saisonnière ou journalière, de par leur mode de vie intertidal : saisonnalité marquée avec de fortes pluviométries, apports d'eau douce en fonction de l'hydrographie, apports d'eau usées domestiques et d'autres effluents anthropiques, etc. Ces variations de salinité peuvent générer des stress physiologiques importants, ou entraîner des adaptations/acclimations. Lorsque l'on étudie l'acclimation à la salinité des organismes, on évoque généralement le lien entre l'osmolalité du milieu externe et celle des fluides corporels internes : le sang ou l'hémolymph (Pequeux, 1995). Quel que soit son environnement osmotique, l'animal est le siège de processus physiologiques qui permettent de maintenir l'équilibre hydrominéral entre son milieu intérieur et le milieu environnant dans des limites compatibles avec sa survie : ces processus recouvrent les mécanismes de régulation minérale, ou osmorégulation (Boudour, 2016). Les mécanismes osmorégulateurs qui maintiennent les crustacés décapodes dans des niches osmotiques souvent distinctes ont été étudiés de manière très approfondie depuis de nombreuses années (Burggren et al., 1988; Charmantier et al., 2009; Freire et al., 2008; Harris and Aladin, 1997; Little and others, 1990; Mantel and Farmer, 1983; Morris, 2001; Pequeux, 1995), révélant des schémas spécifiques de l'homéostasie osmotique à l'échelle de l'organisme (McNamara and Faria, 2012).

De ces études, quatre principaux modes de régulation osmotique ont émergé, les crustacés utilisant ces types de régulation pouvant être **euryhalins ou sténohalins**¹² (Boudour, 2016; Harris and Aladin, 1997) (**Figure 22**) :

1) La **régulation iso-osmotique ou osmoconformité** : la pression osmotique de l'hémolymph suit la variation de la salinité du milieu externe. Les crustacés marins, par exemple, sont généralement des osmoconformeurs (souvent sténohalins), ce qui signifie que leur concentration osmotique interne reste proche de celle du milieu extérieur : on ne trouve quasiment pas de gradient de concentration ionique entre leur hémolymph et le milieu extérieur, fait expliqué par leur forte perméabilité osmotique et ionique, leur régulation limitée de la concentration en solutés, par la composition ionique de l'hémolymph, ainsi que par la production d'une urine iso-osmotique (McNamara and Faria, 2012).

¹² Certaines espèces, dites euryhalines, sont capables de tolérer de grandes variations de salinité, tandis que d'autres, dites sténohalines, seront intolérantes à tout changement de salinité.

- 2) **La régulation hyper-iso-osmotique** : la régulation est hyper-osmotique en milieu dilué (pression osmotique de l'hémolymphe supérieure à celle du milieu environnant) et iso-osmotique en eau de mer et en milieu concentré (peu de différence entre la pression osmotique externe et interne). Les crustacés présentant ce mode de régulation se retrouvent souvent près des côtes ou des estuaires, comme le crabe *Carcinus maenas*, ou les homards *Homarus americanus* et *Homarus gammarus* (Charmantier, 1998).
- 3) **La régulation hyper-osmoconforme** : régulation légèrement hyper-osmotique en milieu dilué et concentré que l'on retrouve généralement chez les crustacés d'eau douce comme *Gammarus oceanicus* et certaines larves décapodes.
- 4) **La régulation hyper-hypo-osmotique** : la régulation est hyper-osmotique en milieu dilué et hypo-osmotique en milieu concentré, et concerne les crustacés ayant colonisé les zones côtières, estuariennes ou intertidales où la salinité est potentiellement variable. Les organismes sont en effet capables de maintenir la concentration et le volume de leur hémolymphe respectivement au-dessus et/ou au-dessous de la salinité ambiante, en limitant les variations de leur osmolalité hémolympatique. On parle alors de régulation extracellulaire anisosmotique¹³, basée sur des mécanismes impliquant diverses propriétés de perméabilité et de transport des solutés dans différents épithéliums transportant des ions (Theuerkauff, 2019). Selon les espèces, on trouve ces épithéliums au niveau des branchies, des épipodites, du branchiostégite ou alors insérés au niveau d'autres organes externes à la cavité branchiale comme par exemple chez les copépodes (Lignot and Charmantier, 2015).

¹³ Relatif à un équilibre osmotique avec des concentrations interne et externe différentes

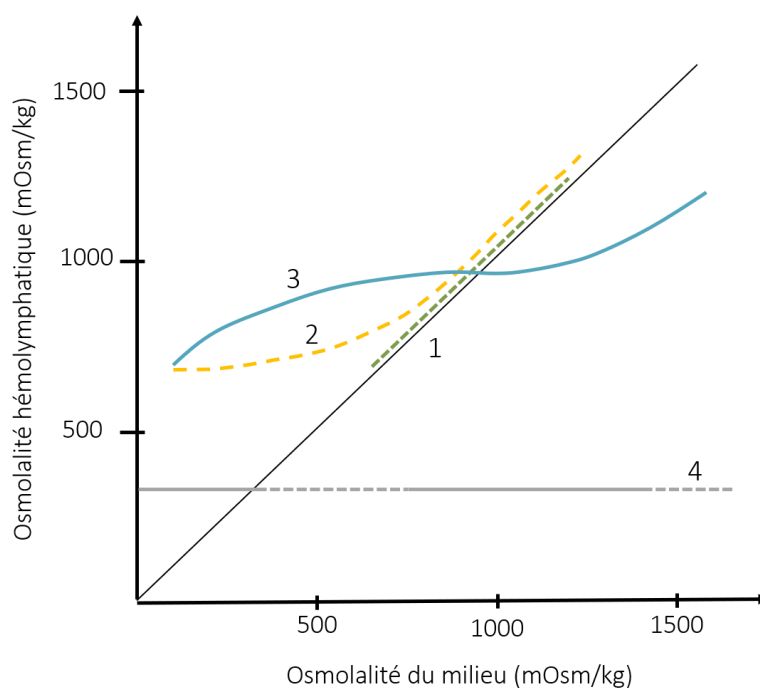


Figure 22. Courbes d'osmorégulation type chez divers groupes d'animaux aquatiques : évolution de l'osmolalité de l'hémolymphe en fonction de l'osmolalité du milieu environnant. 1 : iso-osmorégulateurs, ou osmoconformeurs, 2 : hyper-isomorphique, 3 : hyper-hypo-osmorégulateurs, 4 : régulation chez les poissons téléostéens. D'après Charmantier et al. (2009). Les crabes étudiés au cours de cette thèse sont des hyper-hypo-osmorégulateurs. L'intersection entre la courbe d'osmorégulation et la ligne d'isosmoticité est appelée point isosmotique.

Les formes terrestres ou semi-terrestres de crabes comme nos trois espèces étudiées, sont généralement de très bons hyper-hypo osmorégulateurs (particulièrement *N. africanum*, voir (Theuerkauff et al., 2018b), capables de maintenir en eau de mer diluée la concentration en solutés de leur hémolymphe à un niveau plus élevé que celui de leur environnement (hyper-osmorégulateurs). Ainsi, ils minimisent l'afflux d'eau osmotique et la perte de sel par diffusion à travers les surfaces corporelles en réduisant la consommation d'eau, la perméabilité épithéliale ou la production d'urine (Morris, 2002, 2001). A l'inverse, en eau de mer ou eau de mer sursalée (évaporation de l'eau dans les terriers à marée basse par exemple), la concentration en soluté de leur hémolymphe reste à un niveau plus faible que celle du milieu (hypo-osmorégulateurs). Ils révèlent à ce niveau une plasticité physiologique très forte dans des environnements caractérisés par des gradients salins et hydriques (exposition à la dessiccation à marée basse) très importants (McNamara and Faria, 2012; Pequeux, 1995).

Ces différentes stratégies d'osmorégulation nécessitent la mise en place de mécanismes complexes impliquant différents organes ainsi qu'une absorption et/ou excrétion active d'ions, le transport d'eau et la régulation de la concentration en acides aminés intracellulaires (Theuerkauff, 2019). Les différents organes impliqués dans ces échanges

ioniques sont en contact direct ou indirect avec le milieu extérieur : le tégument (paroi du corps), l'intestin, les organes excréteurs et les cavités branchiales (Boudour, 2016). Les branchies sont considérées comme le principal site des échanges ioniques, en plus de leur fonction respiratoire. Chez les crabes, on distingue généralement les branchies antérieures ayant plutôt une fonction respiratoire, et les branchies postérieures, également impliquées dans la respiration mais surtout dans l'osmorégulation (Copeland and Fitzjarrell, 1968; Neufeld et al., 1980) mais aussi dans l'excrétion de l'ammonium : ces organes "mixtes" jouent donc des rôles très importants dans les mécanismes d'adaptation des crabes de mangrove à leur environnement et c'est pour cette raison que nous les étudions plus précisément au cours de cette thèse.

A l'échelle cellulaire, les branchies (et les autres organes osmorégulateurs) possèdent des cellules spécialisées dans les transports ioniques actifs, les **ionocytes**. Celles-ci sont caractérisées par leur taille importante (10 à 20 μm), et par un important système d'invaginations au niveau de la membrane plasmique basale qui contient de nombreuses mitochondries (Freire et al., 2008; McNamara and Faria, 2012). A l'échelle fonctionnelle et moléculaire, les transports actifs transépithéliaux nécessitent la présence de voies transcellulaires (apicales et basolatérales) et paracellulaires (Boudour, 2016). Les échanges à travers les cellules sont assurés par des protéines transmembranaires, la Na^+/K^+ -ATPase (NKA) étant considérée comme le principal transporteur ionique actif (Lucu and Towle, 2003). Cette enzyme est fortement consommatrice d'énergie puisqu'elle utilise celle issue de la dégradation de l'ATP (fournie par les mitochondries) en ADP et phosphate inorganique pour transporter des ions potassium et sodium en générant un gradient électrochimique (Furriel et al., 2010; Towle, 1984). Ce gradient est formé par le transport actif de trois ions Na^+ du cytoplasme vers l'hémolymphe, en échange de deux ions K^+ , et entraîne d'autres échanges ioniques reposant sur d'autres transporteurs (Freire et al., 2008; McNamara and Faria, 2012) que nous ne détaillerons pas (**Figure 23**).

L'osmorégulation représente ainsi une fonction majeure dans le maintien de l'équilibre physiologique des crabes de mangrove. Cette aptitude vitale à osmoréguler varie en fonction de plusieurs facteurs, dont certains facteurs de stress ou la présence de contaminants (Lignot et al., 2000). Les branchies et la pompe NKA sont également impliquées dans une autre fonction majeure des crustacés décapodes, à savoir l'excrétion de l'ammonium.

4.5 Excrétion de l'ammonium

L'ammonium, les nitrites et les nitrates sont des composés essentiels au développement de nombreux micro-organismes des écosystèmes aquatiques, dont l'azote inorganique dissous représente un composant très courant (Romano and Zeng, 2013). La majorité des composés azotés provient de la décomposition naturelle de la matière organique

(composés azotés exogènes) et des sous-produits métaboliques du catabolisme des protéines et des acides aminés (composés azotés endogènes) produisant l'ammonium¹⁴ (Romano and Zeng, 2013; Weihrauch et al., 2004). Cependant, l'ammonium constitue un composé toxique pour la plupart des êtres vivants. Chez les crustacés décapodes, de nombreuses études ont étudié ses effets sur différentes fonctions ou compartiments de l'organisme, que nous aborderons plus spécifiquement dans les différents chapitres de ce manuscrit. Les apports azotés, notamment issus des effluents anthropiques, sont de plus en plus importants dans les milieux naturels. **L'ammonium (NH₃ et NH₄⁺)** en constitue la forme la plus toxique pour les crustacés décapodes, suivi de près par les nitrites-N et les nitrates-N (Chen and Chen, 2000; Romano and Zeng, 2007), et constitue également l'un des composants majoritaires des eaux usées domestiques (Capdeville et al., 2018; Herteman, 2010).

Ainsi, un système efficace de détoxification ou d'excrétion de l'ammonium est essentiel pour maintenir les fonctions cellulaires et conserver les taux d'ammonium des cellules et des fluides organiques dans une gamme de concentration tolérable (Weihrauch et al., 2004).

Au cours de cette thèse, nous n'avons pas investigué précisément les mécanismes de l'excrétion de l'ammonium, mais cette fonction s'avère essentielle, du fait des conditions environnementales et pressions anthropiques auxquelles les animaux étudiés sont confrontés. Elle fait ainsi partie des éléments importants à prendre en compte dans les mécanismes mis en place par les organismes étudiés afin de maintenir leur équilibre physiologique, et peut, tout comme la fonction respiratoire ou osmorégulatrice, être bouleversée par des changements environnementaux ou issus des activités anthropiques. La concentration en ammonium dans les milieux aquatiques est généralement assez faible du fait de la nitrification bactérienne et ne dépasse que rarement 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, en eau de mer non polluée et oxygénée (Koroleff, 1983). Dans ces conditions, on retrouve souvent des concentrations d'ammonium d'environ 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dans l'hémolymphe des crustacés brachyours, créant un gradient favorable à l'excrétion passive de l'ammonium (diffusion), tout particulièrement chez les espèces pélagiques (Weihrauch et al., 1999).

¹⁴ Dans cette thèse, sauf mention contraire, l'ammonium (ammonia-N) désignera la somme de NH₃ et de NH₄⁺

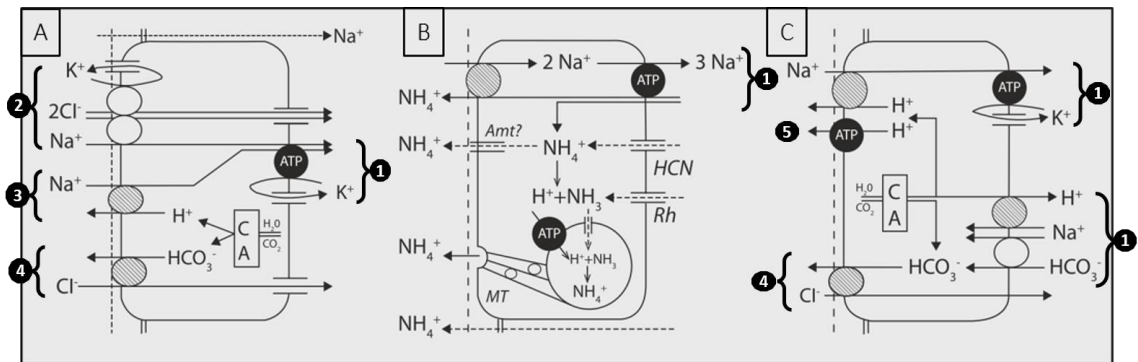


Figure 23. Modèles actuellement acceptés pour les processus de régulation ionique branchiale chez les crustacés décapodes (Weihrauch and O'Donnell, 2017). A : Osmorégulation (d'après Onken et al. (2003) B : Excrétion de l'ammonium chez *Carcinus maenas* (Weihrauch and O'Donnell, 2017, 2015) C : Modèle hypothétique général pour la régulation acido-basique (d'après Freire et al., 2008). 1 : pompe à potassium (NKA) ; 2 : échangeur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC) ; 3 : échangeur Na^+/H^+ (NHE = antiport dépendant du sodium) ; 4 : symport $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (cotransporteur ou transport couplé dans la même direction de deux ions de même charge) ; 5 : pompe à proton (H^+ -ATPase) ; CA = anhydrase carbonique ; MT = mitochondrie

A l'inverse, les animaux benthiques font souvent face à des concentrations d'ammonium ambiant beaucoup plus élevées, en particulier dans des milieux connaissant de fortes teneurs en matière organique (Gonçalves et al., 2006; Weihrauch et al., 1999). Les fortes concentrations d'ammonium sont généralement retrouvées dans les eaux anoxiques, interstitielles ou stagnantes pendant les périodes de minéralisation suivant l'effondrement de blooms phytoplanctoniques (Weihrauch et al., 2004). C'est typiquement le cas en mangrove, où les crabes qui creusent des terriers sont exposés à des sédiments et à de l'eau interstitielle anoxiques et chargés en ammonium. Dans les conditions, les animaux peuvent se trouver confrontés à des concentrations d'ammonium dans le milieu extérieur excédant largement leur concentration interne, facilitant ainsi l'influx passif. Ce composé pénétrera dans l'organisme par les branchies et/ou les voies digestives. Cet ammonium exogène devra alors être excrété en plus de celui issu de leur propre métabolisme. C'est pour cette raison que les crabes étudiés ont développé des protections adaptatives pour lutter contre ces influx, comme par exemple une excrétion active de l'ammonium, une tolérance à de fortes concentration et/ou des mécanismes de détoxification efficaces (Weihrauch et al., 2004, 1999). Weihrauch et al. (2004) ont ainsi mis en évidence plusieurs modèles d'excrétion de l'ammonium chez les crustacés, en fonction du mode de vie et des espèces, terrestres ou aquatiques. Dans la majorité des cas, les modèles énoncent que la NKA serait une fois encore la principale force motrice du transport du NH_4^+ vers l'espace extracellulaire pour l'excrétion active de l'ammonium (Gonçalves et al., 2006; Weihrauch et al., 1999, 1998). Rappelons le rôle majeur de cette enzyme clé dans l'osmorégulation discuté plus haut. Il est probable que chez les Ocypodidae (dont font partie les deux crabes

violonistes étudiés dans cette thèse), la glande antennaire¹⁵ joue également un rôle important en augmentant la concentration d'ammonium dans l'urine, bien que les branchies soient toujours nécessaires pour mener à bien le processus d'excrétion (De Vries and Wolcott, 1993).

Ainsi, les branchies des crabes de mangrove exerçant des fonctions clés de respiration, d'osmorégulation et d'excrétion de l'ammonium, il nous a semblé pertinent de les étudier au regard du contexte de pressions et de rejets anthropiques auxquels les crabes sont régulièrement confrontés (**Figure 24**).

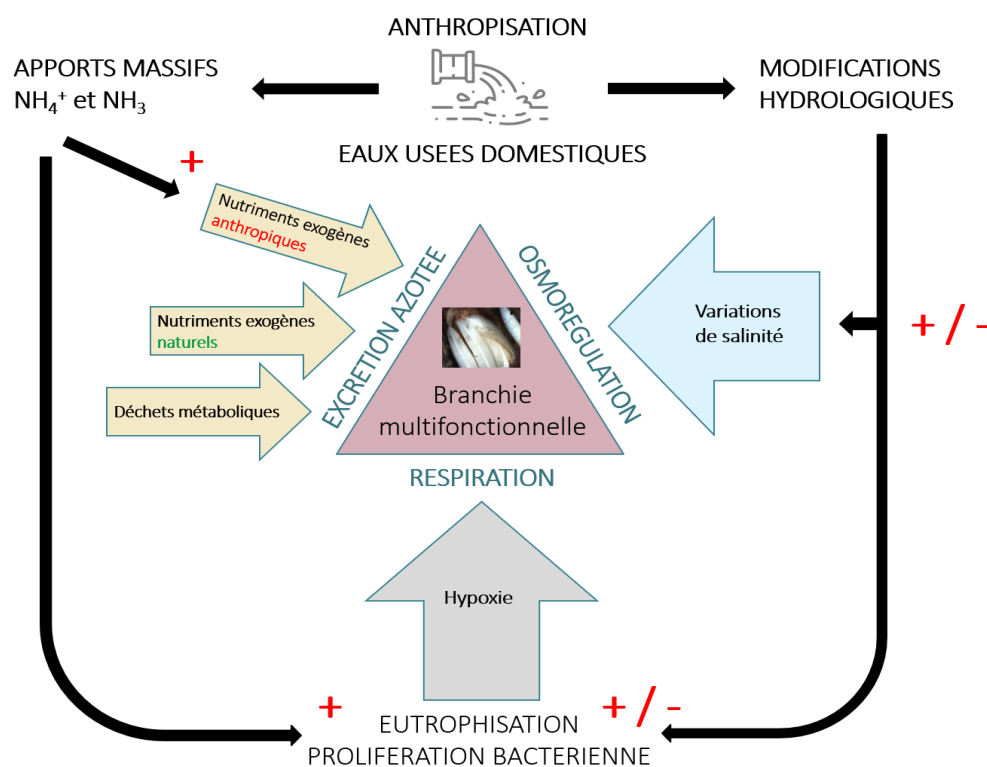


Figure 24. Schéma global reprenant les fonctions principales des branchies des crabes de mangroves, ainsi que les effets potentiels des apports d'eau usée domestique sur leur fonctionnement.

4.6 Les fonctions hépatopancréatiques

L'hépatopancréas des crustacés et des mollusques joue un rôle important dans la digestion des aliments, en synthétisant et en sécrétant les enzymes digestives. Cet organe est également la cible des contaminants chimiques qui y sont transportés pour leur détoxification, à travers l'ingestion de feuilles, sédiments, biofilm ou eau. Ainsi, il constitue l'un des principaux sites d'accumulation des contaminants (notamment métalliques) chez

¹⁵ Organe jouant, chez les invertébrés, un rôle analogue à celui du rein chez les vertébrés et pouvant être impliqué dans les mécanismes d'osmorégulation et d'excrétion de l'ammonium en fonction des espèces (Freire et al., 2008; Tsai and Lin, 2014).

les crustacés aquatiques (Dedourge et al., 2008). Le rôle majeur de l'hépatopancréas aussi bien au niveau de la digestion que dans le stockage et la détoxification des composés toxiques rend importante la connaissance des effets éventuels des contaminants sur l'activité des enzymes digestives et antioxydantes. Pour ces raisons, nous avons souhaité l'étudier, en complément des branchies afin d'obtenir une vision plus intégrative des effets des contaminants à l'échelle de l'organisme. Au fil des études scientifiques, il fut nommé foie, pancréas, glande intestinale moyenne, glande gastrique, glande digestive, organe digestif, hépatopancréas, et organe périgastrique. Il exerce des fonctions qui, chez les vertébrés, sont attribuées à l'intestin, au foie et au pancréas exocrine (Vogt, 2019).

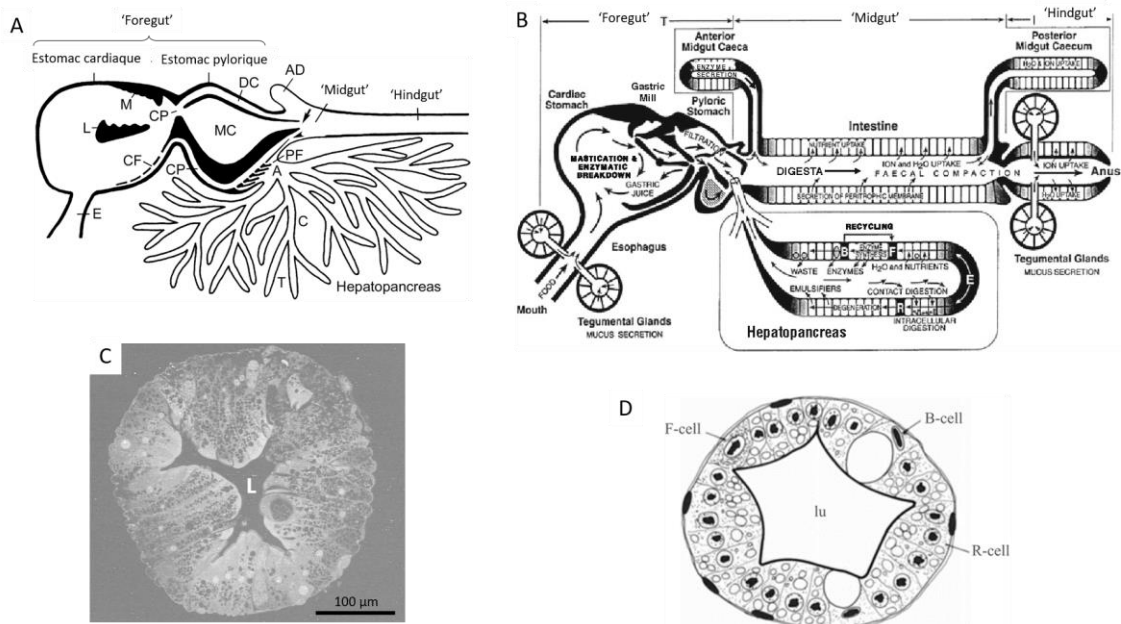


Figure 25. Représentations de l'hépatopancréas des crustacés décapodes. A : Relations entre l'hépatopancréas et les autres organes du tube digestif. Représentation d'un plan sagittal médio-latéral chez une écrevisse d'eau douce. L'hépatopancréas est constitué de nombreux tubules (T), et de canaux collecteurs (C) à terminaison aveugle et se termine dans l'atrium (A) possédant une continuité vers l'estomac, l'intestin moyen et l'intestin grêle ('midgut' et hindgut' sur la figure) via des filtres pyloriques (PF) et la valve hépatopancréatique-intestinale (pointe de la flèche). L'intestin antérieur (cuticulaire) comprend l'œsophage (E), l'estomac cardiaque et l'estomac pylorique. L'estomac cardiaque comprend un moulin gastrique composé d'une dent médiane (M) et de dents latérales (L). Il sert au broyage et à la décomposition chimique de la nourriture et à la première filtration du chyme à travers les filtres cardiaques (CF). L'estomac pylorique à trois étages est constitué de deux chambres ventrales comprenant les canaux filtrants cardiopyloriques (CP), les filtres pyloriques (PF), et des chambres médiane (MC) et dorsale (DC). L'intestin moyen possède un cæcum dorsal antérieur (AD). L'intestin moyen court proprement dit synthétise la membrane péritrophique qui entoure les boulettes fécales. L'intestin postérieur bordé de cuticule canalise les matières fécales vers l'extérieur (d'après Vogt, (2019)). B : Schéma des processus digestifs se déroulant dans l'intestin des crustacés décapodes (d'après McGaw and Curtis, (2013)). C : Coupe transversale de l'hépatopancréas d'un crabe de mangrove (*N. africanum*) (MEB). D : Schématisation des types cellulaires d'un tubule d'hépatopancréas (coupe transversale).

Bien que l'hépatopancréas ait été étudié depuis longtemps à travers l'histologie, la microscopie électronique, la physiologie, la biochimie et la biologie moléculaire, il n'existe pas encore de concept structurel et fonctionnel universellement accepté et les fonctions des différents types cellulaires que l'on y retrouve sont notamment toujours le sujet de controverses (voir Vogt (2019) pour une review). Nous présentons ici de manière brève les principaux types cellulaires de l'hépatopancréas ainsi que les fonctions leur étant couramment attribuées mais ces thématiques seront abordées plus en profondeur au cours du premier chapitre. L'hépatopancréas des crustacés décapodes est composé de centaines de milliers de tubules aveugles (**Figure 25.A, C, D**), leur nombre dépendant de l'espèce. Chaque tubule est tapissé d'un épithélium monocouche et entouré de sinus hémolymphatiques. Ces tubules sont composés de R-cells (Restzszellen, cellules résorbables), de F-cells (Fibrillenzellen, cellules fibrillaires), de B-cells (Blasenzellen, cellules vésiculaires), et de M-cells (cellules naines). En plus de ces cellules, les E-cells (cellules embryonnaires) sont des cellules souches adultes donnant naissance aux trois premiers types de cellules différenciées (Al-Mohanna et al., 1985; Vogt, 1993). La **Figure 26** propose une visualisation de ces types cellulaires ainsi qu'un schéma simplifié de leur implication dans le cycle digestif lié à l'hépatopancréas.

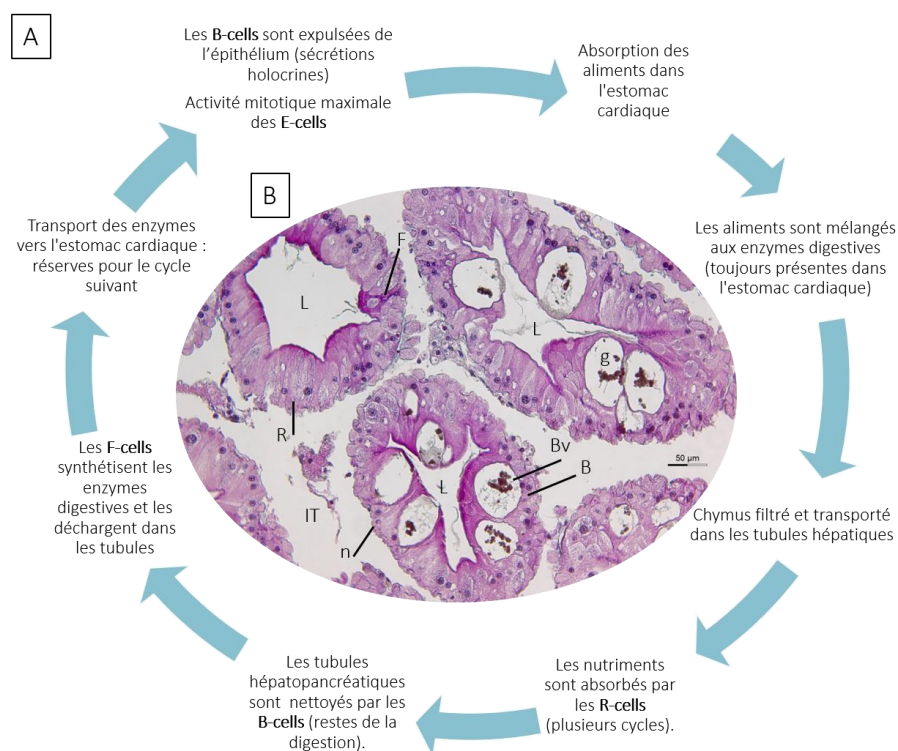


Figure 26. A : Schéma simplifié de l'implication des différents types cellulaires dans le cycle digestif lié à l'hépatopancréas des crustacés décapodes (d'après Vogt, 2019, 1993). B : Coupe transversale composée de trois tubules hépatopancréatiques de *Neosarmatium africanum*. IT : espace inter-tubulaire ; L : Lumen, R : R-cells ; F : F-cell ; B : B-cell ; Bv : vacuole de B-cell ; g : granule dense contenue à l'intérieur d'une vacuole de B-cell.

Trois zones sont traditionnellement distinguées le long de cet organe : la zone distale, la zone des B-cells et la zone proximale (Gibson and Barker, 1979). La zone distale comprend les E-cells à l'extrémité des tubules et les R-, F- et B-cells en cours de différenciation plus en aval (Vogt, 1994, 1993). La zone des B-cells comprend des R-, F-, et B-cells matures et est caractérisée par des B-cells avec des vacuoles proéminentes. Enfin, la zone proximale est dépourvue de B-cells qui sont expulsées à la fin de la zone des B-cells par le biais d'une sécrétion holocrine liée au processus de digestion. Cette zone contient par contre des R- et F-cells. L'hépatopancréas est donc impliqué dans la sécrétion d'enzymes digestives, dans l'absorption de nutriments, dans l'excrétion et la détoxification des tubules, entre autres fonctions. Au vu de ces différentes fonctions importantes à l'échelle du métabolisme des organismes et étant un organe directement au contact des potentiels contaminants avec l'ingestion (de feuilles, propagules et sédiments), nous avons souhaité étudier son fonctionnement afin de compléter les résultats obtenus sur *N. africanum* à l'échelle du métabolisme et des branchies (Theuerkauff et al., 2020, 2018a, 2018b)

5. Enjeux et objectifs de la thèse

Nous l'avons vu, les crabes de mangrove sont des organismes ayant développé des acclimatations (ou des adaptations) morphologiques et physiologiques leur permettant de survivre dans des milieux contraignants tels que les écosystèmes de mangrove, mais ces réponses et mécanismes ne sont pas encore totalement compris et peuvent être dépendants des espèces. Nos travaux se concentrent sur trois espèces qui, du fait de leur rôle d'ingénieur de l'écosystème, jouent des rôles très importants contribuant au maintien du fonctionnement des mangroves. Ce fonctionnement très complexe et encore trop peu étudié est donc potentiellement menacé par les pressions anthropiques grandissantes, notamment dans le cas des mangroves insulaires et de Mayotte, connaissant des apports azotés et d'eau usée domestique assez conséquents du fait du manque de systèmes adéquats d'épuration des eaux. L'étude des effets des eaux usées et de l'ammonium sur la physiologie des crabes de mangroves est un élément essentiel à la compréhension des dynamiques pouvant avoir lieu dans le milieu naturel, à différents niveaux intégratifs et selon différentes échelles spatiales : c'est dans ce sens que cette thèse trouve sa place dans le domaine de l'écophysiologie. Elle s'appuie notamment sur le développement et la mise en œuvre de marqueurs biologiques individuels pour tenter de répondre à la question suivante :

Quels biomarqueurs écophysiologiques peut-on mettre en place dans le contexte d'anthropisation des mangroves pour caractériser l'état de santé des organismes à l'échelle individuelle en participant à la compréhension des impacts à l'échelle plus large des écosystèmes et de leur fonctionnement ?

Les objectifs de la thèse sont les suivants :

- 1) Compléter les connaissances sur les effets de l'exposition à l'eau usée ou à l'ammonium sur la physiologie d'une espèce ingénieur de crabe de mangrove (*Neosarmatium africanum*) en condition contrôlée en s'intéressant à un organe clé : l'hépatopancréas.
- 2) Améliorer la compréhension des mécanismes écophysiologiques individuels pouvant être liés à des modifications mesurables au niveau des communautés dans le milieu naturel anthropisé à travers l'étude de traits métaboliques et comportementaux d'une espèce de crabe violoniste (*Paraleptuca chlorophthalmus*) fortement impactée par les apports réguliers d'eau usée dans une mangrove.

- 3) Étudier la vulnérabilité écophysiological des crabes de mangrove de deux îles connaissant des pressions anthropiques historiquement opposées. Nous nous intéressons ainsi à deux espèces de crabes (Ocypodidae) dominantes dans des habitats de canopée semi-ouverte sont étudiées dans les îles d'Europa (pristine) et de Mayotte (anthropisée) situées dans le Canal du Mozambique. Les réponses physiologiques de crabes prélevés sur les deux sites sont étudiées face à un stress osmotique et un apport d'ammonium qui simule, en conditions contrôlées, des rejets hydrologiques issus d'une présence humaine.

La thèse est structurée en trois chapitres qui visent respectivement à répondre aux 3 objectifs listés ci-dessus. A chaque chapitre correspond un article accepté ou soumis pour publication dans une revue scientifique à comité de lecture.

Chapitre 1 : Les travaux de Dimitri Theuerkauff portant notamment sur l'espèce *Neosarmatium africanum*, ingénieur de l'écosystème, et sur les effets de l'exposition à l'eau usée sur sa physiologie ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances principalement au niveau du métabolisme, de l'osmorégulation et du fonctionnement des branchies. Afin d'obtenir une vision plus globale à l'échelle de l'organisme, nous avons étudié les effets potentiels de l'eau usée sur un deuxième organe clef du métabolisme : l'hépatopancréas. Des marqueurs de défenses antioxydantes (CAT, SOD, GST), l'activité de certaines enzymes digestives ainsi que des analyses histologiques ont été réalisées afin d'améliorer les connaissances sur cet organe et sur la physiologie de cette espèce de crabe ingénieur.

Chapitre 2 : Il a été démontré que les rejets chroniques ou ponctuels d'eau usée domestique en mangrove entraînent des modifications dans les communautés de crabes à diverses échelles. Dans les parcelles impactées du site de bioremédiation de Malamani, une espèce disparaît quasiment de la zone de rejets : *Paraleptuca chlorophthalmus*. Dans ce contexte, nous avons cherché à étudier les impacts des eaux usées sur la physiologie à l'échelle de l'organisme et les réponses comportementales pouvant expliquer les modifications observées dans le milieu naturel. Pour cela, nous avons évalué des traits comportementaux : distance parcourue, temps passé dans le milieu aérien et dans le milieu aquatique (correspondant au mode de vie bimodal des animaux), activité, ainsi que des marqueurs métaboliques : consommation d'oxygène et activité de la citrate synthase (CS) et de la lactate déshydrogénase (LDH).

Chapitre 3 : Il existe à l'heure actuelle très peu d'écosystèmes de mangrove non impactés par les actions anthropiques, pouvant être considérés comme "pristine". L'étude des effets de basses salinités et de l'ammonium sur une population de crabes ayant connu peu d'apport d'origine anthropique permet d'avoir un aperçu de la tolérance de certaines espèces de crabes de mangroves face à un potentiel scénario d'implantation humaine, ainsi qu'un état "témoin" pour les conditions contrôlées. Ce chapitre, basé sur une échelle spatiale élargie, se focalise sur la capacité osmorégulatrice, le métabolisme global ainsi que sur d'éventuels dommages ou adaptations histologiques (branchies et hépatopancréas) de deux espèces de crabes violonistes dominants dans des faciès à *Rhizophora mucronata* de l'île Europa et de Mayotte : l'une n'a connu que très peu d'apports d'origine anthropique, l'autre vit sur les rives d'un cours d'eau où se déversent régulièrement des effluents domestiques. L'existence d'une vulnérabilité différentielle pour ces deux espèces a été étudiée.

Les **indicateurs physiologiques et comportementaux** évalués ainsi que les conditions expérimentales mises en place dans les différents chapitres sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2. Synthèse des méthodologies et marqueurs déployés pour répondre aux trois objectifs de la thèse, organisée par chapitre.

Chapitre	Condition expérimentale	Temps d'exposition	Niveau d'intégration - Organes	Marqueurs	Méthodologie
1	Eau de mer diluée Eau usée Ammonia-N	5h	Hépatopancréas	Activité des enzymes antioxydantes	Activité CAT, SOD, GST
				Activité des enzymes digestives	Activité tot. protease, trypsine, chymotrypsine
				Histologie	Photographies et comptages (ImageJ)
2	Eau de mer diluée Eau de mer diluée Ammonia-N Eau usée	6h (0h, 3h, 6h)	Branchies	Marqueurs métaboliques	Activité CS et LDH
			Organisme	Respiration unimodale (eau)	Système flux intermittent
				Comportement	Choix milieu : air/eau Vidéos et analyses (Ethovision XT)
3	Eau de mer diluée Eau de mer diluée Ammonia-N	96h (0h, 24h, 72h, 96h)	Branchies	Histologie	Photographies et comptages (ImageJ)
			Hépatopancréas	Histologie	Photographies et comptages (ImageJ)
			Organisme	Taux métabolique	Système flux intermittent
				Capacité osmorégulatrice	Prélèvement d'hémolymphe Osmométrie

Chapitre 1

Validation et mise
en œuvre de
biomarqueurs
physiologiques sur
une espèce ingénieur
de l'écosystème
mangrove

Chapitre 1 – Présentation



Neosarmatium africanum

Contexte :

Plusieurs études ont été réalisées sur la physiologie du crabe semi-terrestre *Neosarmatium africanum*, exposé à la **dessalure et à l'eau usée** (Theuerkauff et al., 2018a, 2018b), dans le contexte du site pilote de bioremédiation de Malamani (Mayotte). Les résultats montrent des effets au niveau du **métabolisme global**, avec une augmentation très forte de la consommation d'oxygène après 5h d'exposition. Ces études ont également montré que le **fonctionnement des branchies** était impacté à différents niveaux (épaisseur de l'épithélium, Na^+/K^+ -ATPase, défenses antioxydantes), générant potentiellement des **compromis énergétiques** pouvant expliquer ce dérèglement métabolique. Dans le cadre de la thèse, nous avons souhaité obtenir une **vision intégrative plus exhaustive** de l'effet des eaux usées (EU) et de l'ammonium (utilisé comme proxy de l'eau usée) sur la physiologie de cette espèce ingénieur de l'écosystème. Nous avons ciblé l'**hépatopancréas** qui est un organe majeur du métabolisme en complément des branchies, en déployant des biomarqueurs ciblant les fonctions principales de celui-ci : digestion, détoxification, excrétion.

Questions :

- 1 - Les principales fonctions de l'hépatopancréas sont-elles impactées par une exposition courte (5h) à l'EU et à l'ammonium ?
- 2 - L'ammonium est-il un composant délétère majeur de l'EU étudiée et peut-il être utilisé comme un proxy ?

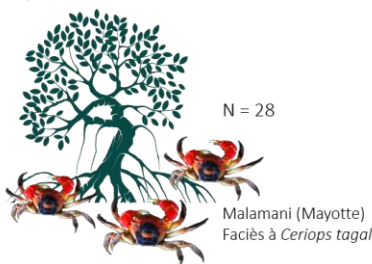
Méthodologies :

Des individus mâles *N. africanum* (N=28) ont été prélevés à marée basse dans une zone non impactée du site expérimental de Malamani. Après 72h d'acclimatation en eau de mer, ils ont été exposés pendant 5h de manière individuelle aux trois conditions expérimentales : eau douce (0.5 ppt, FW dans le chapitre), ammonium (5 ppt, 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ammonium, N dans le chapitre) et eau usée prétraitée (WW dans le chapitre). Après euthanasie et dissection de l'hépatopancréas, des analyses ont été réalisées :

- Activité des enzymes digestives (protéases totales, trypsine, chymotrypsine)
- Activités des enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GST)
- Marqueurs histologiques sur un certain type cellulaire (B-cells)

① Prélèvement

(D. Theuerkauff, J.H. Lignot)



② Expositions

(D. Theuerkauff
J.H. Lignot)



Eau de mer
Stabulation 72h



Eau de mer diluée
N = 9



Ammonium 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
N = 10



Eau usée domestique
N = 9

5h

③ Euthanasies, dissections, fixations

(D. Theuerkauff, J.H. Lignot)



Prélèvement hépatopancréas

- Fixation bouin : coupes et colorations (M. Lejeune)
- Flash freezing : activités enzymatiques

④ Mesures

Activités enzymatiques

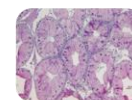
- Digestives (D. Martinez)
- Antioxydantes (L. Mégevand)



Biochimie
Spectrophotométrie

Marqueurs histologiques

- (L. Mégevand)
- Dilatation tubules
- Vacuollisation (B-cells)



Histologie



The hepatopancreas of the mangrove crab *Neosarmatium africanum*: a possible key to understanding the effects of wastewater exposure (Mayotte Island, Indian Ocean)

Laura Mégevand¹ · Diana Martínez-Alarcón² · Dimitri Theuerkauff³ · Georgina A. Rivera-Ingraham⁴ · Mathilde Lejeune⁵ · Jehan-Hervé Lignot¹ · Elliott Sucre^{1,6}

Received: 5 March 2021 / Accepted: 10 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Mangrove crabs are ecosystem engineers through their bioturbation activity. On Mayotte Island, the abundance of *Neosarmatium africanum* decreased in wastewater-impacted areas. Previous analyses showed that global crab metabolism is impacted by wastewater, with a burst in O₂ consumption that may be caused by osmo-respiratory trade-offs since gill functioning was impacted. As the hepatopancreas is a key metabolic organ, the purpose of this study was to investigate the physiological effects of wastewater and ammonia-N 5-h exposure on crabs to better understand the potential trade-offs underlying the global metabolic state. Catalase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase, total digestive protease, and serine protease (trypsin and chymotrypsin) activities were assessed. Histological analyses were performed to determine structural modifications. No effect of short-term wastewater and ammonia-N exposure was found in antioxidant defenses or digestive enzyme activity. However, histological changes of B-cells indicate an increase in intracellular digestive activity through higher vacuolization processes and tubule dilation in wastewater-exposed crabs.

Keywords Mangrove · Wastewater · Ammonia-N · Crustacean ecophysiology · Hepatopancreas histology · Digestive enzymes · Antioxidant enzymes

Introduction

Inadequate processing of wastewater (WW) is one of the main issues affecting tropical coastlines. Lack of proper sanitation

causes many health issues, diseases, and infections through chronic population exposure to pathogens. Anthropogenic nutrients also cause changes in the structure and function of nearshore coastal ecosystems. The impacts of these modifications have been studied over the last few decades, with particular attention given to the role of eutrophication.

Our study took place in the Comoros archipelago in the northern part of the Mozambique Channel, and more specifically on Mayotte, the island with the highest human density. In these territories, the direct and uncontrolled discharge of WW into the environment is common due to the lack of efficient treatment systems. This is particularly the case for the mangrove forest of Mayotte, which covered 694 ha in 2016 (Jeanson et al. 2019). Mangrove sediments and trees along tropical coastlines are known to efficiently absorb most of the nutrients contained in sewage (Tam and Wong 1995, 1996; Amaral et al. 2009). These ecosystems have thus been considered a natural means to treat WW, and many studies in this context have been conducted over the last 40 years (Clough et al. 1983; Wong et al. 1995, 1997, Ouyang and Guo 2016, 2018). A bioremediation pilot study was set up in the village of Malamani (Mayotte) in 2008 (Herteman 2010).

Responsible Editor: Cinta Porte

✉ Laura Mégevand
laura.megevand@protonmail.com

¹ UMR9190-MARBEC, Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

² Alfred Wegener Institute, Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, 27570 Bremerhaven, Germany

³ Station de Recherche Océanographiques et Sous-marines STARESO, 20260 Calvi, Punta Revellata, France

⁴ Laboratoire Environnement de Petit Saut, HYDRECO, BP 823, Kourou, 97388 Guyane, France

⁵ Terres Australes et Antarctiques Françaises, rue Gabriel Dejean, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

⁶ Centre Universitaire de Formation et de Recherche de Mayotte (CUFR), 97660 Dembeni, Mayotte, France

Pretreated domestic effluent from an Imhoff tank was regularly discharged at low tide into experimental parcels located in the nearby mangrove forest

. On this site, several studies have investigated the effects of WW discharge on vegetation growth and benthic macrofauna (Capdeville 2018; Theuerkauff 2018). Among the latter, mangrove crabs are considered ecosystem engineers due to the key role they play in ecosystem functioning, particularly through their bioturbation activity (Cannicci et al. 2008; Lee 2008; Fusi et al. 2017).

Regular WW discharges over a period of one and a half years (from October 2012 to April 2014) on the experimental site of Malamani caused major modifications in the macrofauna community (Capdeville et al. 2018). The crab community of the Malamani mangrove ecosystem typically comprises ten species split into two groups: the dominant Sesarmidae species and Ocypodidae. A significant reduction of the α -diversity (based on the Shannon diversity index) was also observed (Capdeville et al. 2018, 2019). WW discharge leads to a stronger dominance of *Parasesarma guttatum* (Milne-Edwards, 1869, Sesarmidae) and causes the reduction or even disappearance of other crab species, indicating that certain species may benefit from the decreased density of others. Theuerkauff et al.'s (2020) recent in situ ecotoxicological study on the Malamani mangrove confirms WW impacts throughout the crab community, showing a significant decrease in average crab burrow densities (across all species) in WW-impacted areas (on average 20 burrows.m⁻¹) compared to control areas (on average 60 burrows.m⁻¹).

In this context, what would be the individual physiological effects leading to such a change in the community structure?

Among the species studied by Capdeville et al. (2018), *Neosarmatium africanum* (De man, 1887, Sesarmidae), previously known as *N. meinerti* (Ragionieri et al. 2012; Theuerkauff et al. 2018a, 2018b), is one of the species that has been reported to decrease in number in areas that are chronically exposed to WW. Fusi et al. (2017) provided a list of key ecological functions performed by *N. africanum* for the mangrove ecosystem such as burrowing (Micheli et al. 1991; Berti et al. 2008), contribution to carbon burial and storage (Andretta et al. 2014), modification of sediments and distribution of sediment grain size (Warren and Underwood 1986), microhabitat creation for other fauna (Bright and Hogue 1972; Dittmann 1996; Gillikin et al. 2003), and contribution to secondary production (Lee 1997). If those crucial functions are now well documented, information on the sensitivity of this engineer species to environmental changes is still lacking. This species inhabits different tidal belts in the mangrove (mostly the upper part of the mangrove) and is regularly exposed to wide variations in salinity, ranging from hypersaline conditions at low tide or during the dry season, to freshwater conditions from run-off streams during the rainy season (Macnae and Kalk 1962). *N. africanum* is a strong hyper-

hypo-osmoregulator that can tolerate acute salinity changes by rapidly switching its osmoregulatory physiology without any evident effect on its fitness (Gross et al. 1966; Theuerkauff et al. 2018b). Focusing on the physiological characteristics of *N. africanum* should, therefore, allow a better understanding on the effects and challenges posed by WW exposure (Theuerkauff et al. 2018a, 2020) and the reasons underlying the decrease in their numbers in WW-impacted areas.

In stressful in situ conditions, mangrove crabs can escape and avoid physiological stress by different behavioral means, such as thermoregulating, hiding in a burrow, or wetting their body (Reid et al. 1997; Hogarth 2015; Nobbs and Blamires 2017). The spatial variation of faunal assemblages and the functional diversity and biogeochemical heterogeneity of mangrove ecosystems generate background noise (Chapman and Tolhurst 2004; Kristensen 2008; Amaral et al. 2009; Cannicci et al. 2009), thus making the effects of organic contaminants on these benthic macrofauna complex and contradictory to study (Romano and Zeng 2013; Theuerkauff et al. 2018a). Nevertheless, previous laboratory studies have revealed dramatic effects of WW exposure on mangrove crab physiology (Theuerkauff et al. 2018a, 2020). This was observed on the general metabolism of the crabs, their osmotic and redox balance, and more specifically on the morphology and physiology of the gills.

For example, the short-term exposure (5 h) of adult *N. africanum* to WW affects their respiratory and ionoregulatory processes. Crab gills can be divided into two groups: the anterior gills mostly enable respiratory function, while the posterior gills couple gas exchange and osmotic regulation (Copeland and Fitzjarrell 1968; Neufeld et al. 1980; Theuerkauff et al. 2018b) and regulates the osmoregulatory compromise. The thickness of the lamellar epithelium in posterior gills of crabs exposed to WW can be reduced, across a transverse axis, by one third in the middle part and by half in the apical part of the gill. This reduction of the epithelial thickness must lower the osmoregulatory capacity of the gills and could be partly responsible for the osmotic imbalance that has been observed (i.e., a drastic decrease of the Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) activity in anterior gills (a key enzyme involved in ion transports)), as shown in Theuerkauff et al. (2018b). These changes could explain the higher metabolic demand, as seen with the burst in O₂ consumption in the laboratory, and the metabolic responses observed in situ. However, knowledge about metabolic trade-offs that may be underlying such changes at the whole organism scale is incomplete and limited to specific responses within the gills. Pollutants may be absorbed via the integument, through the gills and/or the gut after food consumption (Verboost et al. 1989; Ahearn et al. 2004). This strengthens the argument for a more detailed study that focuses

specifically on the hepatopancreas (also known as the midgut gland), a key organ that plays a major role in crab metabolism.

This major metabolic organ encompasses intestinal, hepatic, and pancreatic functions in decapod crustaceans (Dall and Moriarty 1983; Vogt 1993). It is involved in food digestion through the synthesis of key digestive enzymes, nutrient absorption and storage, and the detoxification of various xenobiotics (Ceccaldi 1998; Zilli et al. 2003; Ortega et al. 2014).

Therefore, we hypothesize that the hepatopancreas of crabs exposed to WW would be under physiological challenge, inducing changes in detoxification and extracellular or intracellular digestive processes. Such potential functional impacts may modify individual energy allocation.

As the chemical analysis of surface water, porewater, and pretreated WW collected from control and impacted areas revealed that the major component of the WW is the ionized form of ammonia-N: NH_4^+ (Table 1), we also hypothesized that it would be the primary damaging component in WW. We considered ammonia in a separate experimental condition in order to test this hypothesis. It is considered in this study as total ammonia (ammonia-N), which represents the sum of unionized ammonia NH_3 and ionized ammonia NH_4^+ (Haywood 1983; Lemarié et al. 2004; Bermudes and Ritar 2008).

Short-term exposures (5 h) were used to match the effective exposure to freshwater (FW) and WW following the tidal shift: on the experimental site, WW discharge occurs for 1 h on every second low tide per day, and 1 h before the end of the ebb tide (Theuerkauff et al. 2018a). After exposure, different biomarkers were measured in the hepatopancreas to test our hypotheses. We analyzed antioxidant defense as previously considered in the gills (Theuerkauff et al. 2018a), then further determined the activity of trypsin and chymotrypsin, the most common proteases in the digestive system of decapods (García-Carreño et al. 1994; Sainz et al. 2005), and finally,

realized histological measurements on the hepatopancreas tubules on a particular cell type, the B-cells (Basenzellen, blister-like cells).

Materials and methods

Study animals

Adult male *N. africanum* ($N = 28$) were caught at low tide from an uncontaminated area in the Malamani mangrove (Boueni Bay, Mayotte island, $12^\circ 55' 1''\text{S}$, $45^\circ 9' 23''\text{E}$, Comoros Archipelago). The crabs were transported to the University Centre of Mayotte (CUFR, Dembeni), where they were allowed to acclimate for 3 days prior to experiments. They were distributed among individual plastic boxes measuring $12 \times 8.5 \times 5$ cm filled with filtered seawater ($\sim 33\text{‰}$ salinity; $1050 \text{ mOsmol kg}^{-1}$) under a natural photoperiod (12 h light:12 h dark). Crabs were not fed during the acclimation period nor during experiments (5 h).

Experimental design (short-term exposure to WW and ammonia-N)

After acclimation in seawater (SW), each box containing a crab was gently emptied and immediately filled with the relevant exposure solution. The first treatment was a control (transfer from SW to freshwater to make ~ 0.5 ppt salinity/ $\sim 14.5 \text{ mOsm kg}^{-1}$ and referred as FW) with boxes filled with FW (C, $N = 9$). The second treatment (transfer from SW to ammonia-N solution) was an exposure with ammonium chloride dissolved in FW, $14.5 \text{ mOsm kg}^{-1}$ and $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ammonia-N solution (N, $N = 10$). The third treatment (transfer from SW to WW) was an exposure with pretreated WW collected the same day of the experiment (morning) from the

Table 1 Physical and chemical characterization of (undiluted) WW, surface water, and sediment porewater for impacted and unimpacted areas of the bioremediation pilot study site of Malamani (partly modified from Capdeville et al. 2018 and 2019; Theuerkauff et al. 2020). n.a. = no data available. For WW, mean values (\pm SEM) were obtained from four

measurements made on two consecutive days. Surface water (residual pools) and porewater (piezometers installed at approximately 1-m depth) data was collected at low tide, and mean values (\pm SEM) were obtained from 2-day measurements under similar hydrological conditions, in the upper and lower parts of the study areas (total of four measurements)

	Wastewater	Unimpacted area		Impacted area	
		Surface water	Porewater	Surface water	Porewater
NH_4^+ (μM)	3834 ± 134	37.97 ± 20.28	0.38 ± 0.23	294 ± 147	0.14 ± 0.09
NO_3^- (μM)	0.46 ± 0.03	1.05 ± 0.21	0.35 ± 0.20	1.28 ± 0.64	0.39 ± 0.22
NO_2^- (μM)	0.64 ± 0.25	0.61 ± 0.11	0.06 ± 0.01	4.20 ± 0.08	0.07 ± 0.00
PO_4^{3-} (μM)	186 ± 0.1	0.83 ± 0.01	5.93 ± 1.28	0.37 ± 0.15	10.79 ± 2.1
Temperature ($^\circ\text{C}$)	28.1	23.2 ± 1.2	24.8 ± 0.2	22.8 ± 0.2	25.0 ± 0.0
Salinity (psu)	0.39 ± 0.02	41.1 ± 1.3	39.5 ± 1.7	35.3 ± 2.0	45.8 ± 0.2
pH	7.23 ± 0.00	7.58 ± 0.01	n.a.	7.45 ± 0.01	n.a.

Imhoff tank at the Malamani experimental site (WW, $N = 9$, see Table 1 for composition).

Sampling/dissections

After exposure, crabs were anesthetized and euthanized on ice for hepatopancreas sampling. Half the sample was fixed in Bouin's fixative solution for 48 h for histological analyses. The other half was flash frozen in liquid nitrogen and conserved separately at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1.5-ml tubes for enzymatic assays. In this study, only animals in intermolt stage C were considered. This stage was verified through epipodite examination under a dissecting microscope after dissection to avoid handling-associated stress on the biological markers considered.

Assessment of antioxidant defense activity

Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione S-transferase (GST) activities were measured spectrophotometrically in hepatopancreas samples. All samples were diluted in a KPi 50 mM buffer with 60 mM EDTA at 1:20, 1:5, and 1:5 for CAT, SOD, and GST measurements respectively. Tissue homogenization was achieved using three stainless steel milling balls (Retsch, no. FR0120) in a Mixer Mill MM400 (Retsch GmbH, Haan, Germany; 30 s at 30 beats. s^{-1}). The homogenates were centrifuged at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 min and 15,000 RPM for CAT and SOD, and for 15 min at 3000 RPM for GST. CAT activity was measured in supernatants as the decomposition of H_2O_2 in a 50 mMol l^{-1} KPi buffer, as described by Aebi (1984). SOD activity was registered by cytochrome oxidase assay following the protocol described by McCord and Fridovich (1969) and modified by Livingstone et al. (1992). GST activity was assessed using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 1 mM in ethanol (Habig et al. 1974). All measurements were carried out using a microplate reader at room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Crude enzyme extracts were maintained on ice throughout all procedures to ensure continued enzyme activity. Results were expressed as UCAT, USOD, and mUGST per milligram of proteins per gram of individual. All measurements were carried out in triplicate and were expressed per milligram of protein, measured using bovine serum albumin (BSA) as a standard, as described by Bradford (1976).

Assessment of digestive enzyme activity

Digestive enzyme activities were measured spectrophotometrically in hepatopancreas samples. All samples (50–100 mg) were diluted in 500 μl milli-Q water. Tissue homogenization was achieved using stainless steel milling balls (Retsch, no. FR0120) in a Mixer Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Germany; 30 s at 30 beats. s^{-1}). The homogenate was

centrifuged for 12 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 15,000 RPM to eliminate lipids and other tissue debris, and the supernatant containing digestive enzyme proteins was collected and stored in aliquots at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

To determine the suitable pH for the analysis of alkaline digestive enzymes, an assay was carried out using different pH levels ranging from 7 to 9, as described by García-Carreño et al. (1994). Azocasein 0.5% w/v was used as a substrate.

Proteinase activity was determined as the hydrolysis of azocasein, as described by García-Carreño et al. (1994) and modified by Saborowski and Buchholz (1999). The reaction mixture contained 20 μl of the enzymatic extract, 250 μl of 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0, and 250 μl of 0.5% w/v azocasein in 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0 as a substrate. The reaction mixture was incubated in triplicate for 15 min at room temperature in three 2-ml Eppendorf tubes. The reaction was stopped by adding 500 μl of 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and cooling on ice for 10 min. The undigested substrate was separated by centrifugation for 5 min at 10,000 RPM. The absorbance of the supernatant was measured in triplicate at 366 nm in a microplate with 300 μl of the reaction mixture against distilled water. Control assays (blanks) were prepared by adding TCA before the substrate. Enzyme activity was expressed as the change in absorbance per minute per milligram of protein (activity units = $\Delta\text{Abs}_{366}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein), where proteins were quantified as described above.

Trypsin specific activity was measured using Na-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA: B4875; Sigma-Aldrich) as a synthetic substrate following García-Carreño et al. (1994). Enzyme extracts (50 μl) were placed in a microplate well with 250 μl of 1.2 mM of the substrate in a 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, containing 10 mM calcium chloride. The absorbance at 405 nm was recorded every 5 min for half an hour at $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a microplate reader. Specific activity was expressed as the change in absorbance per minute per milligram of protein.

Chymotrypsin specific activity was measured with 50 μl of enzyme extract placed in a microplate well with 250 μl of 0.1 mM succinyl-L-Ala-Ala-Pro-L-Phe-p-nitroanilide (SAPNA, S7388, Sigma-Aldrich) in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 10 mM calcium chloride. During substrate hydrolysis, the reporter p-nitroaniline was liberated and read at 405 nm every 5 min for half an hour at $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a microplate reader. Specific activity was calculated as described for trypsin activity. All assays were done in triplicate.

Histological and SEM analysis

Fixed hepatopancreas samples were rinsed in 70% ethanol and were then dehydrated in a series of graded alcohols and

embedded in paraffin. Sections measuring 4 μm were cut with a Leitz Wetzlar microtome, then placed on poly-L-lysine-precoated glass slides, deparaffinated, and stained following Masson's Trichrome Staining Protocol (Martoja and Martoja-Pierson 1967). Samples were then examined using an Olympus BX60 microscope equipped with a Jenoptik (ProgRes C3) digital camera and the associated software CapturePro v2.8.8 (Jenoptik Optical Systems GmbH, Jana, Germany). For each individual, seven to ten photographs were taken from different sections of the slide, each depicting 1 to 5 tubules. The number of tubules depicted on each photograph depends on the individual morphology of hepatopancreas. The photographs were scaled and analyzed using ImageJ software (version 1.51r), and eight images of hepatopancreas tubules were randomly selected for each individual.

Four parameters were measured on each of the tubules and then averaged for each individual ($n = 4\text{--}7$): the area of the tubules, the area of the B-cell vacuoles, the percentage of B-cell vacuolization area per tubule, and the number of vacuoles per tubule.

Fixed samples were cut in smaller pieces, dehydrated, and embedded in Araldite 502 resin (EMS) for use in electron scanning microscopy. Semi-thin ($>1.5 \mu\text{m}$) sections were obtained using a Leitz Wetzlar microtome and placed on poly-L-lysine-coated slides. These sections were stained with toluidine blue and then observed with an Olympus BX60 microscope to identify the position of the area of interest. After ultramicrotomy, residual epoxy block faces were used for in situ elemental analyses with an environmental scanning electron microscope (ESEM) coupled with EDX mode, as described by Laue et al. (2005).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed in R version 3.5.2 with Rstudio version 0.99.491 (Rstudio, Inc). Normality was tested using the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance using Bartlett's test. For antioxidant enzyme activity, digestive enzyme activity, hepatopancreas tubule areas, number of vacuoles per tubule, % of vacuolization per tubule, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test the null hypothesis of no difference between treatments (C, N, WW). ANOVAs were followed by Tukey's HSD post hoc tests.

For B-cell vacuole area measurements, a Kruskal-Wallis test was performed to test the null hypothesis of no difference between treatments (C, N, WW), as data did not meet the assumptions of normality and homogeneity of variance after log transformation.

An α -level of 0.05 and 95% confidence intervals were used to determine statistical significance in all tests. All values are represented as mean \pm SEM.

Results

Antioxidant defense

No significant difference in SOD and CAT activity in the hepatopancreas (Fig. 1A, B) was evident between the different treatments (SOD: one-way ANOVA, $F(2,21) = 0.36$, $p = 0.702$; CAT: one-way ANOVA, $F(2,23) = 1.312$, $p = 0.289$). However, a difference was evident for GST activity (Fig. 3C, one-way ANOVA, $F(2,23) = 3.769$, $p = 0.039$), which was lower in crabs exposed to WW than in those exposed to ammonia-N.

Digestive enzyme activity

Protease activity was not significantly different among treatments (Fig. 2A: one-way ANOVA, $F(2,22) = 1.687$, $p = 0.208$). Similarly, trypsin and chymotrypsin activities (Fig. 2B, C) were not significantly impacted by WW or ammonia-N exposure compared to the control (Trypsin: one-way ANOVA, $F(2,25) = 1.12$, $p = 0.342$, Chymotrypsin: one-way ANOVA, $F(2,25) = 0.652$, $p = 0.529$).

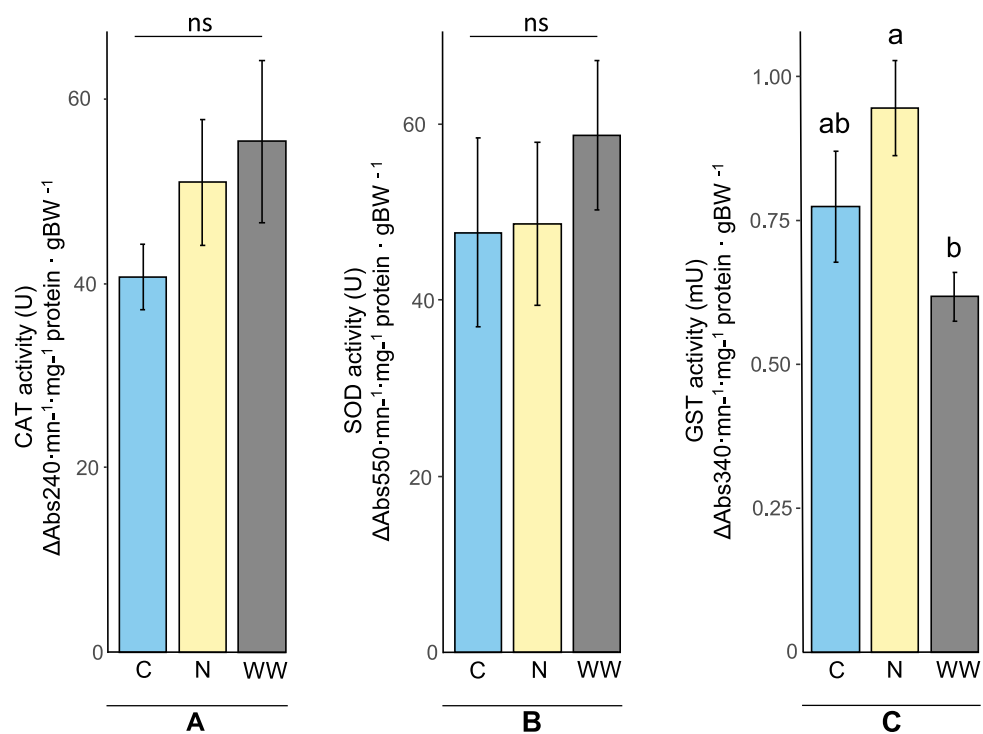
Histological analyses

The histology of the three main cell types of the hepatopancreas tubules of *N. africanum* is presented in Fig. 3E: (1) R-cells (Restzellen, resorptive cells), the most abundant cell type in the hepatopancreas; (2) F-cells (Fibrillenzellen, fibrillar cells), which have a columnar shape and basophilic cytoplasm with an intense staining; (3) mature B-cells (Blasenzellen, blister-like cells), which are the largest cells showing large subapical vacuoles.

Exposure to WW significantly impacted the area of the hepatopancreas tubules. The tubule area in crabs exposed to WW is twice that of tubules in control crabs, lumen included (Fig. 3A: one-way ANOVA $F(2,13) = 7.708$, $p = 0.0062$). B-cell vacuoles are also wider in crabs exposed to WW, although the difference between treatments is not statistically significant (Fig. 3B: Kruskal-Wallis test, $H = 5.8713$, $df = 2$, $p = 0.053$). The number of vacuoles in each tubule is almost doubled for crabs exposed to WW compared to the number observed in control crabs (Fig. 3C: one-way ANOVA $F(2,13) = 5.462$, $p = 0.019$). Finally, the percentage of vacuolization per tubule is also significantly higher in crabs exposed to WW compared to control crabs (Fig. 3D: one-way ANOVA $F(2,13) = 5.804$, $p = 0.0158$).

Electron microscopy analysis (Fig. 4) shows the variation of dense material contained in B-cell vacuoles between the different hepatopancreas samples (A, B). Lipid droplets (A: ld) can also be seen and are mostly present in the R-cells, varying in number between the different individuals. EDX

Fig. 1 Antioxidant defenses in the hepatopancreas of *N. africanum* exposed to freshwater (C), 10 mg·L⁻¹ ammonia-N (N), and wastewater (WW). **A:** CAT activity in mg prot⁻¹ gBW⁻¹; **B:** SOD activity in mg prot⁻¹ gBW⁻¹; **C:** GST activity in mg prot⁻¹ gBW⁻¹. Values are means ± SEM (N = 9–10 per treatment). Different letters represent statistically significant differences at *p* < 0.05. ns: not significant (*p* ≥ 0.05). Results were obtained from a one-way ANOVA

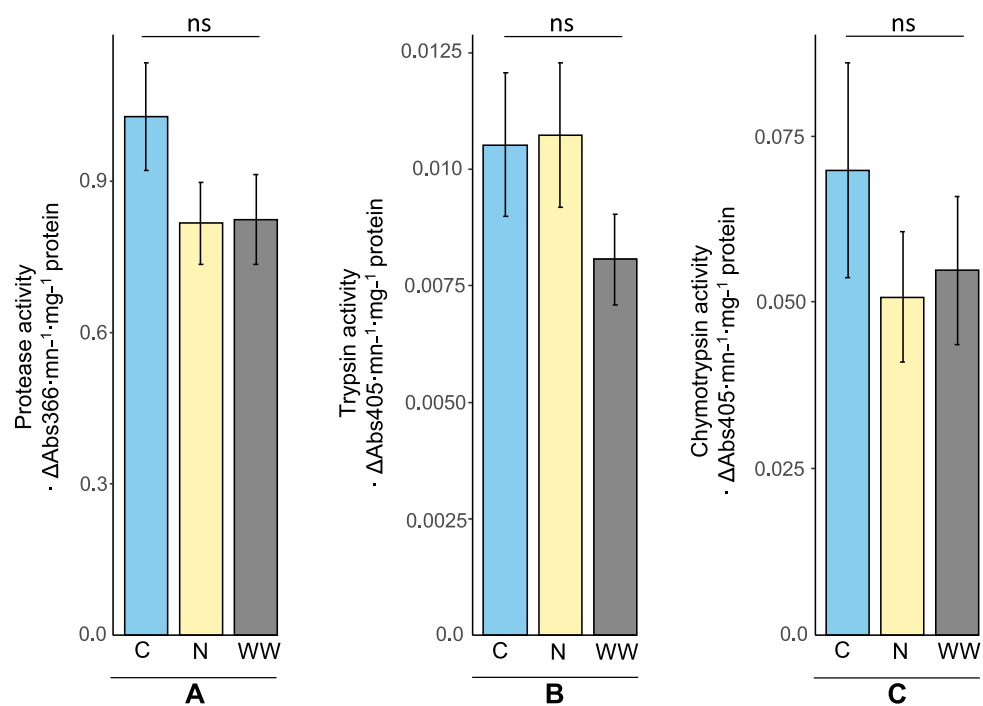


aimed to characterize the content of the electron-dense material. No trace of metallic elements was detected in the B-cell vacuoles for any crabs exposed to FW, ammonia-N, and WW. A higher percentage of sulfur (S) was detected in WW exposed individuals (qualitative data, not shown).

Discussion

As discussed above, pollutants can enter the body of a crustacean through the integument, by the way of the gills, or through the gut after food consumption (Ahearn et al. 2004).

Fig. 2 Activity of digestive enzymes in *N. africanum* exposed to freshwater (C), 10 mg·L⁻¹ ammonia-N (N), and wastewater (WW). **A:** Protease activity in mg prot⁻¹; **B:** Trypsin activity in mg prot⁻¹; **C:** Chymotrypsin activity in mg prot⁻¹. Values are means ± SEM (N = 9–10 per treatment). ns: not significant (*p* ≥ 0.05). Results obtained from a one-way ANOVA



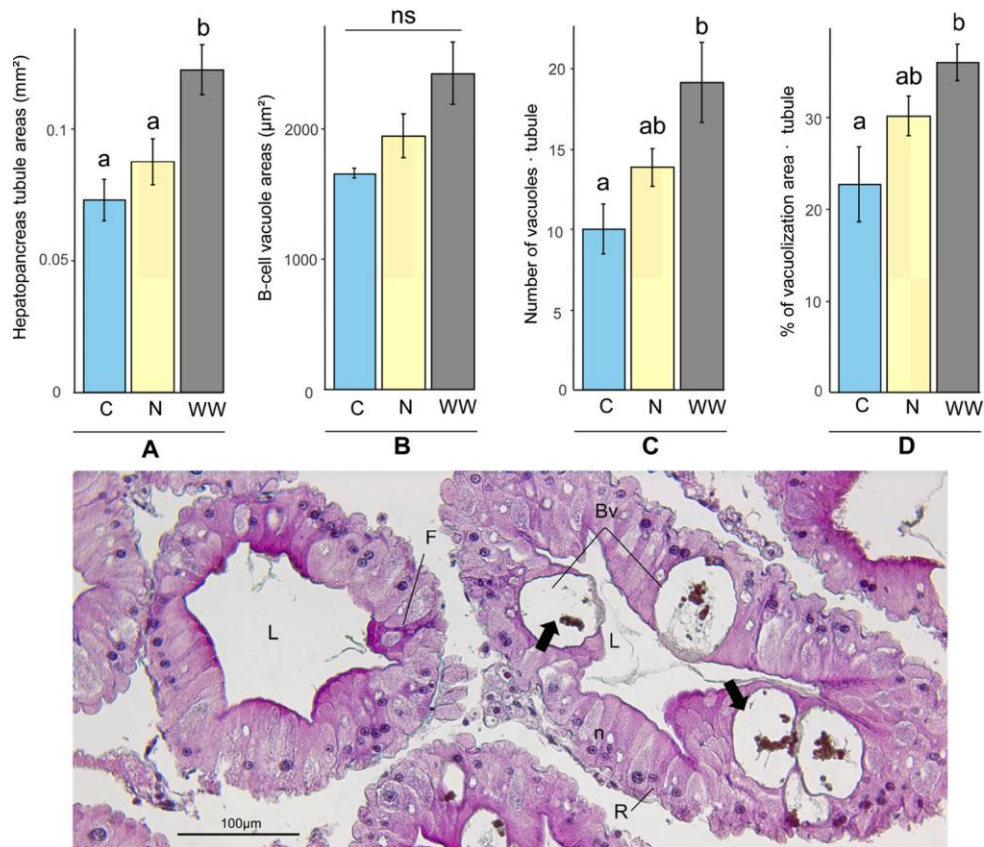


Fig. 3 Histological analyses from transverse sections of different tubules of *N. africanum* hepatopancreas exposed to freshwater (C), 10 mg·L⁻¹ ammonia-N (N), and wastewater (WW). Measurements and counts were carried out on 8 randomly distributed tubules per individual. Data were averaged per individual. **A:** Areas of the tubules expressed as mean per individual; **B:** B-cell vacuole areas expressed as mean per tubule per individual; **C:** number of B-cell vacuoles in the tubule; **D:** % of B-cell vacuolization area per tubule; **E:** optic microscopy illustration of a

transverse section. The image shows tubules containing absorbing R-cells (R), enzyme synthesizing F-cells (F), and tubule-clearing B-cells (Bv) containing dense granules (unlabelled arrows), lumen (L), nucleus (n), and intertubular space (I). Values are means ± SEM (N = 4–7 per treatment). Different letters represent statistically significant differences at *p* < 0.05. ns: not significant (*p* ≥ 0.05). Results obtained from a one-way ANOVA for **A**, **C**, **D** and a Kruskal-Wallis test for **B**

Within the digestive system, the hepatopancreas are known to be a sensitive organ involved in various complementary functions. The morphological and functional changes that occur in this digestive organ due to pollution can be used as an indicator for the metabolic or nutritional state of crustaceans (Al-Mohanna and Nott 1989; Bautista et al. 1994; Rosas et al. 1995; Li et al. 2008; Dedourge-Geffard et al. 2013).

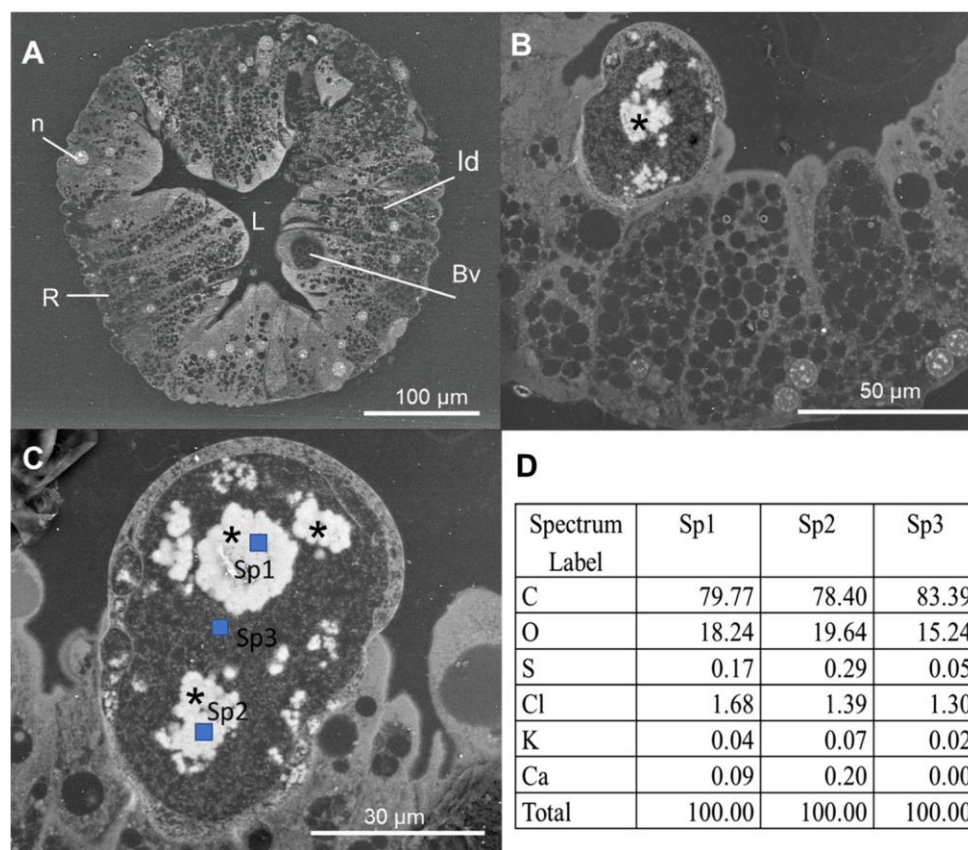
Short-term exposure to WW does not impact antioxidant defense or extracellular digestion

Crabs, like other organisms, may react to pollutant exposure by increasing reactive oxygen species (ROS) formation, which affects redox homeostasis and alters antioxidant defense systems such as CAT, SOD, and GST activities (Rodrigues and Pardal 2014; Theuerkauff et al. 2018a). CAT and SOD play a role in scavenging the excess ROS in aquatic animals (Correia et al. 2003). SOD scavenges the superoxide radical (O₂⁻) by converting it into hydrogen peroxide

(H₂O₂), and CAT reduces H₂O₂ to water and oxygen (Sies 1997). In the present study, no effect on the activity of these antioxidant enzymes was detected in *N. africanum* exposed to WW or ammonia-N. However, a significant increase in GST activity in individuals exposed to ammonia-N was observed when compared to crabs exposed to WW. This is coherent given that GST plays a major role in xenobiotic alteration via conjugation with glutathione (GSH) (Lesser 2006) and that the hepatopancreas is an important site for xenobiotic detoxification, showing higher GST levels expressed than in other organs or in haemolymph (Wang et al. 2008; van Oosterom et al. 2010). The cocktail of pollutants in WW can be highly variable, with the abundance of xenobiotics and their concentrations depending on the weather and season.

These results show that the detoxifying function of *N. africanum* is not impacted after short-term exposure to WW and ammonia-N. However, the analysis of ROS formation on cell homeostasis, through the assessment of oxidative damages (i.e. the end products of eventual lipid peroxidation

Fig. 4 SEM transverse sections of different tubules of *N. africanum* hepatopancreas where the elemental composition of the B-cells was determined through EDX analysis. **A:** Complete tubule of hepatopancreas showing R-cells (R), lipid droplet (ld), lumen (L), nucleus (n); **B:** B-cell vacuole areas; **B,C:** Focus on B-cell vacuoles and the electron-dense material (EDM) granules (*); **D:** Composition (%) of two electron-dense materials (sp1, sp2) and the inner part of a B-cell vacuole without material (sp3)



or protein carbonylation), would be suitable to complete the antioxidant balance analysis. As mentioned above, the presence of pollutants in the digestive tract and hepatopancreas may also affect extracellular digestion and subsequently, nutrient assimilation, with therefore, deleterious effects on energy storage. Proteolytic enzymes, and particularly enzymes of the trypsin group, typically play a key role in physiological processes such as protein hydrolysis (Delcroix et al. 2006; Liu et al. 2009). Enzyme activity quantification thus allows the assessment of an animal digestive efficiency and its capacity to assimilate nutrients. The latter physiological process provides the essential energy for organisms exposed to variable environments. In our study, crabs exposed to FW, WW, or ammonia-N had to deal with an abrupt change in environmental salinity (from 35 ppt to 0.5 ppt in the control). This change induces a physiological switch from hypo- to hyperosmoregulation (Theuerkauff et al. 2018b). Extremely low salinity (3 ppt) may lead to a significant increase in trypsin activity in crustaceans, such as prawns (*Litopenaeus vannamei*) (Li et al. 2008). The authors suggest that the resulting extra food energy may compensate for the energy loss/expenditure associated with osmoregulation. Thus, exposure to pollutants coupled with a salinity change may force individuals to increase their energy requirements for their detoxification pathways while continuing to maintain their basal metabolism.

In our study, short-term exposure to 5 ppt WW or ammonia-N did not affect energy intake or nutrient assimilation by *N. africanum*, even though a slight decrease in trypsin and chymotrypsin activity was evident. Two hypotheses could explain these results. First, as already mentioned, *N. africanum* is a strong hyper-hypo osmoregulator over a wide range of salinities (Theuerkauff et al. 2018b). However, the physiological switch from hypo- to hyperosmoregulation may not immediately require additional energy and may even involve a decrease in O_2 consumption when animals are transferred from SW to low salinities for 5 h. While this 5-h period is ecologically relevant for intertidal species living in mangroves, it is relatively short compared to laboratory exposure times commonly used to study the effects of pollutants on crustacean digestive enzymes (De Coen et al. 2000a; Seebaugh et al. 2011). Crabs are chronically exposed to WW in mangroves, but the regular tides may induce a “washing” effect of the pollutants. Therefore, it would be interesting to study temporal patterns such as circatidal rhythms in *N. africanum* through longer exposure times and inundation periods.

Secondly, sesamid leaf-eating crabs are known to be physiologically adapted to long-term consumption of mangrove litter with low essential nutrients, although an opportunistic feeding behavior is also reported (i.e., feeding on animal tissues and sediment) (Giddins et al. 1986; Micheli et al. 1991;

Harada and Lee 2016). This feeding plasticity may involve important digestive enzyme diversity and availability that allow both high and low nutrient assimilation capabilities. This flexibility may explain the absence of an effect after 5-h exposure to WW or ammonia-N.

Functional histology of B-cells: increased vacuolization process, an indicator of higher intracellular digestion?

Studying the different cell types that are present in the hepatopancreas allows a better understanding on different digestive steps, and the precise functions of the organ that may be impacted by pollutants. It should be noted that the functionality of the different cell types present in the hepatopancreas is the subject of debate, especially the role of B-cells (reviewed in Vogt 2019). Digestive enzymes, such as trypsin and chymotrypsin, are produced by fibrillar F-cells (see Fig. 3E) and are mainly involved in extracellular digestion through the role they play in catalyzing the extracellular hydrolysis of macromolecules in the proventriculus and lumen of the hepatopancreas (Gibson and Barker 1979; Seebaugh et al. 2011). Trypsin and chymotrypsin are not produced or stored by B-cells (Vogt et al. 1989; Van Wormhoudt et al. 1995; Lehnert and Johnson 2002), indicating that these cells must be involved at a different step in the digestive cycle. B-cells can be considered to have two functions: elimination of waste material and intracellular digestion of nutrients (Vogt 1994), making them interesting to study regarding the hypothesis of our work. The supranuclear vacuoles resulting from the coalescence of subapical vacuoles take the form of huge lysosomes (Vogt 1993), and their content can be discharged into the lumen by holocrine secretion (Nott et al. 1985). This process is illustrated in Fig. 3E, as the two upper vacuoles of the second tubule are totally detached from the basal lamina. The neighboring cells produce basolateral extensions beneath the B-cells: these extensions will expel the B-cells into the tubule lumen through a process called holocrine secretion, then, close the gap created in the epithelium.

In crustaceans contaminated with different metals, these large vacuoles contain an electron-dense material containing varying amounts of metallic elements (Nunez-Nogueira et al. 2006). However, these observations do not necessarily indicate a regular detoxification mechanism through B-cells (Vogt 2019), and for crabs exposed to WW in our study, no trace of metallic elements could be detected in the vacuoles. Nevertheless, B-cells also synthesize proteins, absorb some material from the tubular lumen, and manage the accumulation, storage, and discharge of any material remaining in the vacuole into the lumen (Vogt 2019).

Contrary to crabs transferred from SW to FW, short-term exposure (5 h) of *N. africanum* from SW to WW induced tubule enlargement, an increase in the number and size of

vacuoles in B-cells, and a higher percentage of vacuolization per tubule. These changes indicate a higher activity in B-cell-specific intracellular digestion.

Similarly, some studies have revealed that crustaceans react to thermal stress or pollutant exposure (cadmium) by an increase in the vacuolization process, suggesting either an adaptation to cold stress through a higher enzyme synthesizing process or an increase of excretion activity involved in the detoxification process (Sreeram and Menon 2005; Das et al. 2019; de Melo et al. 2019). As shown in *P. monodon*, a lipid-rich diet also seems to widen the B-cell vacuoles, which could indicate an involvement of B-cells in the digestion of lipids (Vogt 2019). According to the literature, it is plausible that WW contains higher concentrations of oil and fats, 51–81% of which could be lipids (Raunkjær et al. 1994; Ravndal et al. 2018). This composition may also explain the changes we found in the B-cell vacuoles of crabs exposed to WW.

Therefore, regarding the increase in intracellular digestion in crabs exposed to WW, we consider that the digestive enzymes that are mostly affected by WW are those involved in acidic conditions. Lysosome-like B-cell vacuoles have an acidic content and are rich in lysosomal enzymes (Martínez-Alarcón et al. 2018). In our study, trypsin and chymotrypsin activities have been analyzed at pH 8 and were not affected, as mentioned above (Fig. 2A, B, C). Therefore, it would be relevant to study digestive enzymes that work also in acidic pH, such as aspartic endopeptidase cathepsin D, that have been previously described in other Decapod crustaceans (Martínez-Alarcón et al. 2018).

These changes in digestion activity may require more energy and may alter the aforementioned functions of the hepatopancreas through the different digestive processes, inducing compromises in the individual allocation of resources. These potential physiological trade-offs, along with those already described for the gills, could reflect an integrated metabolic response.

From cellular level effects to ecological relevance: an overview considering both gills and hepatopancreas

The gills and the hepatopancreas are two of the main metabolic organs of crustaceans, involved in multiple functions. These highly plastic organs allow crustaceans to tolerate wide environmental changes. This physiological flexibility combined with behavioral plasticity induces habitat-specific acclimations to environmental changes, driving the spatial and temporal distribution patterns of crustaceans (Hoffmann and Hercus 2000; Sherman 2015; Fusi et al. 2017).

The semi-terrestrial crab *N. africanum* possesses multi-functional gills that are involved in respiratory gas exchange, acid-base balance regulation, osmoregulatory ion transport, and are also the main site for ammonia-N excretion (reviewed by Weihrauch et al. 2004).

When exposed to WW, both the gills and hepatopancreas of *N. africanum* appear to maintain redox homeostasis, thus avoiding oxidative damage (Theuerkauff et al. 2018a). WW exposure showed no morphological changes along the epithelium of the anterior gill lamellae involved in respiratory function but revealed NKA activity loss in the posterior gills involved in osmoregulatory function, coupled with a decrease in epithelial thickness (Theuerkauff et al. 2018a). Ammonia-N, the major component of the WW used for the study (see Table 1), is known to affect decapod crustaceans by disrupting ionoregulatory function and damaging gill gas exchange mechanisms (De Freitas Rebelo et al. 2000), mostly through increased gill NKA activity (Garçon et al. 2007; Ren et al. 2015). Barbieri (2010) and Barbieri et al. (2016) also showed that water with 5 mg·L⁻¹ ammonia-N would cause increasing oxygen consumption of the shrimp *L. schmitti* after only 3 h of exposure and that ammonia-N toxicity increased with low salinities. The major metabolic effect of WW exposure was a sudden and rapid increase in the global respiration rate, which is most likely due to the impossibility of maintaining a functional and morphological gill organization, thus leading to an acute increase in metabolic demand. The results of the present study complete previous analyses: the extra energy likely allocated to the increasing intracellular digestive activity of the B-cells may be added to the underlying physiological challenges that increase O₂ demand, thus maintaining both digestive and osmoregulatory function through short-term physiological plasticity.

Recent integrative frameworks consider that the vulnerability of species to environmental changes depends on their capacity to individually adapt their physiology and behavior in response to the changes they experience (Fusi et al. 2017; Williams et al. 2008; Huey et al. 2012; Rezende et al. 2014). However, extreme care should be taken when attempting to link a toxicological approach at the sub-cellular level to an ecological understanding at the community scale. It involves multiple levels of integration through different temporalities: effects occurring at a lower scale may be detected earlier and will ultimately affect higher levels (De Coen et al. 2000). Also, the extrapolation of effects between different levels of biological organization must involve a “currency” that links the different levels and shows which lower-level effects might predict the direct consequences of biomarker responses for the individual or population (Hastings and Higgins 1994; Munkittrick and McCarty 1995). Energy metabolism is one of the most commonly used markers to describe these hierarchical transfers. By studying different integration levels of the potential energy compromises induced by WW exposure, we improve our understanding regarding why the global metabolic rate of individuals increases in laboratory condition after short-time exposure, when behavioral plasticity (e.g., hide or escape) is not allowed. Encaged crabs forced to remain in artificial burrows in the impacted area of the Malamani

mangrove for 3 weeks also showed osmoregulatory and redox disturbances (Theuerkauff et al. 2020). These negative effects probably explain the decreasing density of crab burrows mentioned in the same study and the decreased abundance of this species in the impacted areas, as described by Capdeville et al. (2018). These responses could possibly indicate that crabs have reached the limits of their physiological plasticity: they either stop allocating as much energy to burrowing activity, or they escape to avoid the discharge area, the latter being a more drastic change in survival strategy.

Conclusion

We propose that the physiological responses of *N. africanum* crabs exposed to WW could at least, partially, explain the decrease in abundance observed for this species in WW-impacted areas of the mangrove in the Malamani experimental site. The short-term exposure of *N. africanum* to WW induces limited impacts on the detoxification and extracellular digestion functioning within the hepatopancreas. However, the increased intracellular digestion observed through the proliferation of vacuoles in the B-cell could introduce new energy compromises in addition to those induced with gill functioning impairments. Complementary studies using metabolic markers, respiration rates, and behavioral traits would be helpful. It would be useful also to gain a better understanding of the toxicity mechanisms of WW effluent on Ocypodidae crab species (showing population decreases or even disappearances in WW-impacted areas) (Capdeville et al. 2018) since ammonia-N exposure alone has limited or no impact on the hepatopancreas functioning. Different environmental conditions can affect the toxicity of pollutants and modify the response of organisms to pollutants (Barbieri and Doi 2011; Santos et al. 2014). Notably, it is crucial to determine if water oxygenation (often decreased in WW) has an impact on how pollutants in WW affect crab physiology.

Acknowledgements The authors are thankful to the Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte (SIEAM), and especially to Kissimati Abdallah for her help in the field.

Author contribution ES, JHL, and GR contributed to the study conceptualization and design, and supervised the research. Experimental design, material preparation, and data collection were performed by DT. DT and LM performed the assessment of antioxidant enzyme activities. DM performed the assessment of digestive enzymes activities and the pretreatment of the outcome data. ML realized the cut sections and staining of the hepatopancreas tubules. LM analyzed the histological sections and the outcomes of the antioxidant enzymes activities and realized the statistical analyses of the manuscript dataset. The first draft of the manuscript was written by LM, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declarations

Ethics approval and consent to participate No approval of research ethics committees was required to accomplish the goals of this study because experimental work was conducted with an unregulated invertebrate species.

Consent for publication Not applicable.

Availability of data and materials The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aheam GA, Mandal PK, Mandal A (2004) Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 174. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0438-0>
- Al-Mohanna SY, Nott JA (1989) Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Mar Biol* 101:535–544. <https://doi.org/10.1007/BF00541656>
- Amaral V, Penha-Lopes G, Paula J (2009) Effects of vegetation and sewage load on mangrove crab condition using experimental mesocosms. *Estuar Coast Shelf Sci* 84:300–304. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.07.007>
- Andreotta A, Fusi M, Cameldi I, Cimò F, Carnicelli S, Cannicci S (2014) Mangrove carbon sink. Do burrowing crabs contribute to sediment carbon storage? Evidence from a Kenyan mangrove system. *J Sea Res* 85:524–533. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.08.010>
- Barbieri E (2010) Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture* 306:329–333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.009>
- Barbieri E, Doi SA (2011) The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the Pink Shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*). *Mar Freshw Behav Physiol* 44:251–263. <https://doi.org/10.1080/10236244.2011.617606>
- Barbieri E, Bondioli ACV, de Melo CB, Henriques MB (2016) Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquac Res* 47:1260–1268. <https://doi.org/10.1111/are.12583>
- Bautista MN, Lavilla-Pitogo CR, Subosa PF, Begino ET (1994) Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon*. *J Sci Food Agric* 65:5–11. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650103>
- Bermudes M, Ritar AJ (2008) Tolerance for ammonia in early stage spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosoma larvae. *J Crustac Biol* 28:695–699. <https://doi.org/10.1651/08-2994.1>
- Berti R, Cannicci S, Fabbroni S, Innocenti G (2008) Notes on the structure and the use of *Neosarmatium meinerti* and *Cardisoma carnifex* burrows in a Kenyan mangrove swamp (Decapoda brachyura). *Ethol Ecol Evol* 20:101–113. <https://doi.org/10.1080/08927014.2008.9522531>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bright DB, Hogue CL (1972) A synopsis of the burrowing land crabs of the world and list of their arthropod symbionts and burrow associates. *Contrib Sci* 220:60
- Cannicci S, Burrows D, Fratini S, Smith TJ, Offenberg J, Dahdouh-Guebas F (2008) Faunal impact on vegetation structure and ecosystem function in mangrove forests: a review. *Aquat Bot* 89:186–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.01.009>
- Cannicci S, Bartolini F, Dahdouh-Guebas F, Fratini S, Litolo C, Macia A, Mrabu EJ, Penha-Lopes G, Paula J (2009) Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. *Estuar Coast Shelf Sci* 84:305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.021>
- Capdeville C (2018) Evaluation des capacités de résistance et de résilience de l'écosystème mangrove en réponse à des apports d'eaux usées domestiques prétraitées, PHD Toulouse Université Paul Sabatier
- Capdeville C, Abdallah K, Buffan-Dubau E, Lin C, Azemar F, Lambs L, Fromard F, Rols JL, Leflaive J (2018) Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. *Mar Pollut Bull* 129:379–391. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.035>
- Capdeville C, Abdallah K, Walcker R, Rols JL, Fromard F, Leflaive J (2019) Contrasted resistance and resilience of two mangrove forests after exposure to long-term and short-term anthropic disturbances. *Mar Environ Res* 146:12–23. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.03.002>
- Ceccaldi HJ (1998) A synopsis of the morphology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. *Rev Fish Sci* 6:13–39. <https://doi.org/10.1080/10641269891314177>
- Chapman MG, Tolhurst TJ (2004) The relationship between invertebrate assemblages and bio-dependant properties of sediment in urbanized temperate mangrove forests. *J Exp Mar Biol Ecol* 304:51–73. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.11.019>
- Clough BF, Boto KG, Attiwill PM (1983) Mangroves and sewage: a re-evaluation. Springer, Dordrecht, pp 151–161. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0914-9_17
- Copeland DE, Fitzjarrell AT (1968) The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* rathbun) with notes on modified mitochondria. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 92:1–22. <https://doi.org/10.1007/BF00339398>
- Correia, A.D., Costa, M.H., Luis, O.J., Livingstone, D.R., 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea : Amphipoda) 289, 83–101. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00040-6)
- Dall W, Moriarty DJW (1983) Functional aspects of nutrition and digestion. In: Mantel LH (ed) *The biology of Crustacea*. Vol. 5. Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press, New York, pp 215–216 <http://hdl.handle.net/102.100.100/286167?index=1>
- Das S, Tseng LC, Chou C, Wang L, Souissi S, Hwang JS (2019) Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the mud shrimp *Austinoergia edulis* (Crustacea: Decapoda). *Environ Sci Pollut Res* 26:7752–7762. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-04113-x>
- De Coen WM, Janssen CR, Giesy JP (2000) Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. *New Microbiotests Routine Toxic Screen Biomonitoring*:13–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4289-6_2
- De Freitas Rebelo M, Rodriguez EM, Santos EA, Ansaldo M (2000) Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp Biochem Physiol - C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 125:157–164. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00093-6)

- de Melo MS, dos Santos TPG, Jaramillo M, Nezzi L, Rauh Muller YM, Nazari EM (2019) Histopathological and ultrastructural indices for the assessment of glyphosate-based herbicide cytotoxicity in decapod crustacean hepatopancreas. *Aquat Toxicol* 210:207–214. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.007>
- Dedourge-Geffard O, Charron L, Hofbauer C, Gaillet V, Palais F, Lacaze E, Geffard A, Geffard O (2013) Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 97:139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.016>
- Delcroix M, Sajid M, Caffrey CR, Lim KC, Dvořák J, Hsieh I, Bahgat M, Dissous C, McKerrow JH (2006) A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J Biol Chem* 281:39316–39329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607128200>
- Dittmann S (1996) Effects of macrobenthic burrows on infaunal communities in tropical tidal flats. *Mar Ecol Prog Ser* 134:119–130. <https://doi.org/10.3354/meps134119>
- Fusi M, Babbini S, Giomi F, Fratini S, Daniele FD, Christopher D, Mcquaid D, Porri F, Cannicci S (2017) Thermal sensitivity of the crab *Neosarmatium africanum* in tropical and temperate mangroves on the east coast of Africa. *Hydrobiologia*. 803:251–263. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3151-1>
- García-Carreño FL, Hernández-Cortés MP, Haard NF (1994) Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *J Agric Food Chem* 42:1456–1461. <https://doi.org/10.1021/jf00043a013>
- Garçon DP, Masui DC, Mantelatto FLM, McNamara JC, Furriel RPM, Leone FA (2007) K^+ and NH_4^+ modulate gill (Na^+ , K^+)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: fine tuning of ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 147:145–155. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.020>
- Gibson R, Barker PL (1979) The decapod hepatopancreas. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 17:285–346
- Giddins RL, Lucas JS, Neilson MJ, Richards GN (1986) Feeding ecology of the mangrove crab *Neosarmatium smithi* (Crustacea: Decapoda: Sesamidae). *Mar Ecol Prog Ser* 33:147e155
- Gillikin DP, de Grave S, Tack JF (2003) The occurrence of the semi-terrestrial shrimp *Merguia oligodon* (De Man, 1888) in *Neosarmatium smithi* H. Milne Edwards, 1853 burrows in Kenyan mangroves. *Crustaceana* 74:505–507. <https://doi.org/10.1163/156854001750243081>
- Gross WJ, Lasiewski RC, Dennis M, Rudy P (1966) Salt and water balance in selected crabs of Madagascar. *Comp Biochem Physiol* 17:641–660. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(66\)90594-9](https://doi.org/10.1016/0010-406X(66)90594-9)
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Harada Y, Lee SY (2016) Foraging behavior of the mangrove sesamid crab *Neosarmatium trispinosum* enhances food intake and nutrient retention in a low-quality food environment. *Estuar Coast Shelf Sci* 174:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.03.017>
- Hastings A, Higgins K (1994) Persistence of transients in spatially structured ecological models. *Science* 263:1133–1136. <https://doi.org/10.1126/science.263.5150.1133>
- Haywood GP (1983) Ammonia toxicity in teleost fishes: a review. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences
- Herteman M (2010) Evaluation des capacités bioremédiatrices d'une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. PHD Toulouse Université Paul Sabatier
- Hoffmann AA, Hercus MJ (2000) Environmental stress as an evolutionary force. *Bioscience* 50:217–226
- Hogarth PJ (2015) The biology of mangroves and seagrasses, 3rd edn. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198716549.001.0001>
- Huey RB, Kearney MR, Krockenberger A, Holtum JAM, Jess M, Williams SE (2012) Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367:1665–1679
- Jeanson M, Dolique F, Anthony EJ, Aubry A (2019) Decadal-scale dynamics and morphological evolution of mangroves and beaches in a reef-lagoon complex, Mayotte Island. *J Coast Res* 88:195–208. <https://doi.org/10.2112/SI88-015.1>
- Kristensen E (2008) Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J Sea Res* 59:30–43. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.004>
- Laue M, Kiefer G, Leis B, Pütz N, Mestres P (2005) Use of environmental scanning electron microscopy to study a resin block face. *Microsc Anal* 19:17–19
- Lee SY (1997) Potential trophic importance of the faecal material of the mangrove sesarmin crab *Sesarma messa*. *Mar Ecol Prog Ser* 159:275–284. <https://doi.org/10.3354/meps159275>
- Lee SY (2008) Mangrove macrobenthos: assemblages, services, and linkages. *J Sea Res* 59:16–29. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.002>
- Lehnert SA, Johnson SE (2002) Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 133:163–171. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00123-9)
- Lemarié G, Dosdat A, Covès D, Dutto G, Gasset E, Person-Le Ruyet J (2004) Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 229:479–491. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00392-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00392-2)
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68:253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Li E, Chen L, Zeng C, Yu N, Xiong Z, Chen X, Qin JG (2008) Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture* 274:80–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.001>
- Liu Y, Sui YP, Wang JX, Zhao XF (2009) Characterization of the trypsin-like protease (Ha-TLP2) constitutively expressed in the integument of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Arch Insect Biochem Physiol* 72:74–87. <https://doi.org/10.1002/arch.20324>
- Livingstone DR, Lips F, Martinez PG, Pipe RK (1992) Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 112:265–276. <https://doi.org/10.1007/BF00702471>
- Macnae W, Kalk M (1962) The ecology of the mangrove swamps at Inhaca Island, Mocambique. *J Ecol* 50:19. <https://doi.org/10.2307/2257188>
- Martínez-Alarcón D, Saborowski R, Rojo-Arreola L, García-Carreño F (2018) Is digestive cathepsin D the rule in decapod crustaceans? *Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol* 215:31–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.09.006>
- Martoja R, Martoja-Pierson M (1967) Initiation aux techniques de l'histologie animale. Eds Masson cie, Paris, p 343
- McCord JM, Fridovich I (1969) An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049–6055
- Micheli F, Gherardi F, Vannini M (1991) Feeding and burrowing ecology of two East African mangrove crabs. *Mar Biol* 111:247–254. <https://doi.org/10.1007/BF01319706>
- Munkittrick KR, McCarty LS (1995) An integrated approach to aquatic ecosystem health: top-down, bottom-up or middle-out? *J Aquat Ecosyst Health* 4:77–90. <https://doi.org/10.1007/BF00044791>
- Neufeld GJ, Holliday CW, Pritchard JB (1980) Salinity adaption of gill Na, K -ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J Exp Zool* 211:215–224. <https://doi.org/10.1002/jez.1402110210>

- Nobbs M, Blamires SJ (2017) Fiddler crab spatial distributions are influenced by physiological stressors independent of sympatric interactions. *J Exp Mar Biol Ecol* 491:19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.03.007>
- Nott JA, Corner EDS, Marvin LJ, O'Hara SCM (1985) Cyclical contributions of the digestive epithelium to faecal pellet formation by the copepod *Calanus helgolandicus*. *Mar Biol* 89:271–279. <https://doi.org/10.1007/BF00393661>
- Nunez-Nogueira G, Mouneyrac C, Amiard JC, Rainbow PS (2006) Subcellular distribution of zinc and cadmium in the hepatopancreas and gills of the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Mar Biol* 150:197–211. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0350-0>
- Ortega P, Santos RA, Lacouth P, Rozas EE, Custódio MR, Zanotto FP (2014) Cytochemical characterization of gill and hepatopancreatic cells of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) validated by cell metal transport. *Iheringia Série Zoologia* 104(3):347–354. <https://doi.org/10.1590/1678-476620141043347354>
- Ouyang X, Guo F (2016) Paradigms of mangroves in treatment of anthropogenic wastewater pollution. *Sci Total Environ* 544:971–979. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.013>
- Ouyang X, Guo F (2018) Intuitionistic fuzzy analytical hierarchical processes for selecting the paradigms of mangroves in municipal wastewater treatment. *Chemosphere* 197:634–642. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.102>
- Ragionieri L, Fratini S, Schubart CD (2012) Revision of the *Neosarmatium meinerti* species complex (Decapoda: Brachyura: Sesarmidae), with descriptions of three pseudocryptic Indo-West Pacific species. *Raffles Bull Zool* 60:71–87
- Raunkjær K, Hvitved-Jacobsen T, Nielsen PH (1994) Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Res* 28:251–262. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90261-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90261-5)
- Ravndal KT, Opsahl E, Bagi A, Kommedal R (2018) Wastewater characterisation by combining size fractionation, chemical composition and biodegradability. *Water Res* 131:151–160. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.034>
- Reid DG, Abelló P, Kaiser MJ, Warman CG (1997) Carapace colour, inter-moult duration and the behavioural and physiological ecology of the shore crab *Carcinus maenas*. *Estuar Coast Shelf Sci* 44:203–211. <https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0212>
- Ren Q, Pan L, Zhao Q, Si L (2015) Ammonia and urea excretion in the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N. *Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol* 187:48–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.04.013>
- Rezende EL, Castañeda LE, Santos M, Fox C (2014) Tolerance landscapes in thermal ecology. *Functional Ecology* 28:799–809
- Rodrigues ET, Pardal MÁ (2014) The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *70:158–182*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.018>
- Romano N, Zeng C (2013) Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Rev Fish Sci* 21:1–21. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- Rosas C, Bolongaro-Crevenna A, Sanchez A, Gaxiola G, Soto L, Escobar E (1995) Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biol Bull* 189:168–174. <https://doi.org/10.2307/1542467>
- Saborowski R, Buchholz F (1999) A laboratory study on digestive processes in the Antarctic krill, *Euphausia superba*, with special regard to chitinolytic enzymes. *Polar Biol* 21:295–304. <https://doi.org/10.1007/s0030000050365>
- Sainz JC, García-Carreño FL, Córdova-Murueta JH, Cruz-Hernández P (2005) Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: their genotype and modulation. *J Exp Mar Biol Ecol* 326:105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.05.021>
- Santos DB, Barbieri E, Bondioli ACV, De Melo CB (2014) Effects of lead in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) metabolism regarding salinity. *Mundo da Saude* 38:16–23. <https://doi.org/10.15343/0104-7809.20143801016023>
- Seebaugh DR, L'Amoreaux WJ, Wallace WG (2011) Digestive toxicity in grass shrimp collected along an impact gradient. *Aquat Toxicol* 105:609–617. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.015>
- Sherman E (2015) Can sea urchins beat the heat? Sea urchins, thermal tolerance and climate change. *PeerJ* 3:e1006. <https://doi.org/10.7717/peerj.1006>
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82:291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sreeram MP, Menon NR (2005) Histopathological changes in the hepatopancreas of the penaeid shrimp *Metapenaeus dohsoni* exposed to petroleum hydrocarbons. *J Mar Biol Assoc India* 47:160–168
- Tam NFY, Wong YS (1995) Mangrove soils as sinks for wastewater-borne pollutants. *Hydrobiologia* 295:231–241. <https://doi.org/10.1007/BF00029130>
- Tam NFY, Wong YS (1996) Retention of wastewater-borne nitrogen and phosphorus in mangrove soils. *Environ Technol (United Kingdom)* 17:851–859. <https://doi.org/10.1080/09593331708616453>
- Theuerkauff D (2018) <http://www.theses.fr>. Effets des rejets d'eaux usées domestiques sur la physiologie et l'écologie des crabes de mangrove, Sesarmidae et Ocypodidae, PHD Université de Montpellier, Mayotte
- Theuerkauff D, Rivera-Ingraham GA, Mercky Y, Lejeune M, Lignot JH, Sucré E (2018a) Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species. *Aquat Toxicol* 196:90–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.003>
- Theuerkauff D, Rivera-Ingraham GA, Roques JAC, Bertini M, Lejeune M, Farey E, Lignot J (2018b) Salinity variation in a mangrove ecosystem : a physiological investigation to assess potential consequences of salinity disturbances on mangrove crabs. *Zool Stud* 57:1–16. <https://doi.org/10.6620/ZS.2018.57-36>
- Theuerkauff D, Rivera-Ingraham GA, Lambert S, Mercky Y, Lejeune M, Lignot JH, Sucré E (2020) Wastewater bioremediation by mangrove ecosystems impacts crab ecophysiology: In-situ caging experiment. *Aquat Toxicol* 218. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105358>
- van Oosterom J, Codi King S, Negri A, Humphrey C, Mondon J (2010) Investigation of the mud crab (*Scylla serrata*) as a potential bio-monitoring species for tropical coastal marine environments of Australia. *Mar Pollut Bull* 60:283–290. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.09.007>
- Van Wormhoudt A, Bourreau G, Le Moullac G (1995) Amylase polymorphism in crustacea decapoda: electrophoretic and immunological studies. *Biochem Syst Ecol* 23:139–149. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(94\)00090-4](https://doi.org/10.1016/0305-1978(94)00090-4)
- Verboost PM, Van Rooij J, Flik G, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE (1989) The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J Exp Biol* 145:185–197
- Vogt G (1993) Differentiation of B-cells in the hepatopancreas of the prawn *Penaeus monodon*. *Acta Zool* 74:51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1993.tb01220.x>
- Vogt G (1994) Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* 114:83–101. <https://doi.org/10.1007/BF00396642>
- Vogt G (2019) Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *J Morphol* 280:1405–1444. <https://doi.org/10.1002/jmor.21040>
- Vogt G, Stöcker W, Storch V, Zwilling R (1989) Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry* 91:373–381. <https://doi.org/10.1007/BF00493824>
- Wang L, Yan B, Liu N, Li Y, Wang Q (2008) Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab,

- Sinopotamon yangtsekiense*. Chemosphere 74:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.025>
- Warren JH, Underwood AJ (1986) Effects of burrowing crabs on the topography of mangrove swamps in New South Wales. J Exp Mar Biol Ecol 102:223–235. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90178-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90178-4)
- Weihrauch D, Morris S, Towle DW (2004) Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. J Exp Biol 207:4491–4504. <https://doi.org/10.1242/jeb.01308>
- Williams SE, Shoo LP, Isaac JL, Hoffmann AA, Langham G, Moritz C (2008) Towards an Integrated Framework for Assessing the Vulnerability of Species to Climate Change. PLoS Biology 6:e325
- Wong YS, Lan CY, Chen GZ, Li SH, Chen XR, Liu ZP, Tam NFY (1995) Effect of wastewater discharge on nutrient contamination of mangrove soils and plants. Hydrobiologia 295:243–254. <https://doi.org/10.1007/BF00029131>
- Wong YS, Tam NFY, Lan CY (1997) Mangrove wetlands as wastewater treatment facility: a field trial. Hydrobiologia 352:49–59. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5234-1_6
- Zilli L, Schiavone R, Scordella G, Zonno V, Verri T, Storelli C, Vilella S (2003) Changes in cell type composition and enzymatic activities in the hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* during the moulting cycle. J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol 173:355–363. <https://doi.org/10.1007/s00360-003-0348-6>

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

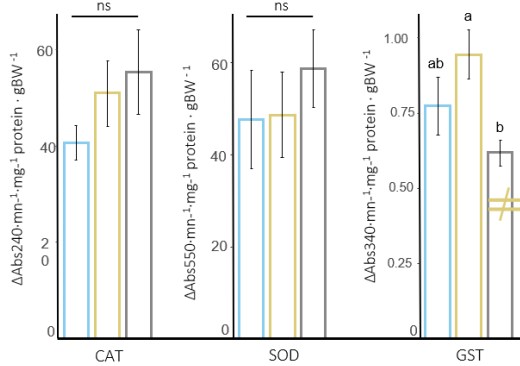
Chapitre 1 - Conclusions



Neosarmatium africanum

Résultats :

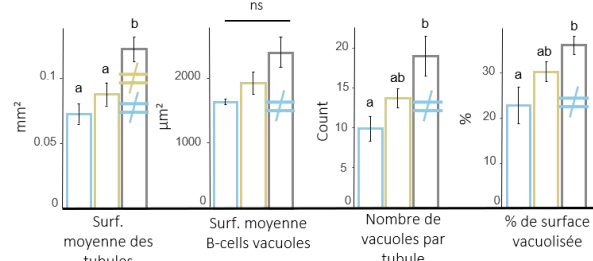
Activités des enzymes antioxydantes



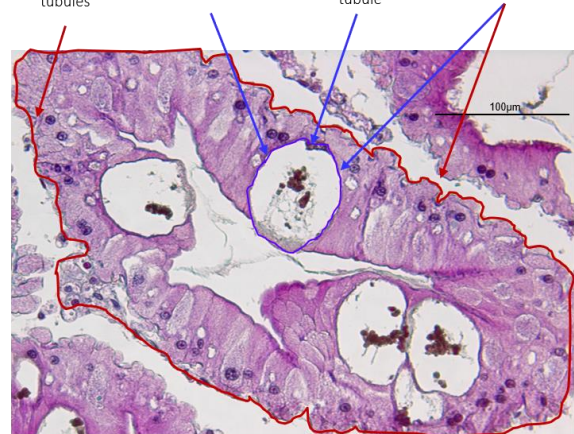
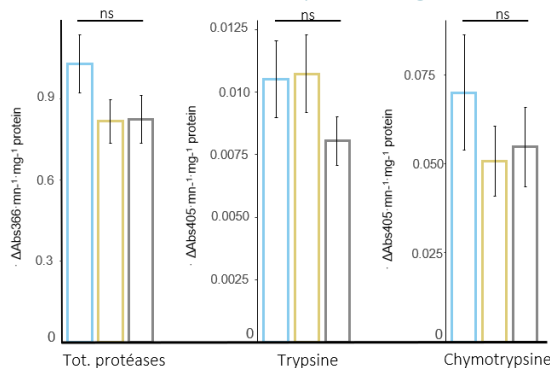
Légende

- Eau douce (0.5 ppt)
- Ammonium 10 mg·l⁻¹ (0.5 ppt)
- Eau usée prétraitée
- # Diff. significative entre conditions (couleur)

Paramètres histologiques (B-cells)



Activités des enzymes digestives



Points à retenir

- Les activités des **enzymes antioxydantes** ne sont globalement **pas impactées** par l'exposition à l'eau usée ou à l'ammonium, hormis une diminution significative de la GST en eau usée comparée à l'ammonium.
- L'exposition à court terme à l'eau usée et à l'ammonium **n'impacte pas les fonctions digestives**, en tout cas pas les activités des enzymes étudiées. L'étude d'autres enzymes actives à des pH plus faibles est une perspective envisagée.
- L'exposition à l'**eau usée** engendre, en 5h, une **dilatation des tubules** des crabes par rapport à ceux exposés à l'ammonium et à l'eau douce. L'eau usée provoque également une **augmentation de la surface et du nombre de vacuoles des B-cells**, ainsi que de la **surface vacuolisée des tubules** (comparé à l'eau douce seulement).

→ L'hépatopancréas présente une certaine plasticité histologique lorsqu'il est exposé à l'**eau usée à court terme** pouvant indiquer une hausse de l'activité de **digestion intracellulaire** qui pourrait venir compléter les **compromis énergétiques** observés au niveau des branchies. Cependant, aucun effet n'est remarqué au niveau des activités des enzymes digestives antioxydantes. L'**ammonium** n'a pas le même effet que l'eau usée sur les différentes fonctions étudiées, il **ne peut pas** en être considéré comme un **proxy** à lui seul, d'autres composantes entrent en jeu.

Communication:

Society for Experimental Biology - Séville – 2019 (Poster)



Chapitre 2

Les réponses
individuelles pour
mieux comprendre
les variations des
communautés de crabe
en milieu naturel
anthropisé : marqueurs
métaboliques et
comportementaux

Chapitre 2 – Présentation



Paraleptuca chlorophthalmus

Contexte :

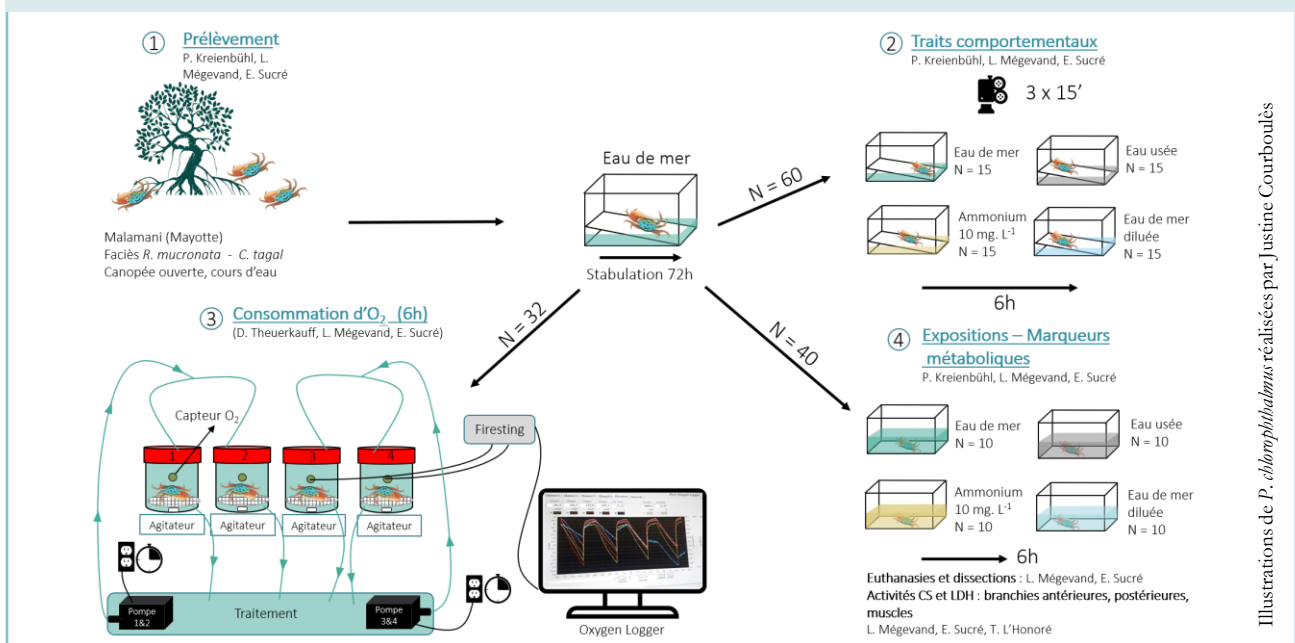
Les rejets d'eau usée en mangrove entraînent souvent un **effet positif** sur la **productivité végétale**, et des effets très **contrastés sur la macrofaune benthique**. A Malamani (Mayotte), plusieurs années de rejets sur des parcelles expérimentales ont conduit au constat de **modifications des communautés de crabes**, avec une diminution de **l'abondance de plusieurs espèces d'Ocyrodidae**, dont *Paraleptuca chlorophthalmus*, un crabe violoniste creusant des terriers (Capdeville et al., 2018). Ces résultats, associés à ceux présentant **des effets sur la physiologie** d'une autre espèce de crabe violoniste occupant le même habitat (*T. urvillei*) (Theuerkauff et al., 2018), nous ont conduit à réfléchir aux **liens existant entre les modifications observées dans le milieu naturel, et les effets observés à l'échelle de l'organisme**. Nous avons développé une **démarche écophysiological** en étudiant (1) des **traits comportementaux** en microcosmes, (2) le taux métabolique des individus et (3) des marqueurs métaboliques enzymatiques au niveau des branchies postérieures, antérieures et du muscle du chélicèpe. Les crabes ont été exposés à de l'eau de mer (SW), de l'eau de mer dessalée (DSW), de l'ammonium (N) et de l'eau usée (WW) durant **6h**. Ce temps représente une « **pulse exposure** » écologiquement cohérent lors d'épisodes de pollution, ou dans le cadre du déversement d'eaux usées régulières dans des sites de bioremédiation en mangrove (lavages par marées).

Questions :

- 1 – L'étude de traits comportementaux et physiologiques pourrait-elle aider à la compréhension des modifications des communautés dans des écosystèmes de mangrove connaissant des épisodes brefs, mais réguliers, de pollution ?
- 2 – Quel paramètre et/ou composant de l'eau usée domestique est le plus délétère pour les crabes ?

Méthodologies :

Les crabes ont été exposés à 4 conditions : eau de mer (35 ppt, SW dans le chapitre), eau douce (5 ppt, DSW), ammonium (5 ppt, 10 mg·L⁻¹ ammonium, N) et eau usée prétraitée (WW). Quatre traits comportementaux ont été mesurés, simulant de potentiels comportements d'évitement: distance parcourue, mobilité, agitation, émergence. Trois films de 15 minutes ont été enregistrés afin d'obtenir une vision fine des effets au cours de la journée, puis analysés avec le logiciel EthoVision® XT 15.0 (Noldus). Des expériences de respirométrie aquatique à flux intermittent ont été mises en place, en conservant également trois mesures au cours des 6h d'exposition. Enfin, des individus ont été exposés durant 6h sans possibilité d'émergence, euthanasiés, puis disséqués. Des mesures d'activités enzymatiques (CS et LDH) ont été réalisées sur les branchies (antérieures et postérieures) et le muscle du grand chélicèpe afin d'investiguer plus finement les potentiels changements dans les allocations d'énergie (métabolisme aérobie/anaérobie).



Individual metabolism and behaviour as complementary endpoints to better understand mangrove crab community variations linked to wastewater inputs

In revision in *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Soumis en septembre 2021

Laura Mégevand^{1*}, Pauline Kreienbühl², Dimitri Theuerkauff³, Jehan-Hervé Lignot¹ & Elliott Sucre^{1,2}

¹ MARBEC, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, Montpellier, France

² Centre Universitaire de Formation et de Recherche de Mayotte (CUFR), 97660 Dembeni, Mayotte, France

³ Station de Recherche Océanographiques et Sous-marines STARESO, Punta Revellata, 20260 Calvi, France

* Corresponding author at: UMR MARBEC (University of Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD), Montpellier, France. E-mail address: laura.megevand@umontpellier.fr (L. Mégevand).

Abstract

Mangrove forests are impacted by a large range of anthropogenic activities that challenge their functioning. For example, domestic wastewater (WW) discharges are known to increase vegetation growth but recent studies indicate that they have negative effects on benthic macrofauna, especially on mangrove crabs, these ecosystem engineers playing a key role on the functioning of the mangrove. In experimental areas regularly receiving WW at low tide (Mayotte Island, Indian Ocean), a drastic decrease in burrowing crab density has been reported. In this context, the individual behavioural and physiological responses of the fiddler crab *Paraleptuca chlorophthalmus* exposed to short-term (6h) pulse of WW and ammonia-N (as a potential proxy of WW) were investigated. This species is one of the most sensitive to WW within the mangrove crab community. For the behavioural experiment, crabs could choose between the aquatic and aerial environment. Individual metabolic rate (O₂ consumption) was monitored after 6h of exposure in WW or ammonia-N. Aerobic and anaerobic metabolic markers (citrate synthase and lactate dehydrogenase activities, respectively) were also evaluated. Results indicate that crabs exposed to WW are more active and mobile than controls after 3 hours. Crabs actively emerged from WW and reduced their activity and mobility after 6 hours. A higher metabolic rate in WW occurred immediately (t = 0h), 3 and 6 hours after WW exposure, with also, a burst in aerobic bacterial consumption in WW, but no effect of ammonia-N. No effect of WW or ammonia-N was observed on aerobic and anaerobic metabolic markers. Therefore, short-term pulses with domestic polluted wastewater trigger quick behavioural and metabolic responses that could be deleterious if prolonged. These results could contribute to the understanding of the community-scale changes observed in benthic macrofauna after several years of regular domestic pollution pulses.

Keywords

Crustacea

Pulse exposure

Behavioural endpoints

Metabolism

Hypoxia

Wastewater

1. Introduction

Mangroves are forests that grow at the interface between terrestrial and marine ecosystems in tropical and subtropical areas (Xiang et al., 2020) and are regularly exposed to anthropogenic pressure. This is due to their proximity with urban areas, aquatic farms, ports, that caused contrasted effects on vegetation, benthos and macrofauna (negative, neutral, even positive) (Bala Krishna Prasad, 2012; Capdeville et al., 2018; Delabie et al., 2006; Zhang et al., 2014).

Because of their capacity to absorb nutrients and their filtering properties (amongst others), they have been widely mentioned as bioremediation sites for domestic wastewater (WW) treatment (Capdeville et al., 2018; Kristensen, 2008; Tam and Wong, 1995). Potential effects of sewage discharge on vegetation, benthos and macrofauna have been studied in parallel (Herteman et al., 2011; Ouyang and Guo, 2016; Wong et al., 1997).

In this context of bioremediation, a pilot site has been set up in Mayotte Island (Indian Ocean) in 2008, with regular pulse of WW discharge (5-6h duration: two times/day) occurring on chosen natural mangrove areas where both vegetation and macrofauna were monitored (Capdeville, 2018; Herteman, 2010; Theuerkauff, 2019).

Among results of this project, effects on the assemblages of macrofauna communities have been observed in WW impacted areas with diminution or even disappearance of some species of burrowing mangrove crabs (Ocypodidae), against an increase of some Sesarmidae species (Capdeville et al., 2019, 2018). Globally, a reduction in the number of burrows has been observed (Theuerkauff et al., 2020). This could be due to a decrease in burrowing crabs abundance, but also to a modification of their bioturbation activity (foraging and burrowing). This can modify the mangrove ecosystem functioning (Cannicci et al., 2008; Lee, 2008). The study of burrowing crabs such as fiddler crabs that can have ecological engineering impacts on mangrove functioning is promising to improve our understanding of mangrove and the monitoring of their health state (Xiang et al., 2020).

Worldwide, effects of domestic effluent discharges (controlled or not) on the assemblages of crab communities have been observed in several different mangroves (Capdeville, 2018) : enhanced diversity of Ocypodidae and Sesarmidae species was observed in peri-urban mangroves in Kenya and Mozambique (Cannicci et al., 2009) and in urban mangrove in Thailand (Wickramasinghe et al., 2009). Decrease in survival has been observed in sewage-exposed *U. annulipes* and *U. inversa* in mangrove mesocosms in Tanzania (Penha-Lopes et al., 2009). Decrease in species diversity has also been observed in Australian mangrove submitted to gradients of treated WW (Wear and Tanner, 2007).

In the pilot experimental site of Mayotte, the prediction that small species like Ocypodidae should dominate the mangrove areas enriched by organic matter (Pearson and Rosenberg, 1978) was not confirmed by Capdeville et al (2018). As a reminder, pre-treated wastewater

discharges led to the dominance of bigger Sesamidae species and a diminution or even disappearance of some species of Ocypodidae burrowing crabs, with no difference in crab density, suggesting that some species took advantage of the fall of the others (Capdeville et al., 2019, 2018).

To complete these field observations, recent studies were conducted in controlled conditions in order to investigate the effects of WW on mangrove crab physiology. Burrowing mangrove crabs *N. africanum* were exposed to short (5h) but ecologically relevant WW pulses (similar to the discharge generated on the field experimental site of Mayotte). A burst in O₂ consumption, histological changes (osmoregulatory gills and hepatopancreas), and disturbed antioxidant defences were observed (Theuerkauff et al., 2018, Megevand et al., 2021). These effects partially explain the modifications of crab communities observed *in situ* as they unveil, at different integrated levels, several energy compromises and adaptations to maintain the crabs global metabolism. They also reveal the physiological flexibility of this species and a lack of knowledge about the short-term survival strategies they may develop, including behavioural responses.

In this context, could fine-scale behavioural and metabolic responses of burrowing mangrove crabs exposed to WW could contribute to the understanding of large-scale changes in communities observed in the field?

Careau et al. (2008) formulated the existing link between physiology and behaviour, these two disciplines having long been perceived as complementary in the field of ecology and evolution (Bartholomew, 2005; Cabanac, 1996). Behaviour is readily seen as a powerful way to cope with environmental challenges by physiologists, and behavioural ecologists recognize the importance of energetics in the context of behavioural decisions and the evolution of life-history strategies.

In this study, we focus on a fiddler crab *Paraleptuca chlorophthalmus* distributed among Indo-pacific mangroves, that usually inhabits muddy banks and flats of mangrove estuaries, near high-tide levels of mangrove forests (Crane, 1975). This species is one of the declining ocypodidae species in the WW impacted parcels of the pilot site of Malamani (Capdeville et al., 2018). Behavioural observations coupled with physiological analyses can provide a more complete understanding of the impact of an external stimulus on an organism, a population or a species (Celi et al., 2013; Filiciotto et al., 2018, 2016). For fiddler crabs and other crustaceans, altered behaviour can be considered as an early warning biomarker of chemical exposure (Ungherese and Ugolini, 2009). In fiddler crabs, different escaping behaviours have been studied *in situ*, often resulting in a rapid home run towards the burrows in case of predation (Jan M Hemmi, 2005) or, inversely, by emerging from their burrows, with for example crabs exposed to thermal stress (Halal et al., 2020). Emersion behaviour has been proved as a useful escaping strategy, but this has to be in a limited time period as crabs become more exposed to predation or dehydration (Luppi et al., 2013).

Moreover, the elimination of CO₂ and ammonia is deprecated in the aerial environment (Luquet et al., 1998; Wood and Randall, 1981), which bring them regularly into the water.

As intertidal crabs biological timing follow circadian and circatidal rhythms (Naylor, 1997; Thurman, 2004; Weis and Weis, 2004), behavioural and physiological responses are expected to vary during the time of the day in environmental conditions. Pollutants may interfere with such a regulation of crab's activity according to the patterns of tides and day (Azpeitia et al., 2013; Stillman and Barnwell, 2004).

By investigating several behavioural endpoints and assessing metabolic state (O₂ consumption and metabolic enzymes activities) of the fiddler crab *P. chlorophthalmus* exposed to WW and ammonia-N as a proxy of WW in microcosm, we sought to better understand ecological observations in the field through laboratory experiments.

We thus hypothesized that (1) crabs exposed to pollutants would show a higher activity state (escape response) coupled with an emersion behaviour corresponding to short-term response to hypoxic and contaminated water; (2) Both WW and Ammonia-N exposure would impact crab physiology leading to energy compromises in order to maintain their global metabolism.

O₂ consumption was measured as resting metabolic rate, that was considered as physiologically relevant (Borges et al., 2018; Ikeda, 2016) to assess the potential effects of ammonia-N, pollutant cocktail or hypoxic effects of WW on crabs, independently from a potential locomotor or escape behaviour. Then, in order to reveal underlying metabolic trade-offs resulting from WW and ammonia-N exposure, we measured citrate synthase (CS) activity as a marker of aerobic metabolism through mitochondrial efficiency, and lactate dehydrogenase (LDH) activity that would maybe show a shift to anaerobic metabolism in order to cope with the energy needs of the animals.

2. Materials & Methods

2.1 Animal collection and acclimatisation

Male *P. chlorophthalmus* were collected in February and March 2020 in the mangrove of Malamani (Boueni Bay, Mayotte -12,923155, 45.154053) from a population extending along both sides of the stream of Malamani, in the *Avicennia marina* and *Ceriops tagal* vegetation belt (above the *Rhizophora mucronata* belt). This open habitat presents no canopy cover, a large temperature gradient and regular water immersion/emersion, depending on the season, the tides and time of the day.

All animals were hand collected at low tide when crabs are active and out of their burrows. They were placed into individual boxes for transportation in order to minimize stress and

figths. These males were then directly transported to the University Centre of Mayotte (CUFR, Dembeni, France) and placed for three days for acclimation in tanks containing natural seawater ($\sim 33\%$ salinity; $1050 \text{ mOsmol kg}^{-1}$), under a natural photoperiod (12h light: 12h dark) and without feeding prior to experimentation. These crabs (140) were acclimated to an aerial-aquatic environment (crabs could move freely between these two environments). The acclimation microcosms were the same as those used for the behavioural experiment.

For behavioural analyses, 60 crabs were studied. For the respirometry experiment, 32 crabs were studied. For the biochemical analysis on metabolic markers (citrate synthase, CS and lactate dehydrogenase, LDH enzyme activity), 40 crabs were studied. No mortality was observed during acclimation and experimental processes.

2.2 Wastewater sampling and conservation

Samples of raw wastewater effluent (WW) were directly collected from the Dembeni wastewater treatment plant. In order to minimize any possible variation in WW composition during the experiments, 100 litres were collected on a single day. WW was then distributed in 1 litre containers and stored at -20°C in order to stop bacterial proliferation and to ensure a better conservation of nitrogen compounds. This WW treatment plant was chosen because basic water parameters were routinely monitored due to the European water framework directive (WFD). In addition, frozen samples of collected WW were sent to CHROME laboratory (University of Nîmes, France) to assess NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} concentrations with additional parameters (see Table 1).

Chemical species	Concentration ($\mu\text{mol/Kg}$)
Na^+	3207
NH_4^+	2313
K^+	364
Mg^{2+}	488
Ca^{2+}	286
F^-	5.8
Acetate	190
Formate	<1.d.
Cl^-	2238.2
NO_2^-	<1.d.
Br^-	3.1
NO_3^-	0.6
Benzoate	<1.d.
PO_4^{3-}	68.5
SO_4^{2-}	253.9
Oxalate	<1.d.

Table 1. Physical and chemical characterization of undiluted WW collected in Dembeni treatment plant system in rainy season (March 2020). Samples were stored at -20°C prior analyses in CHROME Laboratory (Nîmes, France).

2.3 Ammonia-N exposure and experimental conditions

Four different experimental conditions were performed: some crabs were maintained in seawater (~33‰ salinity), others were transferred to diluted seawater (~5‰ salinity) or to 10 mg.l⁻¹ ammonia-N solution. This solution was prepared by adding 1 mmol of ammonium chloride (Sigma, USA) to diluted seawater (~5‰ salinity). WW was also adjusted to ~5‰ salinity by adding Instant Ocean® Sea Salt.

Ammonia-N (called N in our experimental design) was chosen as a second experimental treatment because the ionized form of ammonia-N (NH₄⁺) is the major component of WW (Table 1). This condition referred to total ammonia (ammonia-N), which represents the sum of unionized ammonia NH₃ and ionized ammonia NH₄⁺ (Haywood G.P, 1983; Lemarié et al., 2004; Bermudes and Ritar, 2008). Finally, focusing on single ammonia-N effects in a separate experimental condition allow us to avoid pollutant cocktail and hypoxic effects (aerobic bacteria that require oxygen to degrade the substrate) (Gerardi, 2006) caused by WW on crabs physiology.

The ammonia-N concentration was chosen on the basis of concentrations that may be released by treatment plants in Mayotte (Herteman, 2010). It corresponds to a sub-lethal concentration for a fiddler crab species such as *U. princeps* with adults sharing similar size and morphology with *P. chlorophthalmus* (Azpeitia et al., 2013).

In order to take into account crabs biological timing and potential handling stress, three time steps were considered for the behavioural and respirometry measurements: 0h (start of exposure), 3h, 6h. In order to assess the activity of CS and LDH, crabs were exposed during 6h to the same experimental conditions before euthanasia and sampling. All the experiments started at 10 am, in order to minimize the potential response variations due to circadian rhythms of the animals.

2.4 Behavioural endpoints: locomotor activity, agitation and emersion choice

Behavioural endpoints of *P. chlorophthalmus* were assessed using four independent 28x22x16cm microcosms for each exposure condition, placed on the floor on a polystyrene plate to minimize any potential vibration. Microcosms were divided into two communicating environments: aquatic and aerial. Crabs could move freely between those environments with this binary-choice setup. Aerial part was made of a surelevated plastic grid platform accessible through a gentle slope avoiding crabs from slipping. Prior to each experimentation, exposure solutions were quickly poured in the microcosms and

oxygenated during twenty minutes, in order to start the experiment with an at least 90 % air saturated water.

Then, crabs were individually placed in the microcosms (N = 15 per condition), in the aquatic environment. The 0h trials started 5 minutes after the crabs were placed in the microcosms, in order to minimize the potential stress due to handling. Videos were recorded at 0h, 3h and 6h hours during 15 minutes with a Sony Handycam® CX900E attached ~210 cm above microcosms. Individual crab movements were analysed using a multiple-arena module by EthoVision® XT 15.0 software (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands), with a defined sampling threshold of 5 frames per second.

Four parameters were evaluated: 'travelled distance' (cm), 'mobility' (a crab may be considered as "mobile" even if it does not travel a distance), 'agitation' (based on the "activity" parameter of EthoVision® with a threshold defined at 30), and, the 'percentage of time spent in the aerial environment' of the microcosms. The agitation parameter focuses on the detection of the movements of the crabs' legs only. A non-moving, or non-mobile crab, is not necessarily a quiet or undisturbed crab. Crab leg movement has been used as a stress indicator among crustaceans (Hazlett, 1996; Urban, 2015).

All parameters except 'travelled distance' are expressed as % of time. At the end of each experiment, animals were weighted and put back in the aerial/aquatic aquariums before being released into the mangrove.

2.5 Oxygen consumption rate

Resting metabolic rate was considered as physiologically relevant (Borges et al., 2018; Ikeda, 2016) to assess the potential effects of ammonia-N, pollutant cocktail or hypoxic effects of WW on crabs, independently from a potential locomotor or escape behaviour.

The experimental design consisted in a static, intermittent flow-through respirometry system based on Clark et al (2013). Crabs were individually placed into 125 ml chambers allowing them to make sporadic movements considering their size, and at the same time ensure accurate measurements of O₂ consumption. Following procedures described in Killen (2014), O₂ measurements were performed using a 4-channel fiber-optic system with contactless O₂ sensor spots (FireSting O₂, PyroScience, GmbH, Aachen, Germany) where water oxygen content was quantified once every 5 seconds.

Water-mixing within the chambers was achieved with magnetic stirrers located under 1 mm² mesh grid to avoid too much disturbance (Rivera-Ingraham et al., 2016). Sensors were calibrated to 100 % (using air-saturated water) and 0 % air saturation. Chambers were filled with a tubing system providing control SW or contaminated water from aerated, filtered and temperature-controlled tanks.

Crabs were gently introduced in the chambers and left to acclimate for one hour in aerated seawater prior experiment.

Following acclimation, the system was filled with the exposure solution. An automated flush pump was switched on for 20 minutes to ensure proper mixing and was cut off during 40 minutes. During that time, the chambers were sealed. The decrease in oxygen content could be analysed to indicate the rate of oxygen uptake. After the 40-minute cycle, the pump was turned on to flush the metabolic chambers with aerated seawater (or aerated WW or diluted seawater enriched with ammonia-N) during 20 minutes. Due to the presence of aerobic and anaerobic microorganisms capable of degrading organic compounds and consuming O₂ (Shchegolkova et al., 2016), a 20 minutes flushing was run to ensure 99 % air saturation. The 40 minutes measurements allowed to make accurate O₂ measurements without falling under the threshold of 70 % air saturation in order to maintain aerobic metabolism and to avoid hypoxic stress (Ombres et al., 2011; Rodgers et al., 2016).

Similarly to the behavioural experiment, O₂ measurements were taken at 0h, 3h and 6h for all individuals (N = 10 per condition). The same procedure was applied for blanks chambers for each condition and then subtracted from the MO₂ per individual.

At the end of each experiment, animals were weighted and put back in aerial/aquatic aquariums before being released into the mangrove.

In order to illustrate the O₂ consumption by aerobic bacteria and the potential induced hypoxia for organisms exposed to WW, the same experiment was set up without any crabs in the chambers (four treatments, N = 8 per treatment). This bacterial consumption was then subtracted from the MO₂ per individual as blank.

2.6 Sampling and dissections

In order to perform the CS and LDH activity assays, crabs were anesthetized and euthanized on ice for tissue sampling of the muscle of the big chelipeds, anterior and posterior gills. Samples were transferred in 1.5 ml tubes and flash frozen in liquid nitrogen then conserved separately at -80°C for enzymatic assays.

2.7 Metabolic markers

Citrate synthase (CS) and lactate dehydrogenase activity (LDH) activities were determined to assess the potential physiological effect of WW and Ammonia-N exposures. Indeed, they may be useful to determine what sort of locomotor behaviour the animals are most likely to rely on due to the expression of aerobic versus anaerobic enzymes found on the tissue (Ombres et al., 2011). The potential physiological effects of hypoxic WW on anaerobic metabolism were also investigated.

A different batch of animals was chosen for the investigation on metabolic markers. Crabs were maintained in the same microcosms used as for the behavioural experiments, but without the aerial platform. Crabs could move freely, but stayed totally immersed (no “aerial bias” resulting from the potential time spent in air between individuals).

Citrate synthase activity was used as a marker of mitochondrial content. CS was measured using a kit from Sigma Aldrich (#MAK193) following the manufacturer's instruction. Briefly, 2-8 mg of anterior gill, posterior gill, and muscle of the big cheliped were homogenized in 100 μ L of icecold CS Assay Buffer. Then, samples were centrifuged at 10,000 g for 5 minutes at 4°C and the supernatant was transferred to a fresh tube. Fifty microlitres of sample were added to wells of 96-well plates in duplicate with appropriate reaction mixes (CS assay buffer, developer and substrate mix). A standard curve was obtained with serial dilutions of GSH solution (0-40 nmol/well). The plate was incubated for 3 minutes at 25°C and the absorbance was recorded at 412 nm every 5 minutes for 40 minutes. The colorimetric product (GSH) was proportional to the enzymatic activity of CS and normalized to the quantity of tissue.

Lactate dehydrogenase activity was measured using a kit from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada, #MAK066) following the manufacturer's instruction. Briefly, 2-8mg of anterior gill, posterior gill, and muscle of the big cheliped were homogenized in 200 μ L of ice-cold LDH Assay Buffer. Then, the samples were centrifuged at 10,000 g for 15 minutes at 4°C and the supernatant was transferred to a fresh tube. Fifty microlitres of sample were added to wells of 96-well plate in duplicate with appropriate reaction mixes (LDH assay buffer, developer and LDH substrate Mix). A standard-curve was obtained with serial dilutions of NADH solution (0 to 12.5 nmol/well). The plate was incubated at 37°C and the absorbance was recorded at 450 nm every 5 minutes for 30 minutes. The colorimetric product (NADH) was proportional to the enzymatic activity of LDH and normalized to the quantity of tissue.

3. Statistical analyses

Statistical analyses were performed in R version 3.5.2 with Rstudio version 0.99.491 (Rstudio, Inc), with statistical significance being assigned at $\alpha = 0.05$.

To test for potential effects of treatment and time on behavioural endpoints, we used generalized mixed-effects modelling (Johnson et al., 2015; Manning, 2007; Zuur et al., 2013), using the package glmmTMB (Brooks et al., 2017). The time allocated to each behaviour was first translated into percentage, except for the distance moved, expressed in centimetres.

Three behavioural endpoints (distance moved, mobility, agitation) were modelled in function of treatment (SW, DSW, N, WW) (four-level fixed factor) and exposure time (0h, 3h, 6h) (three-level fixed factor).

Individual differences and autocorrelation due to repeated measurements were controlled via a random intercept of crab ID. Since data followed a compound Poisson-gamma distribution while recording a lot of exact zeroes not being missing values, a Tweedie distribution (Jorgensen, 1997) error was applied to the models (Candy, 2004).

To explore the magnitude of the effects of each fixed factor (treatment and time) and their interaction, a type II ANOVA (Wald chi-square test) was applied using Anova function in CAR package (Fox and Weisberg, 2019). When significant interactions between treatment and time were detected –which occurred for the three behavioural endpoints- they were investigated through multiple pairwise comparisons using lsmeans package (Lenth, 2016). Bonferroni correction was applied to all p-values resulting from this analysis.

For one of the behavioural endpoints (time spent in aerial environment), no GLMM was found to be suitable. Therefore, we focused on the variability of individual responses between treatment groups. We investigated, for each time step, the coefficient of variation (CV) of each group and used Krishnamoorthy and Lee's (2014) modified signed-likelihood ratio test from the R package cvequality (Marwick and Krishnamoorthy, 2019) to compare the variability between groups.

For O₂ oxygen consumption, a generalized linear mixed model approach was taken assuming Gaussian distribution error with log link. As with above, time (0h, 3h, 6h) and treatment group (SW, DSW, N, WW) were considered as fixed factors.

Crab ID was set as random factor nested within experimental tank (two tanks of exposure solution per treatment, N = 4 per tank), which are nested within treatment group (SW, DSW, N or WW). Interaction terms were examined using the approach outlined above, using type II ANOVA and multiple pairwise comparisons followed by Bonferroni correction. The same statistical analysis was used for aerobic O₂ consumption, with metabolic chamber ID set as random factor.

For metabolic markers (CS and LDH), residuals were evaluated using Shapiro-Wilk and Levene's test respectively in order to test the data normal distribution behaviour and variance homogeneity. When parametric assumptions were not met, data were log-transformed. One-way ANOVAs were performed separately for anterior gills, posterior gills and muscles to assess potential differences of enzymatic activities of CS and LDH between treatments (SW, DSW, N, WW) after 6h exposure. All values are represented as average \pm SEM.

4. Results

4.1 Behavioural endpoints

Results of the behavioural analyses are depicted in Fig.1 and Fig.2, which include temporal tracking responses of 0h, 3h, 6h for the distance moved (Fig.1A), mobility (Fig.1B), agitation (Fig.1C) and emersion time parameters (Fig.2).

For the distance moved (cm), differences across treatments and exposure times accounted for significant ($p < 0.05$) effects of treatment, exposure time, and their interaction (Table 2, Fig.1A).

Exposure to WW and Ammonia-N resulted in a significant increase in the distance moved by crabs at 3h compared with those exposed to DSW following multiple comparisons test with Bonferroni correction.

For 0h and 6h, no significant difference in distance moved between the four treatments was observed. Considering exposure time as factor level, crabs exposed to DSW showed a significantly reduced distance moved at 3h compared with the first time point (0h).

A significant effect ($p < 0.005$) of treatment and exposure time on mobility (% time) was observed. Their interaction was also significant (Table 2).

Post hoc multiple comparisons on the interaction terms showed that crabs exposed to WW were more mobile than crabs exposed to DSW and SW at 3h and that crabs exposed to Ammonia-N were more mobile than crabs exposed to DSW at the same time point (3h) (Fig.1B). For 0h and 6h, no significant difference in mobility between treatments was observed. Considering exposure time factor level, crabs exposed to DSW showed a significantly reduced mobility at 3h compared with the first time point (0h), similarly to distance moved.

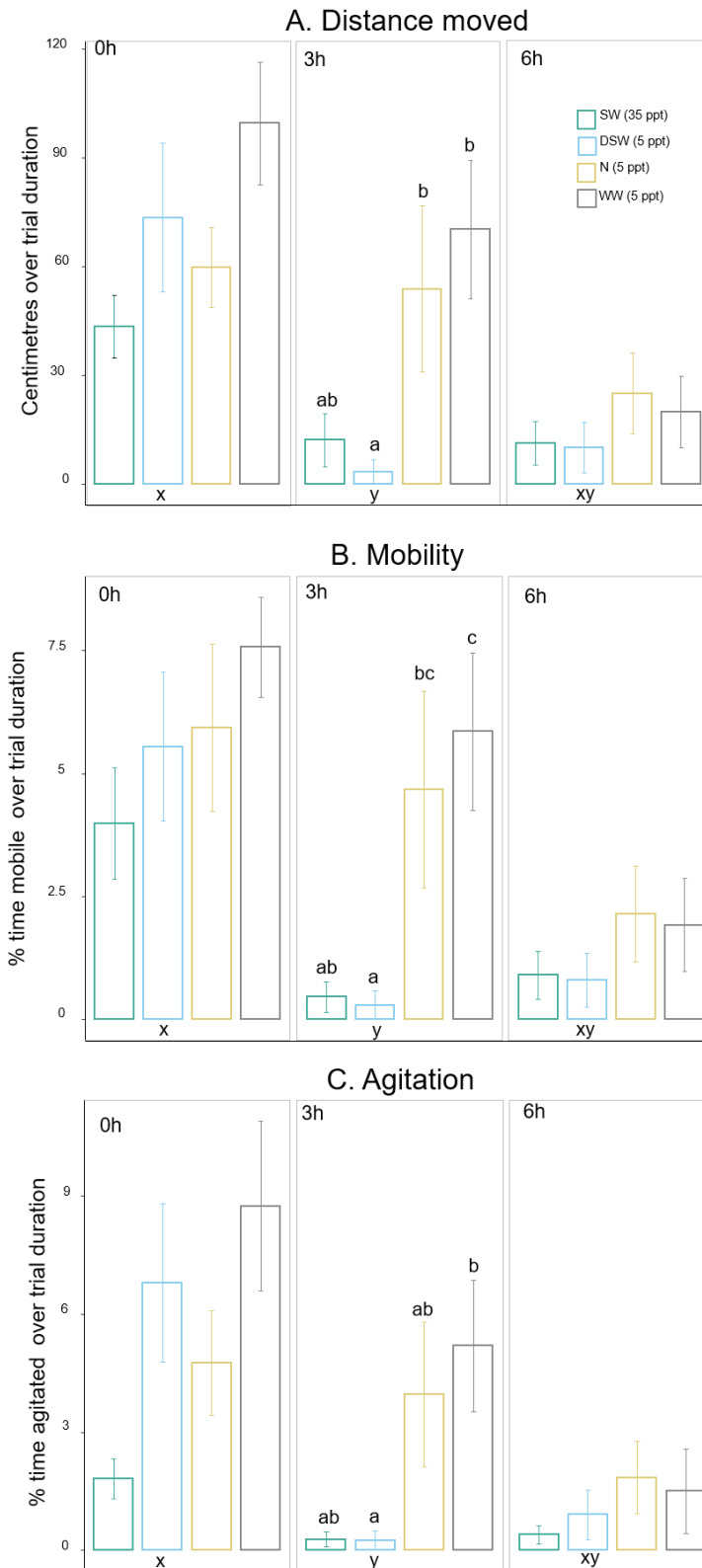


Figure 1. Averages of (A) distance moved by crabs, (B) percentage of time where crabs were mobile, and (C) percentage of time where crabs were agitated at 0h, 3h and 6h exposure to SW, DSW, N and WW. Different colours represent treatments (see legend). Values are mean \pm SE. Different letters on the top (a,b,c) and at the bottom (x,y,) of barplots indicate significant two-way interaction effects of treatment and time respectively after Wald Chi-square test and pairwise multiple comparisons (Bonferroni corrected).

Crabs were also significantly more agitated when exposed to WW compared with DSW at 3h only (Fig.1C). In the same way as for the two previous parameters, crabs exposed to DSW were significantly less agitated at 3h than at 0h considering the exposure time factor level. These results accounted for significant ($p < 0.005$) treatment, exposure time and interaction (Table 2).

A			
Distance moved			
Factor	DF	χ^2	P
Treatment	3	9.91	0.019
Time	2	25.72	< 0.001
Treatment X Time	6	2.85	0.045

B			
Mobility			
Factor	DF	χ^2	P
Treatment	3	26.25	0.002
Time	2	15	<0.001
Treatment X Time	6	13.79	0.032

C			
Agitation			
Factor	DF	χ^2	P
Treatment	3	21.11	<0.001
Time	2	27.63	<0.001
Treatment X Time	6	13.2	0.04

Table 2. Behavioural responses of fiddler crabs as a function of treatment and time. Analysis of deviance with Wald Chi-square tests are performed for testing the significant differences of fixed categorical variables in GLMMs (N = 15 per treatment for 4 treatment groups and 3 time steps). Autocorrelation and non-independence were controlled with crab ID as random factor.

As depicted in Fig.2, time spent in aerial environment varied a lot between individuals for all treatment groups at 0h with no clear preference between the aerial or aquatic environment (test statistic = 1.98, $p = 0.56$, CV: SW = 143.58, DSW = 89.64, N = 81.26, WW = 81.65). At 3h, coefficients of variation of N and WW exposed crabs slightly decreased without bringing significant difference between treatment group coefficient of variations (test statistic = 5.3719, $p = 0.146$, CV: SW = 97.51, DSW = 96.82, N = 67.83, WW = 44.38). At 6h, individual variations significantly differed between treatment groups, as 93 % of the crabs exposed to WW spent at least 95 % in the aerial environment (test statistic = 9.62, $p = 0.02$, CV: SW = 97.85, DSW = 64.54, N = 75.17 WW = 25.22) whereas other treatments showed similar variations.

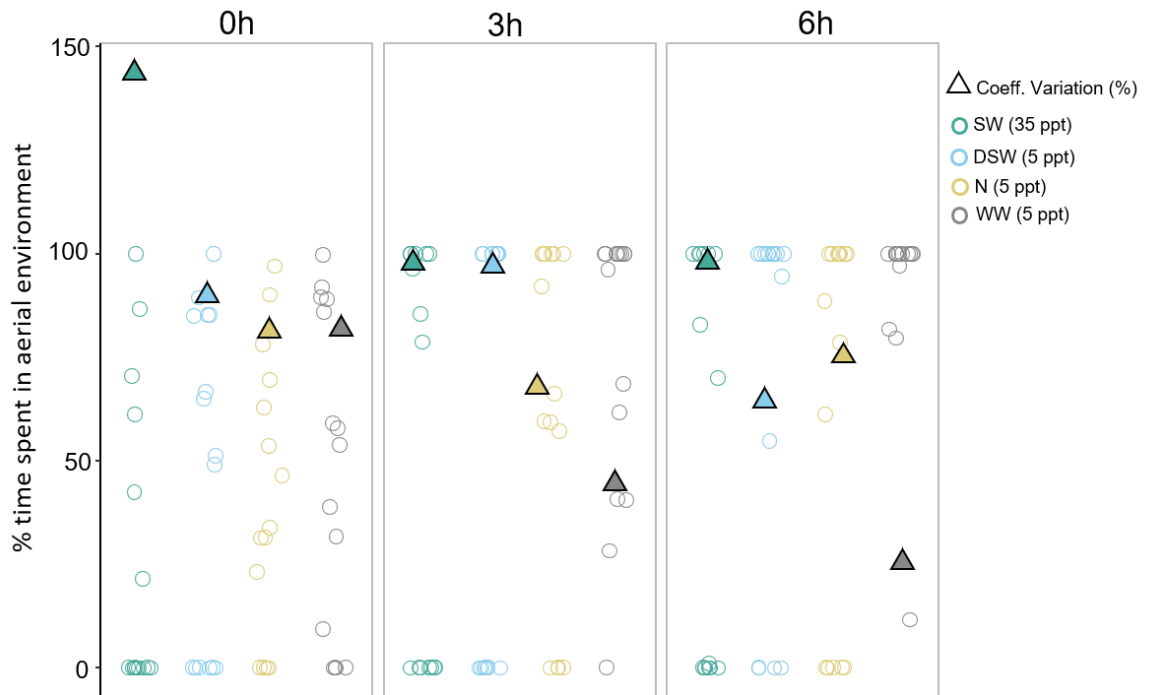


Figure 2. Percentage of time that crabs exposed to DSW, SW, N and WW spent in aerial environment at 0h, 3h, and 6h (individual values). Different colours represent treatments (see legend). Triangles represent the coefficient of variation by treatment and time step. P values indicate if there are significant differences between treatments after modified signed-likelihood ratio test.

4.2 Oxygen consumption

Results of the respiration rate measurements are depicted in Fig.3A, which includes temporal responses for each treatment at 0h, 3h, 6h.

A significant effect ($p < 0.001$) of treatment and exposure time on O_2 consumption ($\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) was observed. Their interaction was also significant (Table 3).

Post hoc multiple comparisons on the interaction terms showed that crabs exposed to WW consumed significantly more O_2 than crabs exposed to DSW and at the first-time step (0h) (Fig.3A). At 3h, WW exposed crabs consumed significantly more O_2 than DSW and SW exposed crabs. At 6h, a burst in O_2 consumption in crabs exposed to WW generated significant differences in respiration rate with the three other treatment groups (DSW, SW and N).

Results of the consumption of O_2 by aerobic bacteria are depicted in Fig.3B, including temporal responses for each treatment at 0h, 3h, 6h. A significant effect ($p < 0.01$) of treatment and exposure time on O_2 consumption ($\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$) was observed (Table 3). Their interaction was also significant (Wald chi-square test). Post hoc multiple comparisons on the interaction terms showed that bacterial O_2 consumption in WW increased significantly between 0h and 3h, and 3h and 6h, with a clear burst in consumption

at 6h (Fig.3B). Bacterial O₂ consumption in WW was significantly higher at 6h compared with all the other conditions (DSW, SW and N).

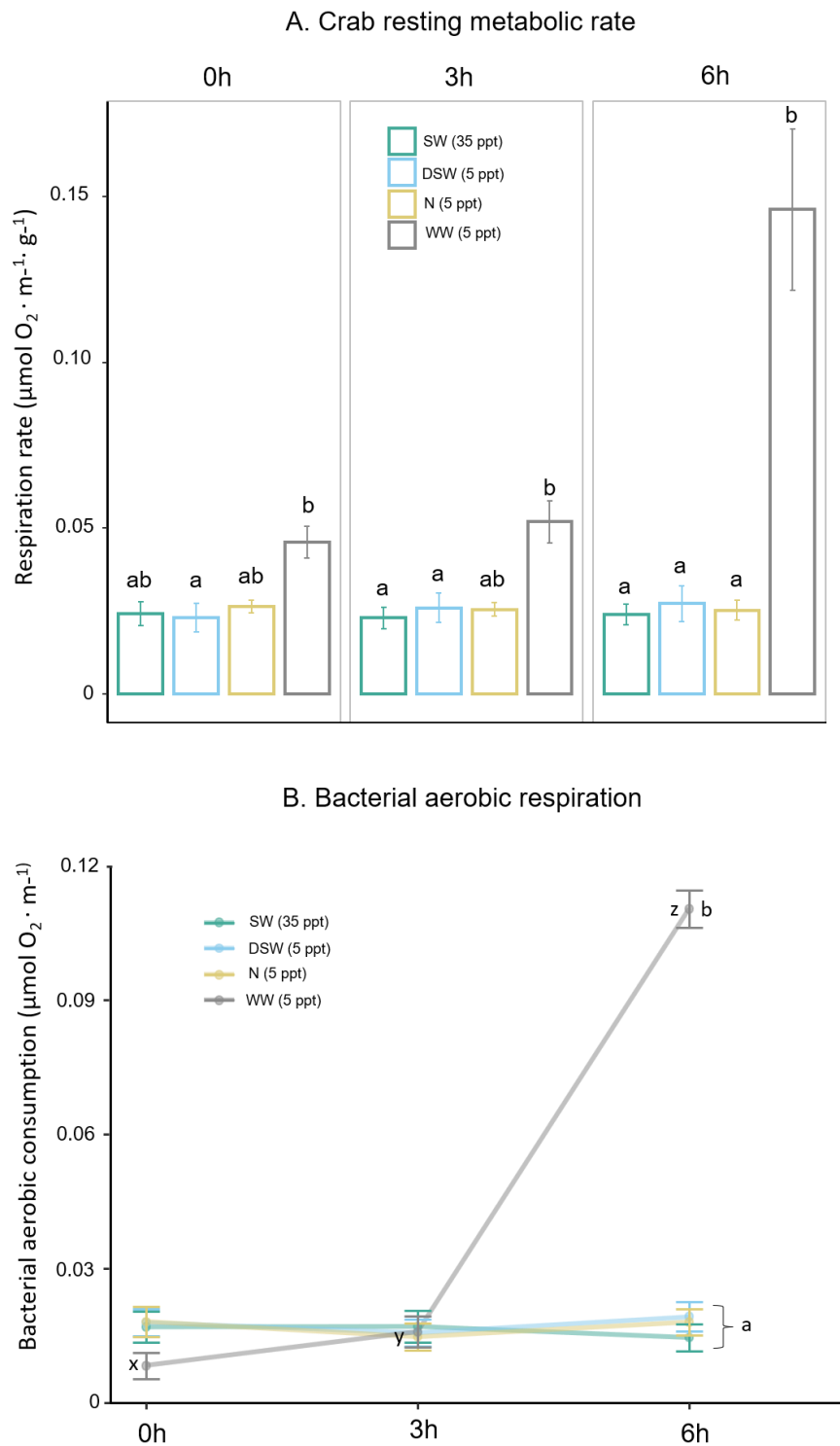


Figure 3. Resting metabolic rate of *P. chlorophthalmus* (A) and O₂ consumption by aerobic bacteria (B) in SW, DSW, N and WW at 0h, 3h, and 6h exposure. Values are mean \pm SE. Different letters on the top (a,b,c) and at the bottom (x,y,c) of barplots indicate significant two-way interaction effects of treatment and time respectively after Wald Chi-square test and pairwise multiple comparisons (Bonferroni corrected).

A		O ₂ crab cons.		
Factor		DF	χ^2	P
Treatment		3	48.33	< 0.001
Time		2	32.89	< 0.001
Treatment	X			
Time		6	80.98	< 0.001

B		O ₂ bacterial cons.		
Factor		DF	χ^2	P
Treatment		3	14.42	< 0.01
Time		2	363.46	< 0.001
Treatment	X			
Time		6	1030.44	< 0.001

Table 3. *P. chlorophthalmus* resting metabolic rate and aerobic bacteria consumption as a function of treatment and time. Analysis of deviance with Wald Chi-square tests are performed for testing the significant differences of fixed categorical variables in GLMM (N = 8 per treatment for 4 treatment groups and 3 time steps)

4.3 Metabolic markers

Mean enzyme (CS and LDH) activities in anterior gills, posterior gills and muscles for the four treatments are shown respectively in Fig.4A and 4B. Activities are expressed as μmol substrate converted to product per minute (U) per mg of protein ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{protein}$).

No significant differences were found between treatments in CS activity for anterior gills (one-way ANOVA, $F(3,35) = 0.59$, $p = 0.62$), posterior gills (one-way ANOVA, $F(3,31) = 0.23$, $p = 0.87$) and muscles (one-way ANOVA, $F(3,33) = 0.063$, $p = 0.979$). WW and Ammonia-N did not affect either LDH activities of anterior gills (one-way ANOVA, $F(3,34) = 0.38$, $p = 0.77$), posterior gills (one-way ANOVA, $F(3,30) = 1.27$, $p = 0.30$) and muscles (Kruskal-Wallis test, $H = 0.05$, $df = 3$, $P = 0.99$).

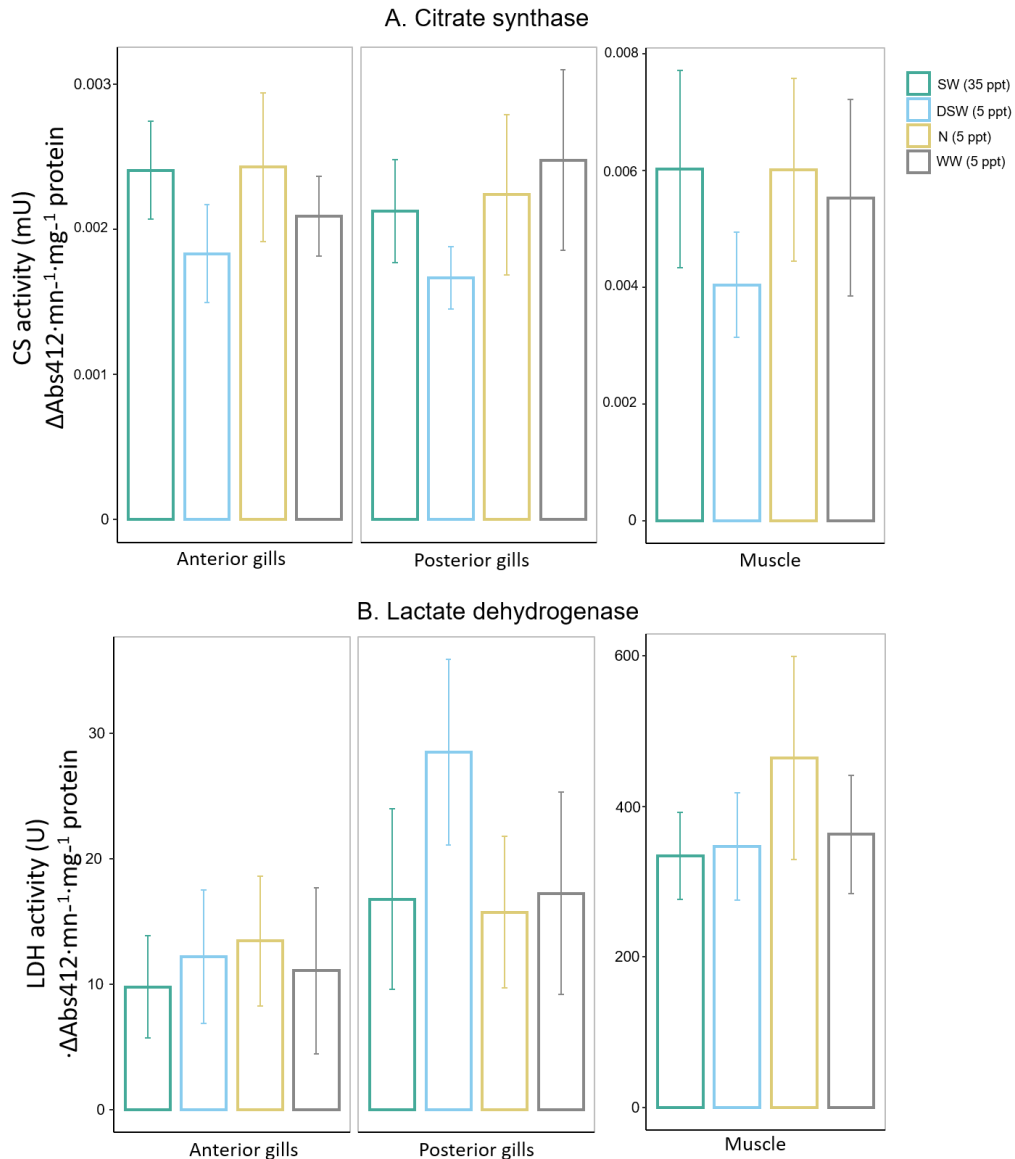


Figure 4. Activity of citrate synthase (A) and lactate dehydrogenase (B) in anterior gill, posterior gill and cheliped muscles of *P. chlorophthalmus* exposed to DSW, SW, N and WW for 6h. Values are mean \pm SE and different colours represent treatments (see legend).

5. Discussion

5.1 Locomotor behaviour and agitation: an escape response to WW and hypoxia?

According to our first hypothesis, crabs exposed to WW and ammonia-N exhibited a stimulation of their locomotor behaviour (distance moved and time spent mobile) that became significantly different from DSW and SW controls after 3h. At the beginning of the exposure (0h), no significant difference was found between the treatments and most

of the crabs seemed to be wandering or mobile (Fig.1 A, B, C). This could be explained by a potential stress coupled with an exploring activity of crabs in their new environment. After 3h exposure, the crabs were presumably able to acclimate to their environment as control DSW exposed crabs decreased significantly their locomotor behaviour and agitation at a very low rate in contrast to 0h (Table 2). This species has been described as "lethargic" (Crane, 1975), mostly feeding while standing in place unlike other fiddler crab species such as *G. vocans* and *G. tetragonon* that are more active (wandering, waving, fighting) (Weis and Weis, 2004). The behaviour that was observed in crabs in DSW and SW conditions after 3h could thus be interpreted as a return to an ecologically relevant biological rhythm.

This is not the case for WW and ammonia-N exposed crabs, which maintained a high locomotor and mobility rate at 3h with significant differences compared to DSW and SW exposed crabs. This peak activity in crabs exposed to wastewater has also been observed in mesocosms after 3h exposure, in two fiddler crabs species (Bartolini et al., 2009). This frenetic wandering, without any apparent purpose, was interpreted as an escape response from stressful conditions and the direct sewage impact such as lower salinity or pH alteration. In our study, we may rule out the salinity factor since crabs in the DSW control condition exhibited no apparent stress. Also, they mainly inhabit stream banks that can have reduced salinities, avoiding freshwater that could be deleterious. However, other factors such as hypoxic water, ammonia-N and pollutant cocktails may be noxious to organisms. Only crabs in WW showed a significant higher agitation level compared to control DSW, through the movement of their ambulatory legs and chelipeds. This could be explained by the detection of specific responses in hypoxic conditions: Taylor and Butler (1973) observed that the green crab *Carcinus maenas*, in aerated water took up resting positions with legs folded beneath them, the chelipeds lowered. However, when exposed to progressive decrease in O₂ (as is the case for WW due to aerobic bacterial consumption, see Fig.3B), they observed that crabs began to move around the tank and straightened their walking legs in order to partially emerge such as that the exhalant opening chamber of the branchial chamber become aurally exposed (Robertson et al., 2002; Taylor and Butler, 1973; Taylor et al., 1973; Zimmer and Wood, 2017). In our experiments, the water level within the arena was high enough such that crabs could not partially emerge themselves when staying in aquatic environment, but they were allowed to totally emerge their body in aerial environment. Observing the decrease in locomotor activity and agitation after 6h exposure in crabs exposed to WW and Ammonia-N (Fig.1) leading to no significant differences between treatments, a whole-body emersion was likely to happen after 6h exposure in both treatments.

5.2 Emersion behaviour: an escape strategy driven by physiological compromises under pollutant stress

Some crustaceans (amongst them, Ocypode crabs) called bimodal breathers, are able to perform gas exchange in both aquatic and aerial environments through gills and lungs (de Lima et al., 2015; deFur et al., 1988; Gray, 1957; Henry and Wheatly, 1992). This bimodal life strategy where organisms can move facultatively between aerial and aquatic media, can be seen as an adaptation to efficiently face the heterogeneity of intertidal habitats (Fusi et al., 2016). Our results showed that after 3h of exposure, crabs exposed to SW and DSW controls were mostly resting (Fig.1) indifferently between aerial and aquatic environment (Fig.2). Bimodal breathers need to maintain contact with aqueous environment even under terrestrial conditions and keep a supply of water in the branchial chamber, bathing the gills due to morphological and physiological adaptations (Henry and Wheatly, 1992; Taylor and Butler, 1973). However, several studies showed that whole body emersion behaviour happens in crabs facing hypoxia (nuanced with some species-specific responses) (Bell and Eggleston, 2005; de Lima et al., 2015; Taylor et al., 1973). Our results showed that crabs exposed to more and more hypoxic WW spend substantially more time in air as an escape behaviour with a clear preference for this environment (see Fig.2), since they are almost all emerged after 6h exposure, and they all emerged themselves at least once. This behaviour may increase the risk of predation, desiccation, oxidative stress (as a consequence of several cycles of hypoxia and reoxygenation) and troubles in releasing carbon dioxide (CO₂) and ammonia (NH₃) (de Lima et al., 2015). These last two mechanisms occur across the gills into the water, implying at least a partial reliance on the aquatic medium (Henry, 1994). This could explain why crabs exposed to ammonia-N in the present study exhibited an escape behaviour with an increase in locomotion but did not show a full emersion response since excretion of nitrogen products must occur in water (Luquet et al., 1998). However, another study revealed that acute exposure to high environmental ammonia (HEA) triggered emersion responses in the green shore crab *Carcinus maenas* at high NH₄ concentrations (4 and 10 mmol.L⁻¹ against 1 mmol.L⁻¹ in the present study). However, intertidal crabs are usually exposed to lower levels of ammonia. Weihrauch et al. (1999) proposed that the high ammonia environment (1-2 mmol.L⁻¹) in the sediment surrounding crab burrows may have driven the evolution of active ammonia excretion mechanism in crabs. This supports our hypothesis. Therefore, the hypoxic characteristic of WW may be a more acute environmental factor than the amount of ammonia-N in the water. Crustaceans are considered one of the most sensitive benthic species to hypoxia, after fishes (Bartolini et al., 2009). Long term studies showed that crabs chronically exposed to hypoxic conditions, first, decrease their activity, and then, exhibit high mortality when low oxygen concentrations are maintained (Gray et al., 2002) meaning that short-term responses observed in this study are not sustainable over time on the field.

5.3 Resting metabolic rate and metabolic markers: no switch in energy supplies

Exposure to environmental stressors such as hypoxia can increase physiological and behavioural trade-offs (Killen et al., 2012, 2011) such as increasing swimming activity to increase the probability of finding more oxygenated water, and decreasing swimming activity to lower oxygen requirements (Bushnell et al., 1984; Chapman and McKenzie, 2009; Killen et al., 2012; Lefrançois et al., 2009; Schurmann and Steffensen, 1994). Our study supports the first assumption since crabs exposed to WW increase their locomotor behaviour in order to find a more oxygenated environment during short-term WW exposure. Water is an oxygen-poor respiratory medium, thus, aquatic crustaceans must pump high volumes of water over the gills to extract enough oxygen to support metabolism (Henry, 1994). Consistently, in this study, crabs totally immersed in hypoxic WW drastically increased their resting metabolic rate with a burst in O₂ consumption observed after 6h in order to supply energy requirements (supporting our second hypothesis). Generally, organisms use two initial metabolic strategies when exposed to hypoxic conditions: an overall reduction in metabolic rate, and a shift in the aerobic and anaerobic contributions to total metabolism (Cooper et al., 2002), which was not the case for the crabs in our study. Increased respiration rate can provide adequate but very costly compensation for severe hypoxia and ammonia excretion without switching to anaerobic metabolism. Otherwise, crabs would have decreased their O₂ consumption to reduce their energy requirements (Fusi et al., 2017; Vianna et al., 2020). These results are consistent with research studies showing that most crabs do not possess efficient anaerobic metabolism (Das and Stickle, 1993) and cannot survive more than a few hours or days (depending on the species and hypoxia level) under hypoxic conditions (Diaz and Rosenberg, 1995; Penha-Lopes et al., 2009). The assessment of LDH enzymatic activity (indicator of glycolytic potential) in gills and chelipede muscles confirms this hypothesis (Fig.4B) at a lower integration level, with no change in LDH activity in crabs exposed to WW and ammonia-N (contrary to our second hypothesis). This would suggest that crabs rely on other metabolic strategies in coping with hypoxic WW (Pritchard and Eddy, 1979), sometimes by trapping an air bubble inside while sealing their burrows during high tide (de la Iglesia et al., 1994), providing them with sufficient oxygen until emersion (Penha-Lopes et al., 2009). They could also rely on the capacity to live in aerial environment rather than process to more complex physiological changes. Surprisingly (or not), no effect of WW exposure was either found in CS activity in the same organs, when this enzyme (located at the beginning of Krebs (citric acid) cycle is an indicator of an organism maximum aerobic potential (Bishop et al., 2004).

No effect of isolated ammonia-N treatment was observed (Fig.3A, Fig.4) between treatments and time in resting metabolic rate and metabolic markers experiments, supporting the fact that WW impacts result in a combination of contaminants and hypoxic

effects. The interactions between multiple stressors have been discussed and are likely more complex than a neutral additive interaction where the effects of multiple stress would be equal to the sum of each isolated stress (here, ammonia-N and hypoxic water) (Côté et al., 2016; Henry et al., 2017). For example, decreased O₂ concentrations can hinder nitrification and promote reduction of nitrate to ammonia by micro-organisms, increasing ammonia concentration particularly when nitrate concentration is high (Henry et al., 2017; Jensen et al., 1994; Navel et al., 2013), which is the case in WW. These combined, synergistic effects would explain the acute behavioural and metabolic responses observed in crabs exposed to short-term 6h WW pulse.

6. Conclusion

Behaviour and swimming performances are now well recognized as practical indicators of aquatic animals' ability to respond to environmental pollutants (Amiard-Triquet, 2009), that are often considered individually. The study of complex sewage effluents effects in intertidal environments on semi-terrestrial crustaceans induce additional considerations such as nutrient enrichment, hypoxic conditions and tides that introduce complexity in assessing the whole-effluent toxicity (Melvin, 2016) at different biological levels.

Our study showed that some mangrove crab engineer species respond to domestic WW pollution pulses with an increase in their locomotor behaviour and an emersion behaviour. This also led to a drastic increase in metabolic rate that could be caused by the combination of hypoxic water and increased ammonia toxicity and ammonia excretion related function. Exposure to Ammonia-N only triggered an increase in locomotor behaviour with no emersion behaviour and no change in resting metabolic rate, probably because crabs are adapted to high environmental ammonia levels in sediments and water. In both Ammonia-N and WW, no change in metabolic enzyme pathways have been observed (CS and LDH), implying that no switch in energy supplies occurs when crabs cope with short-term pollution pulses.

Finally, fine-scale metabolic and behavioural responses observed in WW are based on a short-term behavioural and physiological flexibility that could be deleterious when repeated in the chronic exposure context of a bioremediation site. According to Zeil and Hemmi (2006), fiddler crabs represent a society with dense population of burrow-centred, grazing foragers where each individual operates from a burrow which serves as a hub for most of its daily activities: feeding, burrow maintenance, social interactions such as mating or fighting. Within their flexible behavioural repertoire used to adapt to changing conditions, crabs have already been observed abandoning their burrows in "herds" to find better living conditions when predation risk is too high, when food lacks or in case of prolonged harassment by neighbours. The repetition of emersion behaviour, and the

chronic hypoxic conditions due to regular pulses of WW could greatly diminish the living conditions within these burrows while increasing the risk of predation and dehydration. Such disturbances in the established rhythms in crab societies could lead to massive wandering in seek of new burrows and territory. This could partly explain why large-scale changes in distribution and abundance patterns have been observed in relation to hypoxia (Bell et al., 2003), and why regular anthropogenic pollution discharges such as WW can lead to changes in crab communities *in situ* within a few years (Capdeville et al., 2018; Herteman, 2010; Penha-Lopes et al., 2009; Theuerkauff et al., 2020).

Acknowledgements

The authors are grateful to Emilie Farcy (MARBEC, University of Montpellier) for making the use of Ethovision® XT possible, Guus Bongers (Ethovision, Nantes) for his precious help in setting up the behavioural experiments and Ethovision settings, Axelle Cadière and Julien Rigaud (CHROME laboratory, Nîmes, France) for the physico-chemical analyses of the wastewater samples, to Thibaut l'Honoré (CUFR, Mayotte) for his help in laboratory experiments, to the staff of the wastewater treatment plant of Tsararano for the collection of wastewater and to Sophie Czich and Justine Courboulès for their help in the realization of the graphical abstract.

References

- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 87–110. <https://doi.org/10.1080/10807030802615543>
- Azpeitia, E., Vanegas-Pérez, C., Moreno-Sáenz, E., Betancourt-Lozano, M., Miranda-Anaya, M., 2013. Effect of chronic ammonia exposure on locomotor activity in the fiddler crab *Uca princeps* upon artificial tides and light cycles. *Biol. Rhythm Res.* 44, 113–123. <https://doi.org/10.1080/09291016.2011.652864>
- Bala Krishna Prasad, M., 2012. Nutrient stoichiometry and eutrophication in Indian mangroves. *Environ. Earth Sci.* 67, 293–299. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1508-8>
- Bartholomew, G.A., 2005. Integrative biology, an organismic biologist's point of view, in: *Integrative and Comparative Biology.* pp. 330–332. <https://doi.org/10.1093/icb/45.2.330>
- Bartolini, F., Penha-Lopes, G., Limbu, S., Paula, J., Cannicci, S., 2009. Behavioural responses of the mangrove fiddler crabs (*Uca annulipes* and *U. inversa*) to urban sewage loadings: Results of a mesocosm approach. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1860–1867. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.07.019>
- Bell, G.W., Eggleston, D.B., 2005. Species-specific avoidance responses by blue crabs and fish to chronic and episodic hypoxia. *Mar. Biol.* 146, 761–770. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1483-7>
- Bell, G.W., Eggleston, D.B., Wolcott, T.G., 2003. Behavioral responses of free-ranging blue crabs to episodic hypoxia. I. Movement. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 259, 215–225.
- Bishop, R.E., Kakuk, B., Torres, J.J., 2004. Life in the hypoxic and anoxic zones: Metabolism and proximate composition of Caribbean troglobitic crustaceans with observations on the water chemistry of two anchialine caves. *J. Crustac. Biol.* 24, 379–392. <https://doi.org/10.1651/C-2459>
- Borges, F.O., Sampaio, E., Figueiredo, C., Rosa, R., Grilo, T.F., 2018. Hypercapnia-induced disruption of long-distance mate-detection and reduction of energy expenditure in a coastal keystone crustacean. *Physiol. Behav.* 195, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.07.023>

- Brooks, M.E., Kristensen, K., van Benthem, K.J., Magnusson, A., Berg, C.W., Nielsen, A., Skaug, H.J., Mächler, M., Bolker, B.M., 2017. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *R J.* 9, 378–400. <https://doi.org/10.32614/rj-2017-066>
- Bushnell, P.G., Steffensen, J.F., Johansen, K., 1984. Oxygen consumption and swimming performance in hypoxia-acclimated rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Biol.* VOL. 113, 225–235. <https://doi.org/10.1242/jeb.113.1.225>
- Candy, S.G., 2004. Modelling catch and effort data using generalised linear models, the tweedie distribution, random vessel effects and random stratum-by-year effects. *CCAMLR Sci.* 11, 59–80.
- Cannicci, S., Bartolini, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., Litulo, C., Macia, A., Mrabu, E.J., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009. Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.021>
- Cannicci, S., Burrows, D., Fratini, S., Smith, T.J., Offenberg, J., Dahdouh-Guebas, F., 2008. Faunal impact on vegetation structure and ecosystem function in mangrove forests: A review. *Aquat. Bot.* 89, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.01.009>
- Capdeville, C., 2018. Évaluation des capacités de résistance et de résilience de l'écosystème mangrove en réponse à des apports d'eaux usées domestiques prétraitées 304.
- Capdeville, C., Abdallah, K., Buffan-Dubau, E., Lin, C., Azemar, F., Lambs, L., Fromard, F., Rols, J.L., Leflaive, J., 2018. Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. *Mar. Pollut. Bull.* 129, 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.035>
- Capdeville, C., Abdallah, K., Walcker, R., Rols, J.L., Fromard, F., Leflaive, J., 2019. Contrasted resistance and resilience of two mangrove forests after exposure to long-term and short-term anthropic disturbances. *Mar. Environ. Res.* 146, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.03.002>
- Celi, M., Filiciotto, F., Parrinello, D., Buscaino, G., Damiano, M.A., Cuttitta, A., D'Angelo, S., Mazzola, S., Vazzana, M., 2013. Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. *J. Exp. Biol.* 216, 709–718. <https://doi.org/10.1242/jeb.078865>
- Chapman, L.J., McKenzie, D.J., 2009. Chapter 2 Behavioral Responses and Ecological Consequences, in: *Fish Physiology*. Elsevier Inc., pp. 25–77.

[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00002-2)

- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 279, 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00329-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00329-5)
- Côté, I.M., Darling, E.S., Brown, C.J., 2016. Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2592>
- Crane, J., 2015. Fiddler crabs of the world: Ocypodidae: Genus *Uca*. Princeton University press, New Jersey. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(78\)90130-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(78)90130-6)
- Das, T., Stickle, W.B., 1993. Sensitivity of crabs *Callinectes sapidus* and *C. similis* and the gastropod *Stramonita haemastoma* to hypoxia and anoxia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 98, 263–274. <https://doi.org/10.3354/meps098263>
- de la Iglesia, H.O., Rodríguez, E.M., Dezi, R.E., 1994. Burrow plugging in the crab *Uca uruguayensis* and its synchronization with photoperiod and tides. *Physiol. Behav.* 55, 913–919. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90079-5)
- de Lima, T.M., Geihs, M.A., Nery, L.E.M., Maciel, F.E., 2015. Air exposure behavior of the semiterrestrial crab *Neohelice granulata* allows tolerance to severe hypoxia but not prevent oxidative damage due to hypoxia-reoxygenation cycle. *Physiol. Behav.* 151, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.07.013>
- DeFur, P.L., Pease, A., Siebelink, A., Elfers, S., 1988. Respiratory responses of blue crabs, *Callinectes sapidus*, to emersion. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 89, 97–101. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(88\)91145-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(88)91145-0)
- Delabie, J.H.C., Paim, V.R.L.D.M., Do Nascimento, I.C., Campiolo, S., Mariano, C.D.S.F., 2006. As formigas como indicadores biológicos do impacto humano em manguezais da costa sudeste da Bahia. *Neotrop. Entomol.* 35, 602–615. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000500006>
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanogr. Mar. Biol. an Annu. Rev.* Vol. 33 245–303.
- Filiciotto, F., Sal Moyano, M.P., de Vincenzi, G., Hidalgo, F., Sciacca, V., Bazterrica, M.C., Corrias, V., Lorusso, M., Mazzola, S., Buscaino, G., Gavio, M.A., 2018. Are semi-terrestrial crabs threatened by human noise? Assessment of behavioural and biochemical responses of *Neohelice granulata* (Brachyura, Varunidae) in tank. *Mar.*

Pollut. Bull. 137, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.023>

Filiciotto, F., Vazzana, M., Celi, M., Maccarrone, V., Ceraulo, M., Buffa, G., Arizza, V., de Vincenzi, G., Grammata, R., Mazzola, S., Buscaino, G., 2016. Underwater noise from boats: Measurement of its influence on the behaviour and biochemistry of the common prawn (*Palaemon serratus*, Pennant 1777). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 478, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.01.014>

Fox, J., Weisberg, S., 2019. *An R Companion to Applied Regression*, Third. ed. Sage, Thousand Oaks CA.

Fusi, M., Babbini, S., Giomi, F., Fratini, S., Daniele, F.D., Christopher, D., Mcquaid, D., Porri, F., Cannicci, S., 2017. Thermal sensitivity of the crab *Neosarmatium africanum* in tropical and temperate mangroves on the east coast of Africa. *Hydrobiologia* 803, 251–263. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3151-1>

Fusi, M., Cannicci, S., Daffonchio, D., Mostert, B., Pörtner, H.O., Giomi, F., 2016. The trade-off between heat tolerance and metabolic cost drives the bimodal life strategy at the air-water interface. *Sci. Rep.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep19158>

Gerardi, M.H., 2006. Bacterial Growth, in: *Wastewater Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 65–73. <https://doi.org/10.1002/0471979910.ch9>

Gray, I., 1957. A comparative study of the gill area of crabs. *Biol. Bull.* 112, 34–42. <https://doi.org/10.2307/1538877>

Gray, J.S., Wu, R.S.S., Ying, Y.O., 2002. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238, 249–279. <https://doi.org/10.3354/meps238249>

Halal, L.M., Ayres, B.S., Lima, T.M., Maciel, F.E., Nery, L.E.M., 2020. High temperature acclimation alters the emersion behavior in the crab *Neohelice granulata*. *J. Therm. Biol.* 91, 102617. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102617>

Hemmi, J.M., 2005. Predator avoidance in fiddler crabs: 1. Escape decisions in relation to the risk of predation. *Anim. Behav.* 69, 603–614. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.06.018>

Henry, R.P., 1994. Morphological, behavioral, and physiological characterization of bimodal breathing crustaceans. *Integr. Comp. Biol.* 34, 205–215. <https://doi.org/10.1093/icb/34.2.205>

Henry, R.P., Wheatly, M.G., 1992. Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base

- balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Integr. Comp. Biol.* 32, 407–416. <https://doi.org/10.1093/icb/32.3.407>
- Henry, Y., Piscart, C., Charles, S., Colinet, H., 2017. Combined effect of temperature and ammonia on molecular response and survival of the freshwater crustacean *Gammarus pulex*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.011>
- Herteman, M., 2010. Evaluation des capacités bioremédiatrices d'une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. <http://www.theses.fr>. Toulouse 3.
- Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L., 2011. Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol. Eng.* 37, 1283–1291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>
- Ikeda, T., 2016. Routine metabolic rates of pelagic marine fishes and cephalopods as a function of body mass, habitat temperature and habitat depth. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 480, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.03.012>
- Jensen, K., Sloth, N.P., Risgaard-Petersen, N., Rysgaard, S., Revsbech, N.P., 1994. Estimation of nitrification and denitrification from microprofiles of oxygen and nitrate in model sediment systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2094–2100. <https://doi.org/10.1128/aem.60.6.2094-2100.1994>
- Johnson, P.C.D., Barry, S.J.E., Ferguson, H.M., Müller, P., 2015. Power analysis for generalized linear mixed models in ecology and evolution. *Methods Ecol. Evol.* 6, 133–142. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12306>
- Jorgensen, B., 1997. *The theory of dispersion models*. CRC Press.
- Killen, S.S., 2014. Growth trajectory influences temperature preference in fish through an effect on metabolic rate. *J. Anim. Ecol.* 83, 1513–1522. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12244>
- Killen, S.S., Marras, S., McKenzie, D.J., 2011. Fuel, fasting, fear: Routine metabolic rate and food deprivation exert synergistic effects on risk-taking in individual juvenile European sea bass. *J. Anim. Ecol.* 80, 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01844.x>
- Killen, S.S., Marras, S., Ryan, M.R., Domenici, P., McKenzie, D.J., 2012. A relationship between metabolic rate and risk-taking behaviour is revealed during hypoxia in

- juvenile European sea bass. *Funct. Ecol.* 26, 134–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01920.x>
- Krishnamoorthy, K., Lee, M., 2014. Improved tests for the equality of normal coefficients of variation. *Comput. Stat.* 29, 215–232. <https://doi.org/10.1007/s00180-013-0445-2>
- Kristensen, E., 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J. Sea Res.* 59, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.004>
- Lee, S.Y., 2008. Mangrove macrobenthos: Assemblages, services, and linkages. *J. Sea Res.* 59, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.002>
- Lefrançois, C., Ferrari, R.S., Moreira Da Silva, J., Domenici, P., 2009. The effect of progressive hypoxia on spontaneous activity in single and shoaling golden grey mullet *Liza aurata*. *J. Fish Biol.* 75, 1615–1625. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02387.x>
- Lenth, R. V., 2016. Least-squares means: The R package lsmeans. *J. Stat. Softw.* 69. <https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01>
- Luppi, T., Bas, C., Méndez Casariego, A., Albano, M., Lancia, J., Kittlein, M., Rosenthal, A., Fariás, N., Spivak, E., Iribarne, O., 2013. The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice (=Chasmagnathus) granulata*. *Helgol. Mar. Res.* 67, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10152-012-0300-9>
- Luquet, C.M., Cervino, C.O., Ansaldo, M., Pereyra, V.C., Kocmur, S., Dezi, R.E., 1998. Physiological response to emersion in the amphibious crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae): Biochemical and ventilatory adaptations. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 121, 385–393. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10148-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10148-4)
- Manning, C., 2007. Generalized Linear Mixed Models illustrated with R 1–40.
- Melvin, S.D., 2016. Short-term exposure to municipal wastewater influences energy, growth, and swimming performance in juvenile Empire Gudgeons (*Hypseleotris compressa*). *Aquat. Toxicol.* 170, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.003>
- Navel, S., Piscart, C., Mermillod-Blondin, F., Marmonier, P., 2013. New methods for the investigation of leaf litter breakdown in river sediments. *Hydrobiologia* 700, 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1239-1>

- Naylor, E., 1997. Crab clocks rewound. *Chronobiol. Int.* 14, 427–430.
<https://doi.org/10.3109/07420529709001462>
- Ombres, E.H., Donnelly, J., Clarke, M.E., Harms, J.H., Torres, J.J., 2011. Aerobic and anaerobic enzyme assays in Southern California Rockfish: Proxies for physiological and ecological data. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 399, 201–207.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.007>
- Ouyang, X., Guo, F., 2016. Paradigms of mangroves in treatment of anthropogenic wastewater pollution. *Sci. Total Environ.* 544, 971–979.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.013>
- Pearson, T.H., Rosenberg, R., 1978. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 16, 229–311.
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Kristensen, E., Paula, J., 2009. Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1694–1703.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.015>
- Pritchard, A.W., Eddy, S., 1979. Lactate formation in *Callinassa californiensis* and *Upogebia pugettensis* (Crustacea: Thalassinidea). *Mar. Biol.* 50, 249–253.
<https://doi.org/10.1007/BF00394206>
- Rivera-Ingraham, G.A., Barri, K., Boël, M., Farcy, E., Charles, A.L., Geny, B., Lignot, J.H., 2016. Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: Is oxidative adaptation determined by gill function? *J. Exp. Biol.* 219, 80–89.
<https://doi.org/10.1242/jeb.128595>
- Robertson, R.F., Meagor, J., Taylor, E.W., 2002. Specific dynamic action in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 350–359.
<https://doi.org/10.1086/342801>
- Rodgers, G.G., Tenzing, P., Clark, T.D., 2016. Experimental methods in aquatic respirometry: The importance of mixing devices and accounting for background respiration. *J. Fish Biol.* 88, 65–80. <https://doi.org/10.1111/jfb.12848>
- Schurmann, H., Steffensen, J., 1994. Spontaneous Swimming Activity of Atlantic Cod *Gadus Morhua* Exposed To Graded Hypoxia At Three Temperatures. *J. Exp. Biol.* 197, 129–142. <https://doi.org/10.1242/jeb.197.1.129>
- Shchegolkova, N.M., Krasnov, G.S., Belova, A.A., Dmitriev, A.A., Kharitonov, S.L.,

- Klimina, K.M., Melnikova, N. V., Kudryavtseva, A. V., 2016. Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions. *Front. Microbiol.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00090>
- Stillman, J.H., Barnwell, F.H., 2004. Relationship of daily and circatidal activity rhythms of the fiddler crab, *Uca princeps*, to the harmonic structure of semidiurnal and mixed tides. *Mar. Biol.* 144, 473–482. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1213-6>
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1995. Mangrove soils as sinks for wastewater-borne pollutants. *Hydrobiologia* 295, 231–241. <https://doi.org/10.1007/BF00029130>
- Taylor, EW and Butler, P., 1973. The behaviour and physiological responses of the shore crab *Carcinus maenas* during changes in environmental oxygen tension. *J. Sea Res.* 505, 496–505.
- Taylor, E.W., Butler, P.J., Sherlock, P.J., 1973. The respiratory and cardiovascular changes associated with the emersion response of *Carcinus maenas* (L.) during environmental hypoxia, at three different temperatures. *J. Comp. Physiol.* 86, 95–115. <https://doi.org/10.1007/BF00702531>
- Theuerkauff, D., 2019. Effets des rejets d'eaux usées domestiques sur la physiologie et l'écologie des crabes de mangrove, Sesamidae et Ocypodidae, <http://www.theses.fr. Montpellier>.
- Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Lambert, S., Mercky, Y., Lejeune, M., Lignot, J.H., Sucré, E., 2020a. Wastewater bioremediation by mangrove ecosystems impacts crab ecophysiology: In-situ caging experiment. *Aquat. Toxicol.* 218, 105358. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105358>
- Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Lambert, S., Mercky, Y., Lejeune, M., Lignot, J.H., Sucré, E., 2020b. Wastewater bioremediation by mangrove ecosystems impacts crab ecophysiology: In-situ caging experiment. *Aquat. Toxicol.* 218, 105358. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105358>
- Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Mercky, Y., Lejeune, M., Lignot, J.H., Sucré, E., 2018. Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: Integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species. *Aquat. Toxicol.* 196, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.003>
- Thurman, C.L., 2004. Unravelling the ecological significance of endogenous rhythms in intertidal crabs. *Biol. Rhythm Res.* 35, 43–67. <https://doi.org/10.1080/09291010412331313232>

- Ungherese, G., Ugolini, A., 2009. Sandhopper solar orientation as a behavioural biomarker of trace metals contamination. *Environ. Pollut.* 157, 1360–1364. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.038>
- Vianna, B. da S., Miyai, C.A., Augusto, A., Costa, T.M., 2020. Effects of temperature increase on the physiology and behavior of fiddler crabs. *Physiol. Behav.* 215, 112765. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112765>
- Wear, R.J., Tanner, J.E., 2007. Spatio-temporal variability in faunal assemblages surrounding the discharge of secondary treated sewage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.03.008>
- Weihrauch, D., Becker, W., Postel, U., Luck-Kopp, S., Siebers, D., 1999. Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. *J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 169, 25–37. <https://doi.org/10.1007/s003600050190>
- Weis, J.S., Weis, P., 2004. Behavior of four species of fiddler crabs, genus *Uca*, in southeast Sulawesi, Indonesia. *Hydrobiologia* 523, 47–58. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000033093.84155.1d>
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., Shipin, O. V., 2009. Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol. Eng.* 35, 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.021>
- Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., Lan, C.Y., 1997. Mangrove wetlands as wastewater treatment facility: A field trial. *Hydrobiologia* 352, 49–59. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5234-1_6
- Wood, C.M., Randall, D.J., 1981. Haemolymph gas transport, acid-base regulation, and anaerobic metabolism during exercise in the land crab (*Cardisoma carnifex*). *J. Exp. Zool.* 218, 23–35. <https://doi.org/10.1002/jez.1402180104>
- Xiang, H., Li, K., Cao, L., Zhang, Z., Yang, H., 2020. Impacts of pollution, sex, and tide on the time allocations to behaviours of *Uca arcuata* in mangroves. *Sci. Total Environ.* 742, 140609. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140609>
- Zeil, J., Hemmi, J.M., 2006. The visual ecology of fiddler crabs. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 192, 1–25. <https://doi.org/10.1007/s00359-005-0048-7>
- Zhang, Z.W., Xu, X.R., Sun, Y.X., Yu, S., Chen, Y.S., Peng, J.X., 2014. Heavy metal and organic contaminants in mangrove ecosystems of China: a review. *Environ. Sci.*

Pollut. Res. 21, 11938–11950. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3100-8>

Zimmer, A.M., Wood, C.M., 2017. Acute exposure to high environmental ammonia (HEA) triggers the emersion response in the green shore crab. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 204, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.008>

Zuur, A.F., Hilbe, J.M., Ieno, E.N., 2013. *A Beginner's Guide to GLM and GLMM with R*, Beginner's Guide Series. Highland Statistics Limited.

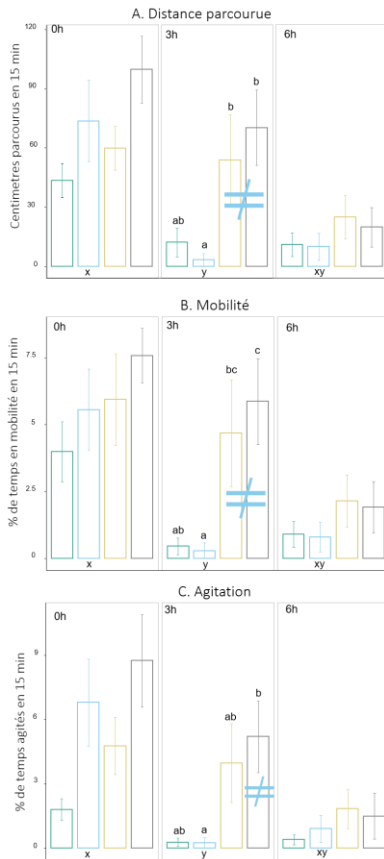
Chapitre 2 - Conclusions



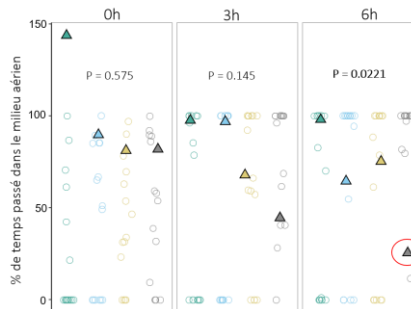
Paraleptuca chlorophthalmus

Résultats :

Traits comportementaux



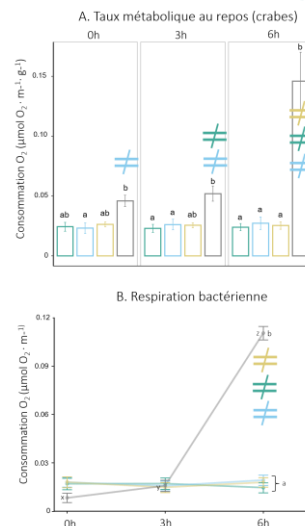
Emerision - Immersion



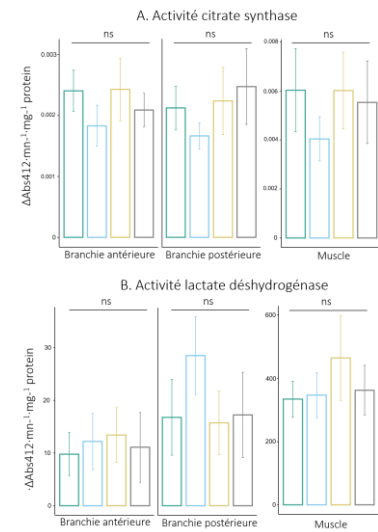
Légende

- Eau douce (0.5 ppt)
- Ammonium 10 mg·l⁻¹ (0.5 ppt)
- Eau usée prétraitée
- ≠ Diff. significative entre conditions (couleur)

Consommation d'O₂



Marqueurs métaboliques



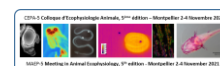
Points à retenir

- Les crabes exposés à l'eau usée montrent un **comportement d'évitement** (mobilité, agitation) conduisant à une **émersion** de quasiment tous les crabes vers le **milieu aérien** après 6h.
- A l'inverse, les crabes exposés à l'eau de mer diluée deviennent « **léthargiques** » après 3h, et choisissent un milieu **sans préférence détectable** (la tendance est la même pour l'eau de mer, mais non significative).
- **L'eau usée** provoque également une **hausse rapide et très forte du taux métabolique**, comme cela avait été mesuré chez *T. urvillei* (Theuerkauff et al., 2018). La **consommation bactérienne augmente** aussi très rapidement, entraînant une **hypoxie progressive** dans l'eau usée.
- Ce caractère hypoxique semble représenter sa caractéristique la **plus délétère pour les crabes**, car les mêmes effets ne sont **pas observés en ammonium**. **Aucun changement** dans les marqueurs du **métabolisme aérobie et anaérobie** n'a été détecté.
- Les crabes développent des **réponses comportementales et métaboliques** à très court terme lorsqu'ils sont exposés à l'eau usée. Une **émersion hors des terriers** est fortement probable lors des épisodes de pollution sur le terrain. La **viabilité** d'une telle stratégie de **manière chronique** est questionnable : risques de prédation ? Dessiccation ? Effets sur le long terme ?

Communications orales :

Society for Experimental Biology 2021 - Online

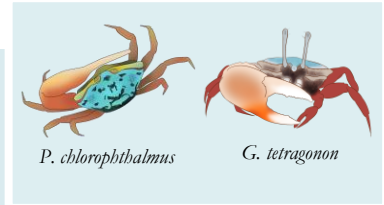
Congrès d'écophysiologie animale (CEPA) – Montpellier 2021



Chapitre 3

Réponses physiologiques
de deux espèces de
crabes en mangrove
pristine et anthropisée
face à une simulation
d'apports anthropiques.

Chapitre 3 – Présentation



Contexte :

Nous l'avons vu, les crabes de mangrove peuvent être étudiés comme **témoins précoces** de modifications des écosystèmes face à des pollutions. Nous avons eu la possibilité d'étudier une **mangrove insulaire** considérée comme **pristine**, sur l'île Europa au Sud du Canal du Mozambique. L'étude des écosystèmes pristines est fondamentale dès lors qu'on s'intéresse **aux enjeux de conservation** et à l'évaluation des risques environnementaux de ces écosystèmes, mais aussi des écosystèmes connaissant une anthropisation grandissante.

L'île d'Europa constitue ainsi un **site « témoin »** en termes de **fonctionnement écosystémique**, permettant de mieux comprendre les modifications des mangroves insulaires sous pressions anthropiques.

Ainsi, nous avons souhaité étudier la potentielle **vulnérabilité différentielle** des crabes des mangroves d'Europa et de Mayotte face à un scénario d'anthropisation simulé: apport d'eau douce et d'ammonium. Nous avons prélevé deux espèces de crabes violonistes dans le milieu naturel : *Gelasimus tetragonon* (Europa) et *Paraleptuca chlorophthalmus* (Mayotte). Elles occupent toutes les deux des faciès de mangrove à canopée ouverte (*R. mucronata* et *C. tagal*), le long des chenaux de marée. Les crabes ont été exposés en conditions contrôlées **sur les deux îles** en installant notamment un laboratoire sur **l'île inhabitée d'Europa** : osmorégulation, consommation d'oxygène et marqueurs histologiques des branchies et de l'hépatopancréas ont été étudiés.

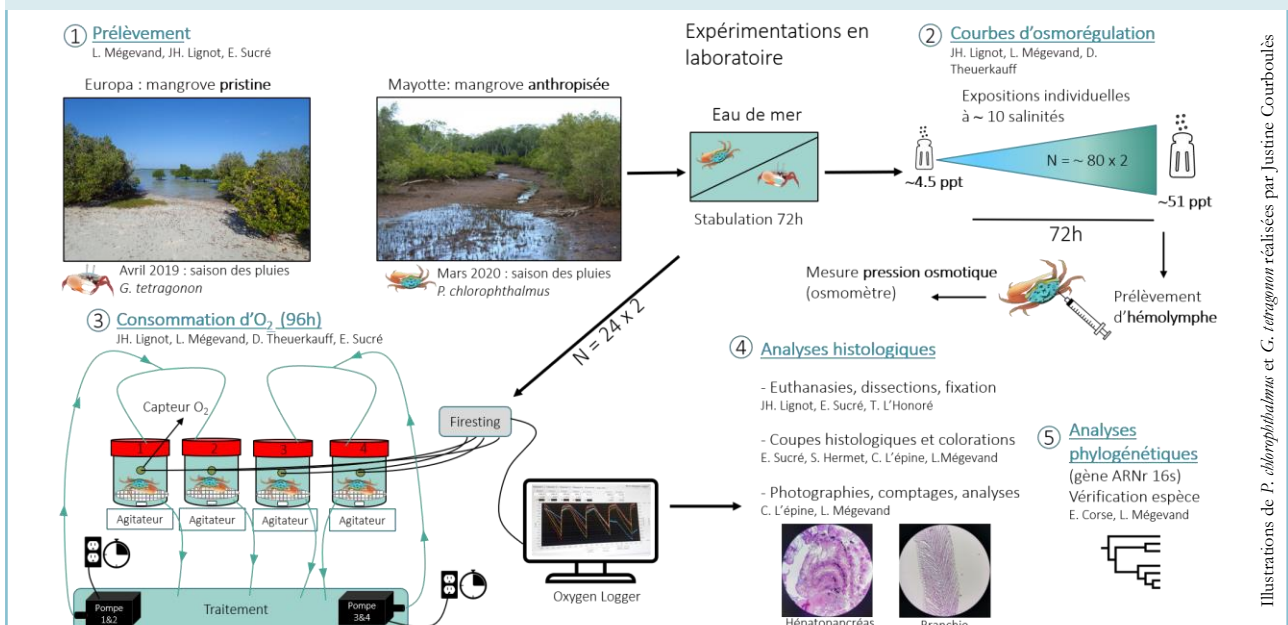
Questions :

- 1 – Existe-t-il une vulnérabilité différentielle des crabes d'Europa et de Mayotte face à l'apport d'eau douce et d'ammonium (proxy d'un enrichissement d'origine anthropique) ?
- 2 – Les crabes de Mayotte, plus régulièrement exposés à l'eau douce et à des eaux usées domestiques, développent-ils des acclimations physiologiques spécifiques ?

Méthodologies :

Les expérimentations ont été réalisées sur chacun des sites d'étude. Nous avons étudié la capacité osmorégulatrice des crabes en les exposant individuellement à des salinités différentes permettant de générer les courbes d'osmorégulation.

Nous avons ensuite exposé des individus durant 96h à de l'eau de mer, de l'eau de mer diluée (5 ppt) et une solution d'ammonium (5 ppt), en mesurant leur consommation d'O₂ à différents pas de temps. A la fin des 96h, un prélèvement d'hémolymphe a été réalisé afin de comparer les capacités osmorégulatrices entre conditions. Les crabes ont ensuite été euthanasiés, disséqués et fixés afin de réaliser des analyses histologiques sur les branchies postérieures et l'hépatopancréas. Des analyses phylogénétiques ont également été réalisées afin de confirmer l'identification des espèces étudiées.



Diluted seawater and Ammonia-N tolerance of two mangrove crab species. New insights to understand the vulnerability of pristine islands ecosystems.

Soumis à *Frontiers in Ecology and Evolution*

Décembre 2021

Laura Mégevand¹, Dimitri Theuerkauff², Claire L'épine¹, Sophie Hermet¹, Emmanuel Corse^{1,3}, Thibaut l'Honoré³, Jehan-Hervé Lignot¹, & Elliott Sucre^{1,3}.

¹ MARBEC, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, Montpellier, France

² Station de Recherche Océanographiques et Sous-marines STARESO, Punta Revellata, 20260 Calvi, France

³ Centre Universitaire de Formation et de Recherche de Mayotte (CUFR), 97660 Dembeni, Mayotte, France

* Corresponding author at: UMR MARBEC (University of Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD), Montpellier, France. E-mail address: laura.megevand@umontpellier.fr (L. Mégevand).

Abstract

Mangrove ecosystems are the primary receptors of anthropogenic pollution in tropical areas. Assessing the vulnerability of these ecosystems can be expressed, among other indicators, by studying the health of ‘ecosystem engineers’. In this study, mangrove forests facing opposing anthropogenic pressures were studied i) in the uninhabited island of Europa (Mozambique Channel), considered as a pristine ecosystem, and, ii) on the island of Mayotte, facing regular domestic wastewater discharges. Using an ecophysiological approach, the effects of diluted seawater (DSW) and increased ammonia-N were studied for two fiddler crab species: *Gelasimus tetragonon* (GT) on the island of Europa and *Paraleptuca chlorotphthalmus* (PC) on the island of Mayotte. Osmoregulation curves and osmoregulatory capacity were determined along with O₂ consumption rates after a 96h exposure period. Histological analyses were also carried out on two important metabolic organs: the hepatopancreas and the posterior gills.

Results indicate that both crab species are good hyper-hypo-osmoregulators but only PC can maintain its osmoregulatory capacity when exposed to ammonia-N. Oxygen consumption is increased in GT after 96h of exposure to ammonia-N but this does not occur in PC. Finally, a thickening of the gill osmoregulatory epithelium was observed after 96h in PC when exposed to ammonium but not in GT.

Therefore, the two species do not have the same tolerance to DSW and increased ammonia-N. PC that is more exposed to chronic inputs of freshwater and effluents in its natural environment, develop physiological acclimation capacities in order to better manage nitrogenous enrichments. These results along with those from other studies regarding the effects of domestic effluents on mangrove crabs are discussed. Therefore, the greater vulnerability of organisms occupying pristine ecosystems could induce major changes in mangrove functioning if crabs, that are engineer species of the ecosystem, are about to reduce their bioturbation activity or, even, disappear from the mangrove forests.

Keywords

Crustacea

Pristine ecosystems

Biomarkers

Metabolism

Ammonia-N

Mangrove

Introduction

Ecological and ecosystem vulnerability assessment may represent a valuable tool in biodiversity risk management (De Lange et al., 2010). From the definition of Ippolito et al. (2010), ecosystem vulnerability may represent “the potential of an ecosystem to modulate its response to stressors over time and space, where that potential is determined by characteristics of an ecosystem vulnerability that include many levels of organization”. Ecosystem vulnerability assessment may be expressed with a level of potential impact related to a certain stressor in a given environment: “the actual status of a polluted ecosystem or community represents the response of a (more or less) pristine ecosystem or community to a specific stressor or to multiple stressors” (De Lange et al., 2010). The authors, thus, state that combining the assessment of vulnerability of a pristine ecosystem or community with the actual status allows obtaining crucial information for risk management.

Among vulnerable ecosystems, mangrove forests that thrive in intertidal areas are typically subjected to a variety of stressors, both natural and anthropogenic. These include high levels of pollutants and nutrients, severe hypoxia, high water turbidity, and fluctuations in temperature and salinity. Mangroves are significant ecosystems to study given their ecological importance in tropical areas. They accomplish a wide range of key ecosystem functions such as carbon storage, nutrient and global carbon cycling, provide breeding, recruitment, nursery and feeding areas both terrestrial and aquatic fauna (Amaral et al., 2009; Cannicci et al., 2009; Lugendo and Kimirei, 2021; Nagelkerken et al., 2008). Also, mangrove forests form a buffer zone protecting the shoreline against erosion and watershed (Ouyang and Guo, 2016; Zhang et al., 2012).

Located at the land-sea interface, mangroves are the receptacle of anthropogenic activities such as aquaculture, agriculture, urbanization, tourism or coastal pollution (Alongi, 2002; Lugendo and Kimirei, 2021; Thomas et al., 1996; Xiang et al., 2020).

Nitrogen inputs and the altered global cycle of N are one of the most important concerns about anthropogenic presence and activities (Vitousek et al., 1997). Human alterations of the nitrogen cycle can lead, amongst others, to changes in the composition and functioning of estuarine and nearshore systems, with accelerated losses of biological diversity (Nixon, 1995; Nixon et al., 1996; Vitousek et al., 1997). It has been predicted that tropical regions will receive the most dramatic increases in reactive N (Nr) inputs over the next few decades (Galloway et al., 2008; Zhu et al., 2005). In this context, our study aims at comparing some features of ecosystem vulnerability in both pristine and anthropized mangrove ecosystems.

Europa island (22° 20' S, 40° 22' E) is the southernmost island of the Mozambique Channel. It is considered a pristine ecosystem as there is no permanent human settlement, making it a prime candidate for marine conservation (O'Donnell et al., 2017). Europa

island is a low-lying (7 meters elevation), coral island of 28 km² surrounded by sand dunes. A shallow lagoon, almost empty at low tide, is located on the north-western part of the island. It is fringed with 626 ha of mangrove forest (Boulet, 2014; Juhel et al., 2019).

Mayotte island (12°50'S 45°08'E) is a tropical island (374 km²) situated in the Comoros Archipelago, in the northern part of the Mozambique Channel. On this island, the mangrove forest covers **about** 700 ha of the territory (Jeanson et al., 2019). Large ecological gradients are encountered in Mayotte rivers and mangroves, one of the main anthropogenic pressures being the lack of connection between households and the sewage systems. Therefore, domestic wastewater is often discharged directly into rivers and mangroves (Capdeville, 2018; Herteman, 2010; Vasselon et al., 2017). Furthermore, the island of Mayotte possesses a fast growth of its human population, especially over the last two decades resulting in an exponential increase in anthropogenic pressures and degradations of its marine environment (Pusineri et al., 2014).

Studying ecosystem vulnerability in response to stressors must take into consideration indicators of ecosystem functioning, including early warning, diagnostic and retrospective indicators. Aquatic organisms including crustacean species, are frequently studied as early warning indicators of changes in environmental conditions (Burger, 2006; Ungherese and Ugolini, 2009). Some ecological functions provided by these species, such as ecosystem engineering, have also been identified (Brodie et al., 2018) as key elements to incorporate into conservation planning (see Coggan et al., 2018 for a review). Ecosystem engineers are species whose actions have “significant impacts” upon the physical structure of their habitat and the organisms that live in them (Jones et al., 1994). Amongst them, we find burrowing mangrove fiddler crabs, considered as ecosystem engineers through their bioturbation activity (Kristensen, 2008; Kristensen et al., 2012; Penha-Lopes et al., 2009). Their activity briefly consists in burying, macerating and ingesting litter as well as actively digging and maintaining burrows in the sediment (Dittmann, 1996; Emmerson and McGwynne, 1992; Giddins et al., 1986; Kristensen and Alongi, 2006; Lee, 1997).

In view of these elements, it appears relevant to study mangrove crabs living on the two islands that experience opposite human pressures. We chose to focus on two ecologically, morphologically and phylogenetically proximate species of Ocypodids: *Paraleptuca chlorophthalmus* (PC) from the island of Mayotte and *Gelasimus tetragonon* (GT) from the island of Europa. These species are the most abundant in semi-open canopy habitats situated near tidal rivulets of the two mangroves studied, where a high density of burrows (that originates from bioturbation activity) is observed. These habitats are the first receptors of anthropogenic spillages in the island of Mayotte. Salinity variations throughout freshwater inputs and high levels of nutrients are two key stressors in such context. On the island of Europa, rainfall is the only source of freshwater, with a mean annual rainfall of 540 mm/year and a long dry period of seven months in a semi-arid climate (Boulet, 2014;

Lambs et al., 2016). Therefore, GT lives under strong marine influence, mostly in seawater and oligotrophic conditions. On the island of Mayotte, 24 permanent rivers reaching the sea have been listed (Lapègue, 1999), with a watershed area ranging from 2 to 23 km² (Lagarde et al., 2021). Therefore, PC is frequently experiencing salinity variations and osmotic changes under mesotrophic or eutrophic conditions, especially in anthropized areas.

In habitats with frequently changing environmental conditions (such as mangrove forests), organisms are exposed to multiple stressors that can neutrally, synergistically or antagonistically interact (Piggott et al., 2015; Renault et al., 2018). In order to maintain functional homeostasis, phenotypic adjustments may be expressed during the life history of an individual, ranging from physiological adjustments (acclimation) (Teets and Denlinger, 2013) to phenological changes and range shifts (Briscoe et al., 2012; Chuine, 2010; Renault et al., 2018). In some cases, these exogenous factors can generate physiological evolutionary changes because of genetic modifications (adaptation). This study does not aim to determine any potential environmental adaptation in the event that different sensitivities are observed between crab populations, and this should remain a working hypothesis only.

Considering these elements, we chose to study physiological endpoints on different levels of biological organization to assess the potential effects of salinity variations and short-term exposures to ammonia-N on the two crab species. Physiological biomarkers such as osmoregulatory capacity (the difference between hemolymph osmotic pressure and that of the external medium, OC), oxygen consumption and histological changes have been widely studied and proved to be informative proxies of crustacean responses to environmental changes such as salinity variations and ammonia-N inputs (Gillikin et al., 2003; Lignot et al., 2000; Ortega et al., 2017; Ros et al., 2021; Theuerkauff et al., 2018b, 2018a). Resting metabolic rate is also considered as physiologically relevant (Borges et al., 2018; Ikeda, 2016) to assess the potential effects of an osmotic shock or ammonia-N exposure on crabs, independently from a potential locomotor or escape behaviour.

Therefore, could GT (on the island of Europa) and PC (on the island of Mayotte) show different physiological tolerances to basic anthropogenic pressures, here: salinity reduction and high ammonia-N inputs)? The working hypothesis is that vulnerability to diluted seawater and ammonia-N inputs must be different for the two species. Specifically: 1) PC must have a good tolerance capacity to reduced salinity and increased ammonium input within a short-term acclimation period; 2) GT, that is never exposed to eutrophic water and rarely to diluted seawater in the field, must be vulnerable to anthropogenic discharges and salinity decrease; 3) there should be deleterious effects of Ammonia-N on osmoregulatory processes (aggravating factor) for both species since ammonia-N is known to disrupt physiological processes such as osmoregulation, immunology, acid/base balance

and gas exchange in Decapod crustaceans (Romano and Zeng, 2013; Weihrauch et al., 2004).

In the present study, crabs were collected from pristine (Europa - GT) and impacted (Mayotte - PC) mangroves and were artificially exposed to diluted seawater (5 ppt) and Ammonia-N (10 mg.L^{-1}), a proxy of anthropogenic presence. Several biomarkers were considered in order to: i) define the salinity tolerance range of the two species (osmolality curves), ii) understand whether eutrophication can have an impact on the crab ability to maintain its hydromineral balance (osmoregulatory capacity), and, iii) determine whether short-term acclimation (oxygen consumption and histological analyses) can occur to cope with eutrophication. If GT was found to be vulnerable to freshwater and Ammonia-N, what would be the consequences in terms of vulnerability to anthropogenic pressure for the pristine mangroves of the island of Europa? What could the consequences be in terms of risk assessment?

2. Materials & Methods

2.1 Study sites

1. Europa Island -The sampling site is mainly constituted of shrubby *Rhizophora mucronata* on coral mud with a sandy-silty texture, in an almost open canopy (Fig.1), near tidal channels and rivulets.

2. Mayotte Island - The study site is located in Boueni bay ($12^{\circ}55'1''\text{S}$, $45^{\circ}9'23''\text{E}$) in the mangrove of Malamani, extending along both sides of a freshwater stream. On this site, vegetation structure is mainly represented by *Ceriops tagal* and *R. mucronata facies*, along with *A. marina* and *B. gymnorhiza* species. This open habitat presents no canopy cover, a large temperature gradient and regular water immersion/emersion, depending on the season, tides and time of the day. Malamani is part of the Chirongui area in the bay of Boueni, which had a human population density of 310 hab./km^2 in 2017.

A total of 30 crabs (15 from Europa and 15 from Mayotte) used during experiments were randomly chosen for DNA sequencing to confirm their taxonomical identification through a classical barcoding process (see additional file 1).

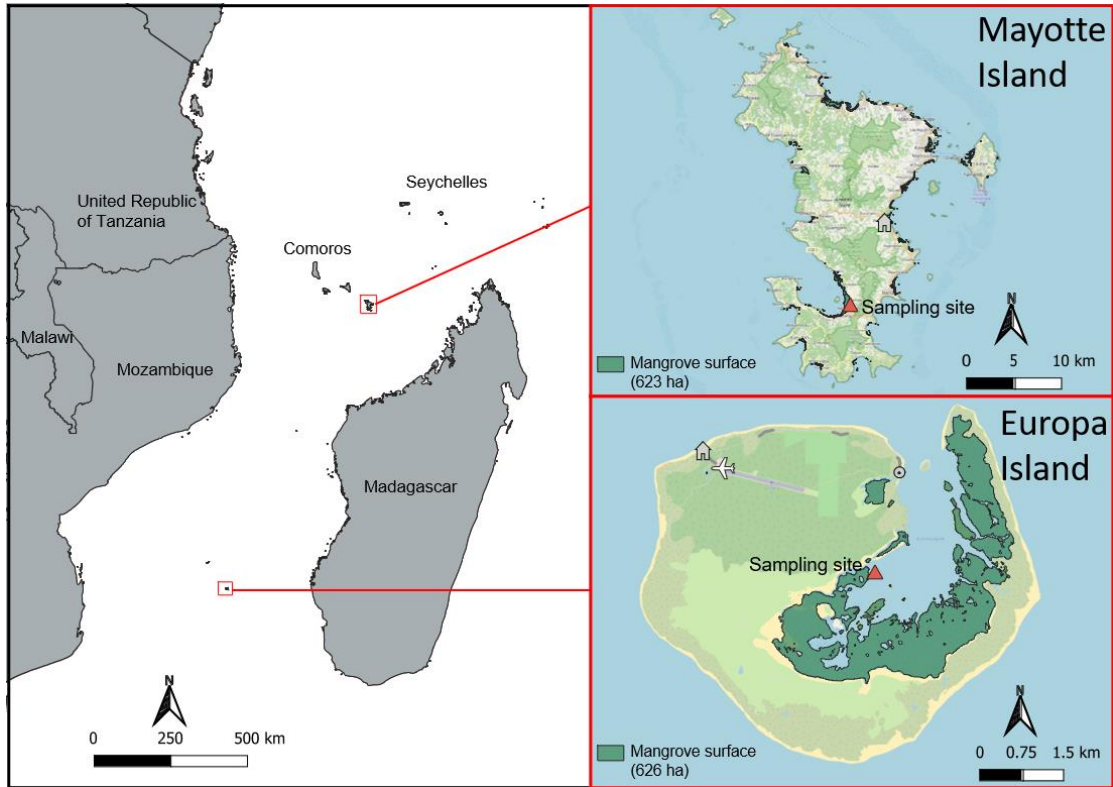


Fig. 1: Localization of Mayotte Island and Europa Island in the Mozambique Channel with the sampling sites.

2.2 Animal collection and acclimation

Male and female GT and PC were collected in April 2019 and March 2020, respectively, in the mangroves of Europa and Mayotte (Malamani area) (see Fig.1 for the sampling site). All animals were hand collected at low tide when crabs are active and out of their burrows. They were placed into individual bags or boxes in order to minimize stress and fights during transport to the laboratory (either the field laboratory on Europa Island, or the CUFRR marine laboratory at the University Center of Mayotte). Animals (~130 for PC, ~100 for GT) were placed for three days for acclimation in individual boxes containing natural filtered seawater (~33‰ salinity; $1050 \text{ mOsm.kg}^{-1}$), under a natural photoperiod (12h light: 12h dark) and without feeding prior to experimentation.

For the osmoregulation experiment, ~100 PC were studied ($N = 10$ per salinity) in Mayotte and ~70 GT were studied ($N = 4-8$ per salinity) in Europa Island. Sampling size was limited here due to the pristine nature of the ecosystem and legal environmental protection requirements. For the respirometry and osmoregulatory capacity, 24 crabs were studied for each species. No mortality was observed during acclimation and experimental processes for PC (Mayotte). No mortality was observed during acclimation for GT (Europa), but one female died after 72h of ammonia-N exposure.

2.3 Ammonia-N exposure and experimental conditions

Three different experimental conditions were performed: some crabs were maintained in seawater (~33 ppt), others were transferred to diluted seawater (~5 ppt) or to 10 mg.l⁻¹ ammonia-N solution (hereafter noted respectively SW, DSW and N exposure). This solution was prepared by adding 1 mmol of ammonium chloride (Sigma, USA) to diluted seawater (~5 ppt). Ammonia-N was chosen as experimental treatment because the ionized form of ammonia-N (NH₄⁺) is the major component of domestic WW (Capdeville et al., 2018, Mégevand et al., 2021, submitted). This condition refers to total ammonia (ammonia-N). It represents the sum of unionized ammonia NH₃ and ionized ammonia NH₄⁺ (Bermudes and Ritar, 2008; Haywood, 1983; Lemarié et al., 2004). The ammonia-N concentration was chosen on the basis of concentrations that may be released by treatment plants in Mayotte (Herteman, 2010). It corresponds to a sub-lethal concentration for a fiddler crab species such as *U. princeps*, adults sharing similar size and morphology with *P. chlorophthalmus* (Azpeitia et al., 2013). Ammonia-N exposure solutions were replaced every day. Salinity of SW and diluted seawater (DSW) were tested every day and readjusted if needed.

2.4 Osmolality curves

To determine osmolality curves, crabs were exposed at different salinities with 4-8 crabs per salinity for GT, and 8-10 crabs per salinity for PC. Salinity ranged from DSW (~4.5 ppt, ~135 mOsm.kg⁻¹) to concentrated SW (~51 ppt, ~1510 mOsm.kg⁻¹). Animals were maintained in isolated boxes for a minimum of 72h, which is sufficient time for osmoregulation to be achieved in such estuarine crustacean species (Lovett et al., 2001; Rivera-Ingraham et al., 2016). After this period, a hemolymph sample was taken using a 0.1-0.5 ml hypodermic syringe with the needle inserted between the cephalotorax and the third and fourth pereopod. Osmotic pressure (OP) of the hemolymph samples was immediately quantified in duplicate by freezing point depression osmometry (Model 3320, Advanced Instruments, Inc., Norwood, MA, USA).

At the end of this experiment, animals were put back in individual boxes in aerated SW before being released into the mangrove.

2.5 Oxygen consumption rate

The experimental design consisted in a static, intermittent flow-through respirometry system based on Clark et al. (2013). Crabs were individually placed into 125 ml chambers allowing them to make sporadic movements considering their size, while ensuring accurate measurements of O₂ consumption. Following procedures described in Killen (2014), O₂ measurements were performed using a 4-channel fiber-optic system with contactless O₂

sensor spots (FireSting O₂, PyroScience, GmbH, Aachen, Germany) where water oxygen content was quantified once every 5 seconds.

Water-mixing within the chambers was achieved with magnetic stirrers located under 1 mm² mesh grid to avoid too much disturbance (Rivera-Ingraham et al., 2016). Sensors were calibrated to 100 % and 0 % air saturation using air-saturated water and 80mM Na₂SO₃ solution, respectively. Chambers were filled with a tubing system providing control SW, DSW or contaminated water from aerated, filtered and temperature-controlled tanks (~25°C). Crabs were gently introduced in the chambers and left to acclimate for one hour in aerated seawater prior experiment.

Following acclimation, the system was filled with the exposure solution. A flush pump was switched on for 20 minutes to ensure proper mixing and was cut off during 40 minutes. During that time, the chambers were sealed. The decrease in oxygen content could be analysed to indicate the rate of oxygen uptake. After the 40-minute cycle, the pump was turned on to flush the metabolic chambers with aerated seawater (or DSW or DSW enriched with ammonia-N) during 20 minutes. Due to the presence of aerobic and anaerobic microorganisms capable of degrading organic compounds and consuming O₂ (Shchegolkova et al., 2016), a 20 minutes flushing was run to ensure 99 % air saturation. The 40 minutes measurements allowed to make accurate O₂ measurements without falling under the threshold of 70 % air saturation in order to maintain aerobic metabolism and to avoid hypoxic stress (Ombres et al., 2011; Rodgers et al., 2016). O₂ measurements were taken at T-1h (SW), T1h, T24h and T96h after exposure (SW, DWS or DSW with ammonia-N) for all individuals (N = 8 per condition). One female *GT* exposed to ammonia-N died after 72h of exposure.

2.6 Osmoregulatory capacity

At the end of the 96h respirometry exposure, a hemolymph sample from each animal (N = 7-8 per condition) and OP was assessed as described above (2.5).

2.6 Sampling and dissections

Following the 96h respirometry experiment, crabs were anesthetized and euthanized on ice for tissue sampling of the hepatopancreas, anterior and posterior gills in order to perform the histology measurements. Half of the samples was fixed in Bouin's fixative solution for 48h for histological analyses. The other half was flash frozen in liquid nitrogen and conserved separately at -80 °C in 1.5-ml tubes for enzymatic assays. This stage was verified through epipodite examination under a dissecting microscope after dissection to avoid handling-associated stress on the biological markers considered.

2.7 Histological and SEM analysis

For histological analyses, posterior gills (pair 7 or 8) and small samples of the hepatopancreas were rinsed in 70 % ethanol following immersion in Bouin's fixative solution for 48h. They were then dehydrated in a series of graded alcohols and embedded in paraffin. Tissue sections (4 μm) were cut with a Microtome 2125RT Leica, then placed on Glycerin albumin precoated glass slides and deparaffinated. They were stained following Masson's Trichrome Staining Protocol (Martoja and Martoja-Pierson, 1967) using Haematoxylin Groat, Fuschine Ponceau and Aniline Blue staining solutions. Samples were examined using Leica DM6 microscope equipped with a Leica DMC 2900 and the associated software LAS X.

For the hepatopancreas analyses, pictures of the hepatopancreas for each individual were taken, each of them depicting 1 to 4 tubules. Images were scaled and analyzed using ImageJ software (version 1.51r). Tubules of the hepatopancreas were randomly selected for each individual. Four parameters were measured on each of those hepatopancreas tubules and, then, averaged for each individual (N = 3-8): the area of the tubules, the number of vacuoles per tubule, the area of the B-cell vacuoles, the percentage of B-cell vacuolization area per tubule. Posterior gill epithelial thicknesses were measured from areas where nuclei were visible using a x40 objective. Along this single-layered epithelium, cell heights were systematically measured from the base of the cuticle to the basal side of the cells facing the hemolymph lacuna. For statistical purposes, gills were divided into three sections along longitudinal (basal, central and apical) and transversal axes (proximal, middle and distal). For each of these areas, photographs were taken at the same magnification (x60) using the CapturePro software. Measurements of epithelial gill thickness were then performed using Image as well.

3. Statistical analysis

Statistical analyses were performed in R version 3.5.2 with Rstudio version 0.99.491 (Rstudio, Inc), with statistical significance being assigned at $\alpha = 0.05$. For osmoregulatory capacity and gills epithelial thickness, residuals were evaluated using Shapiro-Wilk and Levene's test respectively in order to test the data normal distribution behaviour and variance homogeneity. One-way ANOVAs were performed separately for posterior gills at each longitudinal level (apical, central, basal) to assess potential differences of epithelial thickness between treatments (SW, DSW, N) after 96h exposure. To test potential effects of treatment on hepatopancreas parameters, we used generalized mixed-effects modelling with treatment as random effects (Johnson et al., 2015; Manning, 2007; Zuur et al., 2013) using the package glmmTMB (Brooks et al., 2017). The number of vacuoles per tubule, the mean area of the B-cell vacuoles per tubule, the percentage of B-cell vacuolization area

per tubule in hepatopancreas were modelled in function of treatment (three-levels fixed factor) assuming a Gaussian distribution error with log link. Individual differences and repeated measurements among crabs and tubules were taken into account through a random intercept of tubule ID nested into crab ID. Then, type II ANOVAs (Wald chi-square test) were applied on the models using Anova function in CAR package (Fox and Weisberg, 2019). When significant effects of treatment were detected, they were investigated through pairwise comparisons using lsmeans package (Lenth, 2016) with Tukey correction. For O₂ oxygen consumption, a generalized linear mixed model approach was taken assuming Gaussian distribution error with log link. Time (T-1h, T0h, T24h, T96h) and treatment group (SW, DSW, N) were considered as fixed factors. Crab ID was set as random factor nested within experimental tank (two tanks of exposure solution per treatment, N = 4 per tank), which are nested within treatment group (SW, DSW, N). Interaction terms were examined using the approach using type II ANOVA and multiple pairwise comparisons followed by Bonferroni correction. All values are represented as average \pm SEM.

4. Results

4.1 Tolerance to salinity variations and osmoregulatory capacity under osmotic and ammonia-N stress

Both GT and PC are strong osmoregulators across the tested salinities since they can maintain a gradient of greater than 600 mOsm.kg⁻¹ above the ambient medium when exposed to salinities close to FW (5-10 mOsm.kg⁻¹, Fig.2A).

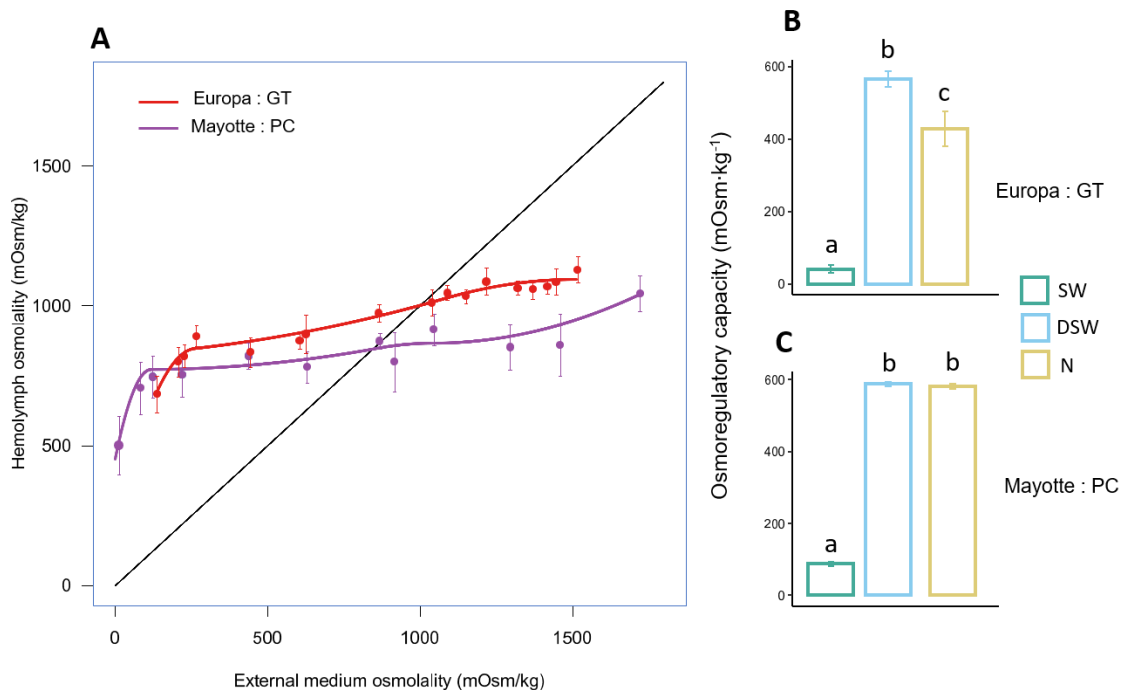


Fig.2.A: Variations in hemolymph osmolality in relation to the salinity of the external medium of GT and PC. B, C : Osmoregulatory capacity of GT and PC respectively, after 96h exposition to seawater (SW), diluted seawater (DSW) and 10 mg.L⁻¹ ammonia-N (N). Values are means \pm SEM (N = 7-8 per treatment). Different letters represent statistically significant differences between treatments at $p < 0.05$ obtained from a one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc comparisons.

Both species hyper-regulated at lower salinities (hemolymph osmolality actively maintained at levels above that of DSW) and hypo-regulated at higher salinity (hemolymph osmolality maintained below that of SW). The difference between external medium and hemolymph osmolality significantly increased as salinity decreased when both species were exposed to DSW during 96h (Fig. 2.B, C). GT can maintain osmoregulatory capacity values of ~ 50 mOsm.kg⁻¹ in SW and ~ 600 mOsm.kg⁻¹ in DSW after 96h, and these values are significantly different (Fig.2B, one-way ANOVA $F(2,20) = 89.44$, $p < 0.001$). The same results are observed in PC with osmoregulatory values of ~ 100 mOsm.kg⁻¹ in SW and ~ 600 mOsm.kg⁻¹ in DSW (Fig.2C, one-way ANOVA, $F(2,20) = 1913$, $p < 0.001$). However, a break in the curve is detected at low salinities, when it became increasingly difficult for the animals to osmoregulate. For GT, this break occurs at a higher salinity (~ 260 mOsm.kg⁻¹)

than for PC ($\sim 118 \text{ mOsm.kg}^{-1}$). Moreover, PC was able to maintain the same osmoregulatory capacity in DSW with ammonia-N as in DSW (Fig 2B), whereas a significant decrease in osmoregulatory capacity is observed in GT exposed to ammonia-N compared with DSW (Fig 2.C): crabs cannot maintain the haemolymph-seawater interval as in DSW.

4.2 Respiration rate across 96h DSW and ammonia-N exposures

Respiration rate measurements are depicted in Fig. 2A for GT and 2B for PC. They include temporal responses for each treatment at T-1h (SW), T0h, T24h, and T96h. In GT, a significant effect ($p < 0.001$) of exposure time on O_2 consumption ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-1} \text{g}^{-1}$) was observed. The interaction between treatment and exposure time was significant ($\chi^2(6, N = 31) = 16.831, p < 0.01$). Post-hoc multiple comparisons on the interaction terms showed that crabs exposed to ammonia-N significantly increased their respiration rate after 96h of exposure compared to the other time steps and with DSW (Fig. 3A). No effects of the osmotic or pollutant shock was observed immediately after exposure (T0h compared to T-1h).

In PC, no significant effect of treatment or exposure time was found, but their interaction was significant ($\chi^2(6, N = 32) = 44.5581, p < 0.01$). Post-hoc multiple comparisons on the interaction terms showed that crabs exposed to SW significantly decreased their respiration rate after 96h exposure compared with the other time steps (Fig. 3B). Crabs exposed to DSW progressively increased their respiration rate until 96h (significant difference between T-1h and T96h and between T0h and T96h). At 96h of exposure, a significant difference was observed between SW and DSW only.

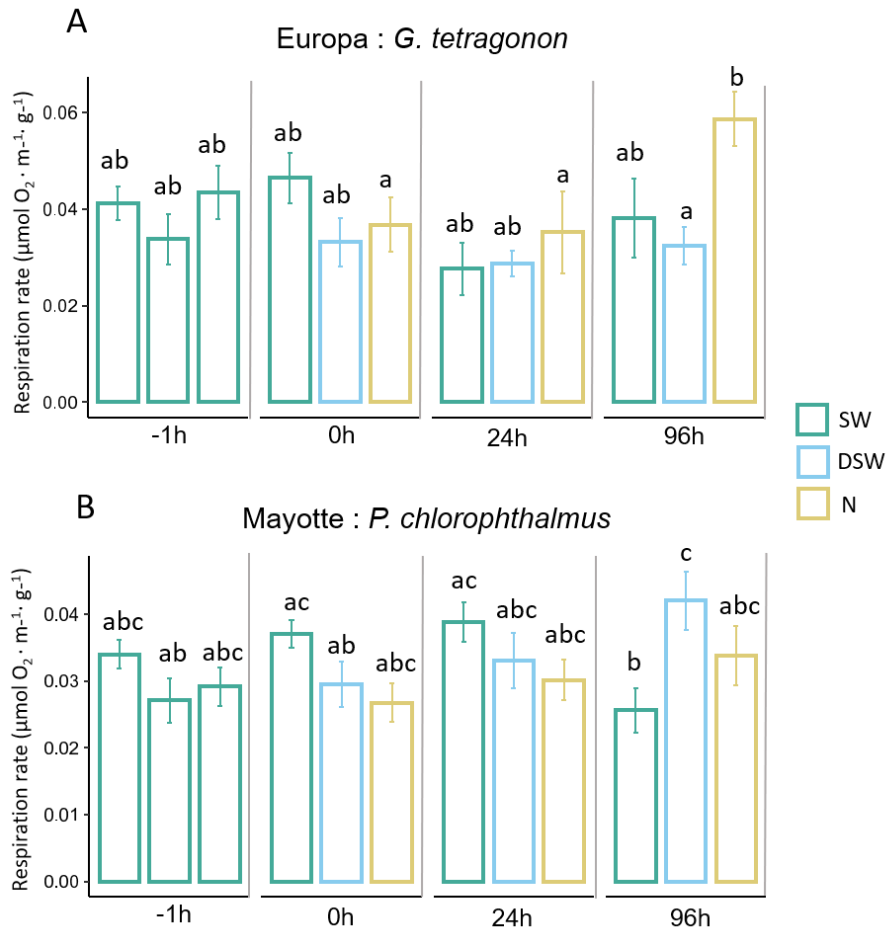


Fig.3. Resting metabolic rate of GT (A) and PC (B) in SW, DSW and N at T-1h, T1h, T24h and T96h exposure. Values are mean \pm SE. Different letters indicate significant two-way interaction effects of treatment and time after Wald Chi-square test and pairwise multiple comparisons (Bonferroni corrected).

4.3 Histological analyses

The histology of the three main cell types of the pancreatic tubules of GT and PC is presented in Fig. 4E: (1) R-cells (Restzellen, resorptive cells), the most abundant cell type in the hepatopancreas; (2) F-cells (Fibrillenzellen, fibrillar cells), which have a columnar shape and basophilic cytoplasm with an intense staining; (3) mature B-cells (Blasenzellen, blister-like cells), which are the largest cells showing large subapical vacuoles.

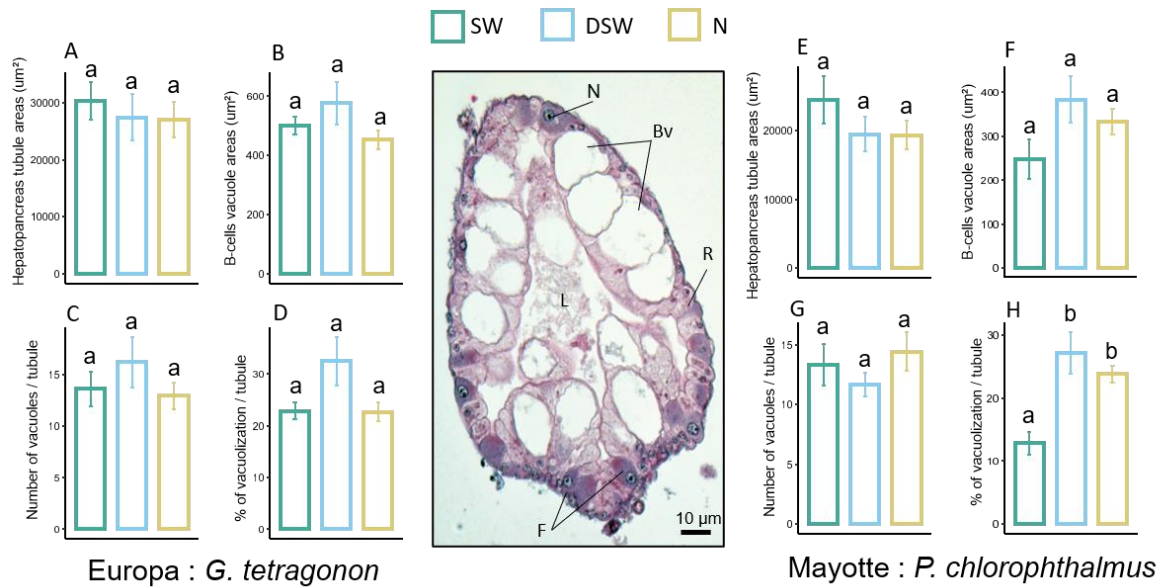


Fig.4. Histological analyses from transverse sections of different tubules of GT (A, B, C, D) and PC (E, F, G, H) hepatopancreas exposed to seawater (SW), diluted seawater (DSW) and 10 mg.L⁻¹ ammonia-N (N). Measurements and counts were carried out on randomly distributed tubules per individual. Data were averaged per individual. A, E: Areas of the tubules expressed as mean per individual; B, F: B-cell vacuole areas expressed as mean per tubule per individual; C, J: number of B-cell vacuoles in the tubule; D, H: percentage of B-cell vacuolization area per tubule; I: light microscopy illustration of a tubule cross section (GT). The photograph shows a tubule epithelium containing absorbing R-cells (R), enzyme synthesizing F-cells (F), and tubule-clearing B-cells (Bv). L: lumen; N: nucleus. Values are means \pm SEM (N = 3–8 per treatment). Different letters represent statistically significant differences between treatments at $p < 0.05$ after Wald Chi-square test and multiple comparisons (Tukey).

A Hepatopancreas tubule areas (μm^2)					
Factor	DF	χ^2			P
	GT-PC	GT	PC	GT	PC
Treatment	2	0.9819	1.4586	0.6121	0.4822

B Number of vacuoles / tubules					
Factor	DF	χ^2			P
	GT-PC	GT	PC	GT	PC
Treatment	2	1.4951	1.3823	0.4735	0.501

C B-cells vacuole areas (μm^2)					
Factor	DF	χ^2			P
	GT-PC	GT	PC	GT	PC
Treatment	2	1.0779	4.4643	0.5834	0.1073

D % of vacuolization / tubule					
Factor	DF	χ^2			P
	GT-PC	GT	PC	GT	PC
Treatment	2	3.1161	9.5381	0.2105	0.008489 **

Table 1. Results of analysis of deviance for histological measurements from transverse sections of different hepatopancreas tubules of *G. tetragonon* and *P. chlorophthalmus* as a function of treatment. GT= *Gelasimus tetragonon* (Europa Island), PC = *Paraletuca chlorophthalmus* (Mayotte). Wald Chi-square tests are performed for testing the significant differences of fixed categorical variables in GLMM (N = 7-8 per treatment for 3 treatment group). Statistically significant effects are indicated by asterisks: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

In GT, no effect of treatment was observed for all parameters measured in the hepatopancreas (One-way ANOVAS, Table 1). In PC, a significant effect of treatment ($p < 0.01$) was reported regarding the percentage of B-cells vacuolization in hepatopancreas tubules. Tukey post-hoc showed an increased vacuolization process in DSW and ammonium compared to SW (Fig. 4H).

No effect of treatment was observed in the gills of GT across the three levels of longitudinal axis (apical, central, basal) (one-way ANOVAs, Table 2 and fig. 5A). However, in PC, a significant effect of treatment ($p < 0.0001$) was reported at each level of the longitudinal axis (one-way ANOVAs, Table 2). Tukey post-hoc tests revealed that the gill epithelium of crabs exposed to ammonium for 96h was significantly thicker than those exposed to SW or DSW.

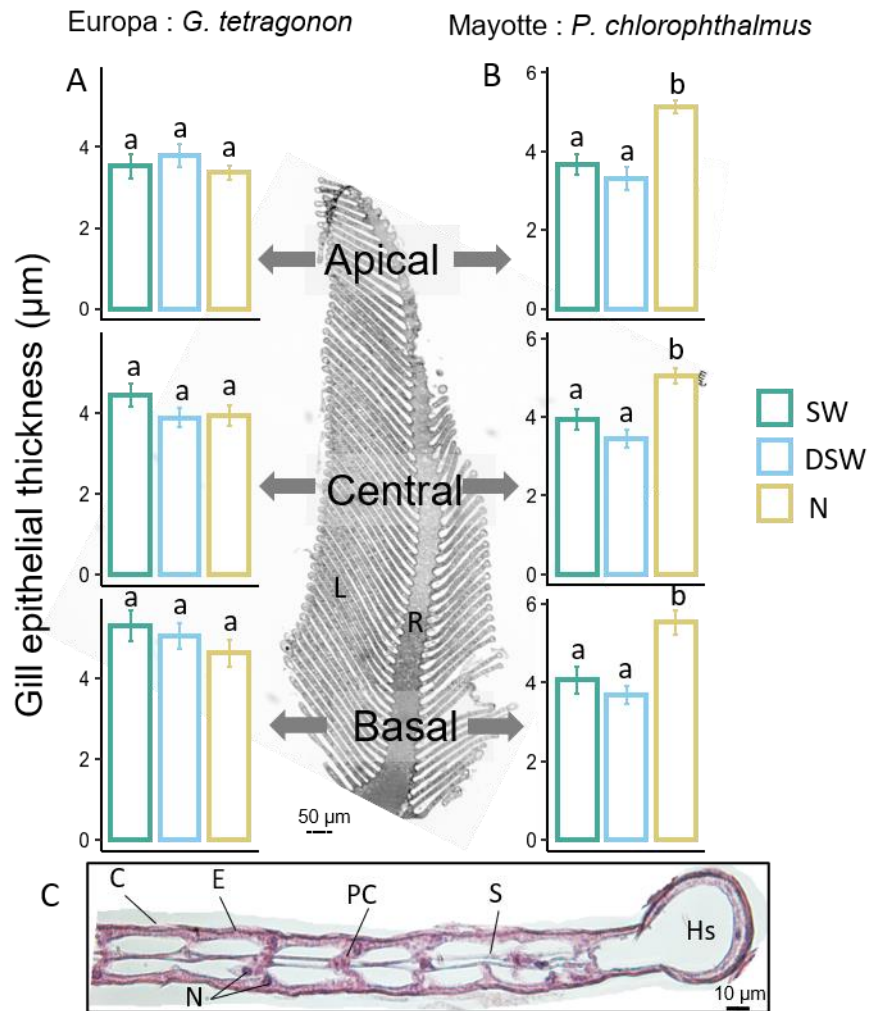


Fig.5. Histological analyses from transverse sections of GT and PC posterior gills exposed to seawater (SW), diluted seawater (DSW) and $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ammonia-N (N). The photograph illustrates a histological cross section of a posterior gill through the raphe (central part, R) and the lamellae (L). A, B: Epithelial thickness measurements of gill lamellae across the longitudinal axis of posterior gills of GT and PC. Values are means \pm SEM (N = 3–8 per treatment). Different letters represent statistically significant differences between treatments at $p < 0.05$ obtained from a one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc comparisons. C: histological section of a gill lamella of *Gelasimus tetragonon* (cross section). C: cuticle; E: epithelium, N: nucleus, PC: pillar cell, S: septum, Hs: hemocoelic space.

A Gill epithelial thickness - Apical part									
Factor	DF		MS		F		P		
	GT	PC	GT	PC	GT	PC	GT	PC	
Treatment	2	2	0.8836	20.635	0.551	15.36	0.579	3.68E-06	***
Residuals	57	63	1.6029	1.343					

B Gill epithelial thickness - Central part									
Factor	DF		MS		F		P		
	GT	PC	GT	PC	GT	PC	GT	PC	
Treatment	2	2	2.054	14.839	1.503	13.79	0.231	1.07E-05	***
Residuals	57	63	1.367	1.076					

C Gill epithelial thickness - Basal part									
Factor	DF		MS		F		P		
	GT	PC	GT	PC	GT	PC	GT	PC	
Treatment	2	2	2.057	20.844	0.841	11.37	0.437	6.08E-05	***
Residuals	57	63	2.447	1.833					

Table 2. Results of analysis of variance for gill epithelial thickness measured on different parts of the longitudinal axis of the gill one-way ANOVAs). GT= *Gelasimus tetragonon* (Europa Island), PC = *Paraletuca chlorophthalmus* (Mayotte). N = 7-8 per treatment for 3 treatment group. Statistically significant effects are indicated by asterisks: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

5. Discussion

5.1 Osmoregulation and ammonia-N excretion

Osmoregulation is one of the key regulatory functions in aquatic organisms and represents an excellent indicator of the physiological status of crustaceans (Lignot et al., 2000). Crustaceans can be classified as strong, moderate, or weak osmoregulators depending on their capacity to tolerate low salinity and the magnitude of the hemolymph-seawater osmotic difference (Henry et al., 2012). Results indicate that both PC and GT are strong osmoregulators, but the breaking point in the osmolality curve (Fig 1.A) occurs at a higher salinity in GT compared to PC. Therefore, the physiological osmoregulatory limit towards low salinity for GT is reached before PC. Also, they do not share the same isosmotic point. It is higher in GT ($\sim 1000 \text{ mOsm.kg}^{-1}$) than in PC ($\sim 830 \text{ mOsm.kg}^{-1}$). Similar results have been found in sympatric fiddler crabs living under different salinity conditions in the Gulf of Mexico (Thurman, 2004). Hypersaline species such as *Leptuca subcylindrical* and *Minuca rapax* are isosmotic for media between 840 and 940 mOsm.kg^{-1} (26 to 30‰) whereas, freshwater/brackish water species such as *Minuca longisignalis* are isosmotic at 732 mOsm.kg^{-1} (23‰). The ability to maintain hemolymph osmolality at different environmental salinities is well correlated with the habitat of the species (Lin et al., 2002). Consequently, a species living near estuaries or river mouths must be highly tolerant to salinity variation (hypothesis 1). Ecological knowledge about habitat preferences and distribution for both studied species tend to confirm this hypothesis. GT usually inhabits exposed, lower intertidal sandy or mud flat shores fringed with mangrove forest, coral rubble or rock (Dawn and Frith, 1977; Koga et al., 2000). This species is also considered as very marine, often living on shore and never near muddy river mouths (Crane, 1975). It has the largest longitudinal range of fiddler crabs, spanning the entire breadth of the Indian Ocean and Western Pacific subrealms, as described by Rosenberg (2020). PC does not live close to the open sea but near high-tide levels on the muddy banks and flats of mangrove estuaries, close to the mouth of streams or rivulets (Crane, 1975). It is one of the dominant species living in the study site of Mayotte and is one of the three endemic species from the East Africa Province (as defined by Rosenberg, 2020). This province also comprises three other species extended into other provinces, including GT. Thus, both species can be found in Europa and Mayotte islands even if they do not share the same habitat level and salinity conditions.

Since benthic crustaceans can frequently experience elevated levels of localized ammonia-N when they bury in sediments with high organic contents (Weihrauch et al., 1999), it is believed that this necessitates an adaptive mechanism to remove excessive ammonia-N build-up within their hemolymph (Romano and Zeng, 2012; Weihrauch et al., 2004). Ammonia excretion has been widely studied in aquatic crustaceans and it is established that

this function is intimately linked to the gills and their osmoregulatory function (See Weihrauch et al., 2004 for a complete description of the model).

The mechanisms for ammonia-N excretion in bimodal crabs are very diverse and complex (for a review, see Weihrauch and O'Donnell, 2017), as many membrane transporters are involved mainly in the anterior and posterior gills as well as in the antennal gland. The sodium pump Na^+/K^+ -ATPase (NKA), K^+ -channels and Na^+/H^+ exchangers (NHE) are among the key membrane proteins involved although more transporters could be at play (Freire et al., 2008; Gonçalves et al., 2006; Lucu and Towle, 2003; Masui et al., 2009, 2002; Weihrauch and O'Donnell, 2017). As already described, a number of these transporters playing a crucial role in trans-epithelial ammonia excretion are also involved in the ionoregulatory machinery (Weihrauch and O'Donnell, 2017, 2015). The best example for this is NKA, one of the key transporters responsible for energizing active NaCl transport processes in invertebrates and vertebrates alike (Larsen et al., 2014). The NH_4^+ pump (often referred to NH_4^+/K^+ -ATPase) is equally important. However, this process reaches its limits when crustaceans are exposed to excessively high amounts of ammonia-N, generally resulting in reduced hemolymph Na^+ levels (Romano and Zeng, 2012). This phenomenon has been observed in several species living under various salinity conditions: the American clawed lobster, *Homarus americanus* (Young-Lai et al., 1991), the Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* (Chen and Chen, 1996), the burrowing crab *Neohelice granulata* (Rebelo et al., 1999), the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Harris et al., 2001) and the mud crab *Scylla serrata* (Romano and Zeng, 2007a), amongst others. We can relate these data to our results on osmoregulatory capacity: increased ammonia-N excretion could induce a leak in Na^+ ions followed by a decrease in OC for GT, but not for PC. This may suggest that PC could set-up physiological mechanisms that allow a tolerance capacity to high ammonia-N levels in DSW. However, GT could not (rapidly) mobilize such tolerance. In most Crustaceans (i.e. *H. americanus* and *P. japonicus*), a decrease in hemolymph Na^+ levels is directly linked with reduced hemolymph osmolality and/or OC, but this is not observed in the euryhaline mud crab *S. serrata* (Romano and Zeng, 2007a). These authors propose that this crab species relies on other mechanisms to maintain osmotic pressure even in case of Na^+ reduced levels, as for example, by increasing the organic osmolytes such as hemolymph free amino acids (FAA). One can hypothesize that the difference observed in OC between GT and PC may result in different abilities to excrete ammonia-N (through NKA, $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ exchanger, and/or other transporters). With ammonia-N in DSW, GT may exhibit lower NKA activity, as reported in the blue swimmer crab *Portunus pelagicus* exposed to ammonia-N at low Na^+/K^+ ratio (Romano and Zeng, 2011), leading to lower Na^+ levels in the hemolymph compared to PC. A possible explanation could be that PC may better cope with high levels of ammonia-N in its hemolymph than GT, by maintaining the activity level of its membrane transporters. Measuring ammonia-N, ion concentration and pH levels in the hemolymph would help to confirm this hypothesis.

5.2 Implications of osmoregulation strategies in the whole metabolism of both species

Increased energy expenditure for osmoregulation and ammonia-N excretion may be reflected by increased metabolic indicators such as oxygen consumption (Gomez-Jimenez et al., 2004).

Our results showed no effects of DSW in respiration rate of GT across the 96h of exposition compared to the controls in DSW. In PC, respiration rate progressively increases in DSW, whereas O₂ consumption in SW progressively decreased until 96h of exposure. Euryhaline crabs are able to compensate for diffusion loss of ions in dilute media by active uptake of gill epithelium (Genovese et al., 2004). The most energy-demanding ion transport mechanism is the active transport driven by the NKA (Lucu and Towle, 2003), with active ion pumping in specialized epithelial cells that are also mitochondria rich (Freire et al., 2008; McNamara and Faria, 2012). Ammonia-N excretion and hyper-osmoregulation mainly rely on these mechanisms (Weihrauch et al., 2004) which generally increases when estuarine/marine crustaceans are exposed to diluted seawater (reviewed in Romano and Zeng, 2012). Based on the large loss of salt in diluted media, these crustaceans must invest considerable amounts of energy in active transport/uptake of salt in order to compensate for the large rates of diffusive salt loss (Henry et al., 2012). When osmotic stress is coupled with ammonia-N stress, an increase in O₂ consumption is observed in GT after 96h exposure, but this was not observed in PC. This could be directly linked to the OC decrease observed in this species. An increased energy demand is likely to occur in case of ammonia-N prolonged exposure. For instance, GT could rely on different ionic transport mechanisms without necessarily modifying its gill epithelial thickness (as discussed in 5.3). Even with an increased uptake of O₂, it is possible that the maintenance of GT hydromineral balance and ammonia-N excretion function is less efficient when facing these stressors than in PC. This could highlight a physiological trade-off because of the lack of other adaptive mechanisms. In PC maintained in DSW, the increase in O₂ uptake could be due to an increased energy demand for osmoregulation (among others). However, a lower oxygen consumption in DSW with ammonia-N could suggest an increased anaerobic metabolism or a different compromise between gas exchange and osmoregulation at the gill surface (aka the osmo-respiratory compromise) (Robertson et al., 2015). A clear functional specialization has been reported for several crab species, posterior gills being the main effectors of the “compensatory” process, while anterior gills are mostly involved in gas exchange (Genovese et al., 2004; Pequeux, 1995; Taylor and Taylor, 1992). Anterior gills are also known to be actively involved in ammonia excretion (Weihrauch et al., 1999, 1998) and in some hyper-regulating species such as green shore crab, active ammonia excretion rates being lower in posterior osmoregulatory gills compared to anterior gills (Weihrauch et al., 1998). These results indicate that osmoregulatory processes are not directly linked to ammonia excretion and that excretion

of toxic ammonia could proceed independently of other physiological processes (Weihrach and O'Donnell, 2017). Large areas in the lamellae of the posterior gill epithelium reveals thick ion-transporting cells with well-developed basolateral membranes associated with numerous mitochondria in several species of euryhaline crabs such as *Neohelice granulata* (previously *Chasmagnathus granulatus*) (Genovese et al., 2004). Most of the NKA activity is generally restricted to specific areas of posterior gill lamellae lined by this kind of epithelium (Towle and Kays, 1986).

5.3 Histological changes to explain PC and GT differential ammonia-N tolerance

In DSW, no changes were observed in the thickness of the gill epithelium for the two species (Fig 5.A, B). However, when exposed to ammonia-N for 96h, branchial epithelium thickness of PC significantly increases along the longitudinal axis, whereas this does not occur for GT. An increase in osmoregulatory epithelial patches surface of posterior gills in crabs exposed to either dilute or hyper-saline water (i.e. when crabs osmoregulate) has already been observed (Genovese et al., 2000; Lovett et al., 2006). The authors suggest that these gills could be involved both in active ion uptake and active excretion of ions depending on the medium salinity, especially with the progressive increase of NKA activity during 6 days observed in crabs exposed to dilute seawater (Lovett et al., 2006). In PC, this response may be directly related to a strategy allowing increased ammonia-N excretion and osmoregulation may be through NKA increased activity, as discussed above. By increasing the thickness of the basolateral epithelium of posterior gill cells, PC may increase the number of ion transporters (mainly NKA) and mitochondria allowing, therefore, an increase in its osmoregulatory and ammonia-N excretion capacities. The increase in epithelial thickness does not occur in DSW although a higher metabolic rate is observed in this condition. Therefore, PC could rely on two different strategies depending on the nature and level of stress (increased metabolic rate in DSW and/or enhanced ion transport mechanisms when exposed to ammonium by the lengthening of the basolateral epithelium), whereas GT cannot exhibit such plasticity regarding ammonia-N exposure and increases its metabolic rate.

However, though not quantified, no major disruption of cellular structure has been observed in either species exposed to DSW or Ammonia-N. In Romano and Zeng (2007b), Ammonia-N exposure for 96h lead to different dose-dependent disruptions of gills in *P. pelagicus*. At 10 mg.l⁻¹ ammonia-N (a similar concentration as in the present study), gill lamellae showed local infiltrations of haemocytes with normal lamellae structures whereas 60 mg.l⁻¹ ammonia-N generated extensive haemocyte infiltrations, disrupted pillar cells and lamellae collapses.

In Crustaceans, the hepatopancreas is a key metabolic organ, expressing a variety of transporters (Ahearn et al., 1992). Its numerous tubules are involved in food digestion, detoxification of xenobiotics and nutrient absorption (Ceccaldi, 1998; Ortega et al., 2014; Zilli et al., 2003). Histological analyses of these tubules revealed few changes for the B-cells in both GT and PC. Even if their role is still discussed, B-cells can be considered to have two functions: elimination of waste material and intracellular digestion of nutrients (Vogt, 1994). The supranuclear vacuoles resulting from the coalescence of subapical vacuoles take the form of huge lysosomes (Vogt, 1993) and their content can be discharged into the lumen by holocrine secretions (Nott et al., 1985). Our results showed a higher vacuolisation in PC exposed to Ammonia-N that could be linked to an increased intracellular digestion process through B-cells vacuoles, as it has been found in a Sesarmid crab species exposed to domestic wastewater (Mégevand et al., 2021). This increase in activity would potentially lead to an increased energy expenditure but in this case, our hypothesis is that ammonia-N could have a limited effect on the hepatopancreas functioning. As mentioned by Chu (1987), the hepatopancreas overall contribution to osmoregulatory ion uptake is believed to be minimal, whereas gills are the main site for respiration, osmoregulation, ammonia-N excretion, these gills being the main organs involved for the overall organismal adaptation to changing conditions. In Ocypodids such as PC and GT, the study of the antennal gland would also be of interest in order to understand ammonia excretion mechanisms. As shown for several fiddler crabs such as *Minuca pugnax* or *Leptuca pugilator*, ammonia is known to be actively transported across the duct and excreted in the primary urine which contains a high concentration of ammonium (De Vries et al., 1994; Green et al., 1959).

Coping with an aquatic environment with low salinity and elevated ammonia-N is highly species- and habitat-specific. Therefore, a fully euryhaline species such as PC, that is adapted to nutrient-rich environments (Gross, 1982; Henry et al., 2012) is likely to be less vulnerable to nutrient enrichment and may be able to develop other coping mechanisms. However, this study focuses on potential short-term acclimation capacities. It does not take into account any possible environmental determinism that could arise from micro-evolution after prolonged exposure to ammonia-N enriched conditions (in Mayotte). A research program with multi-generational expositions of the two populations would be of high interest, especially for understanding ecosystem health and ecological risk implications on a longer timescale (although technically complicated to implement).

5.4 Ecosystem and risk assessment implications

Acclimatory and adaptive capacities to different environments induce species-specific responses among Decapod crustaceans that rely on various mechanisms to maintain their metabolism (Henry et al., 2012; Romano and Zeng, 2013; Weihrauch et al., 1999).

However, brackish and intertidal environments are among the most stressful aquatic biotopes and the establishment of Crustacean communities in such habitats suppose highly adapted physiological features (Charmantier et al., 2002; Gilles and Pequeux, 1983) to cope with low and varying salinities (Henry et al., 2012). In the present study, PC, living under varying salinities and nutrient-driven conditions, appears to have a better tolerance to decreased salinity compared to GT, even if GT is a relatively strong osmoregulator (hypothesis 1). Ammonia-N triggers short-term acclimation in PC that are not observed in GT suggesting that this species could be more vulnerable to anthropogenic discharges (collected GT specimens must have never been exposed to eutrophic water and very rarely to diluted seawater) (hypothesis 2). GT copes with 96h ammonia-N exposure through increased metabolic rate to excrete this product, while struggling to maintain its osmoregulatory balance. However, this response does not occur in DSW condition without ammonia-N. This suggests that some cumulative deleterious effects under Ammonia-N exposure and osmotic stress occur for this species (hypothesis 3).

Ammonia-N was used in this study as a first indicator of anthropogenic effluents, but it is more likely that crab communities are confronted with different contaminants with combined effects (*e.g.* complex and hypoxic wastewater), often consisting of repeated exposures. Worldwide, effects of domestic effluent discharges (controlled or not) on crab community assemblage have been observed in several different mangroves with various results (Capdeville, 2018; Penha-Lopes et al., 2009; Wear and Tanner, 2007; Wickramasinghe et al., 2009). The results of the present study point (at least) to a short-term physiological acclimation to salinity variation and pollution for species such as PC, acclimated to euryhaline and anthropized conditions (already proposed in Mégevand et al., 2021, submitted), but it has been demonstrated that individual abundance for this species decreased in chronically WW impacted areas (Capdeville et al., 2018). If GT is unable to develop short-term response to salinity and ammonia-N inputs, it is likely that this species would be even more sensitive to longer exposure to pollution, or to more complex contaminants such as hypoxic WW. If the population decline of engineering species can be dreadful for the functioning of freshwater-influenced mangroves (*e.g.* Mayotte), what about isolated and pristine ecosystems like Europa Island? What would be the acclimation potential of representative species like GT in the event of anthropogenic effluents? In view of the results obtained in this study and those obtained during the various works mentioned above, it is possible to be pessimistic about the ecosystem risks incurred by a pristine mangrove such as that of Europa if it were to face waters discharges of anthropogenic origin.

Conclusion

The two crab species studied here do not show the same tolerance to salinity variations, nor to ammonia-N exposure. In accordance with our first hypothesis, *Paraleptuca chlorophthalmus* (Mayotte island) has a better osmoregulatory capacity in diluted seawater than *Gelasimus tetragonon* (Europa Island), which remains, however, a strong hyper-hypo-osmoregulator. This difference in tolerance can be explained by the living conditions and the acclimation capacities of the two species to their respective environments. Exposure for 96h to ammonia-N at a concentration of 10 mg.l⁻¹ in diluted seawater (5ppt) generates branchial morphological acclimation in PC in order to increase the osmoregulatory and ammonium excretion functions. These changes do not occur in GT, this species experiencing an increase in oxygen consumption over time as its osmoregulatory capacity decreases (hypothesis 2). There appears to be a differential vulnerability between these two species to nitrogen inputs as a simulation of anthropogenic presence (hypothesis 3). Burrowing crabs ensure crucial ecological functions associated with their bioturbation activity. A change in crab community composition will not ensure the maintenance of these functions as functional redundancy may not happen. Consequences in terms of mangrove functioning and vulnerability are difficult to predict and linked to many others parameters. However, our study emphasizes the importance of considering small/medium scale ecophysiological indicators of species vulnerability, especially when developed in engineer species, to answer large-scale questions of ecosystem risk assessment.

Acknowledgements

The authors are grateful to the *Terres Australes et Antarctiques Françaises* (TAAF) for allowing scientific activities including crab sampling in the Scattered Islands and providing logistical support during the scientific cruise and our stay on Europa Island.

Supplementary data

Genetical identification of crabs

A total of 30 crabs (15 from Europa Island and 15 from Mayotte island) used during the experiments were randomly chosen for DNA sequencing to attest their taxonomical identification through a classical barcoding process. DNA was extracted from a fragment of claw using the DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN). Approximately 600 pb amplicons were amplified using the 16Sar/16H10 primer set (Palumbi and Metz, 1991; Schubart, 2009) targeting the large subunit ribosomal 16S rRNA gene. Successful PCRs were sequenced by Sanger sequencing using forward and reverse PCR primer sets. Sequences were cleaned up and assemble using BioEdit (RRID:SCR_007361). Public sequences with closed similarities were retrieved from Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) using a BLAST search (Madden, 2003). Sequence alignments and phylogenetic analyses were performed using Mega4 (Tamura et al., 2007). The phylogenetic relationships were inferred using the Neighbor-Joining method with pairwise deletion option (see Figure 1) with default parameters.

Distances within mean groups were 0.16 % for *Gelasimus tetragonon* and 0.02 % for *Paraleptuca chlorophthalmus*. The distance between species was 15%. The tree confirmed the taxonomic identification of samples by showing monophyletic grouping (well supported by bootstrap tests) of sequences with reference to *Paraleptuca chlorophthalmus* sequences in Mayotte and those from Europa with *Gelasimus tetragonon* reference sequences.

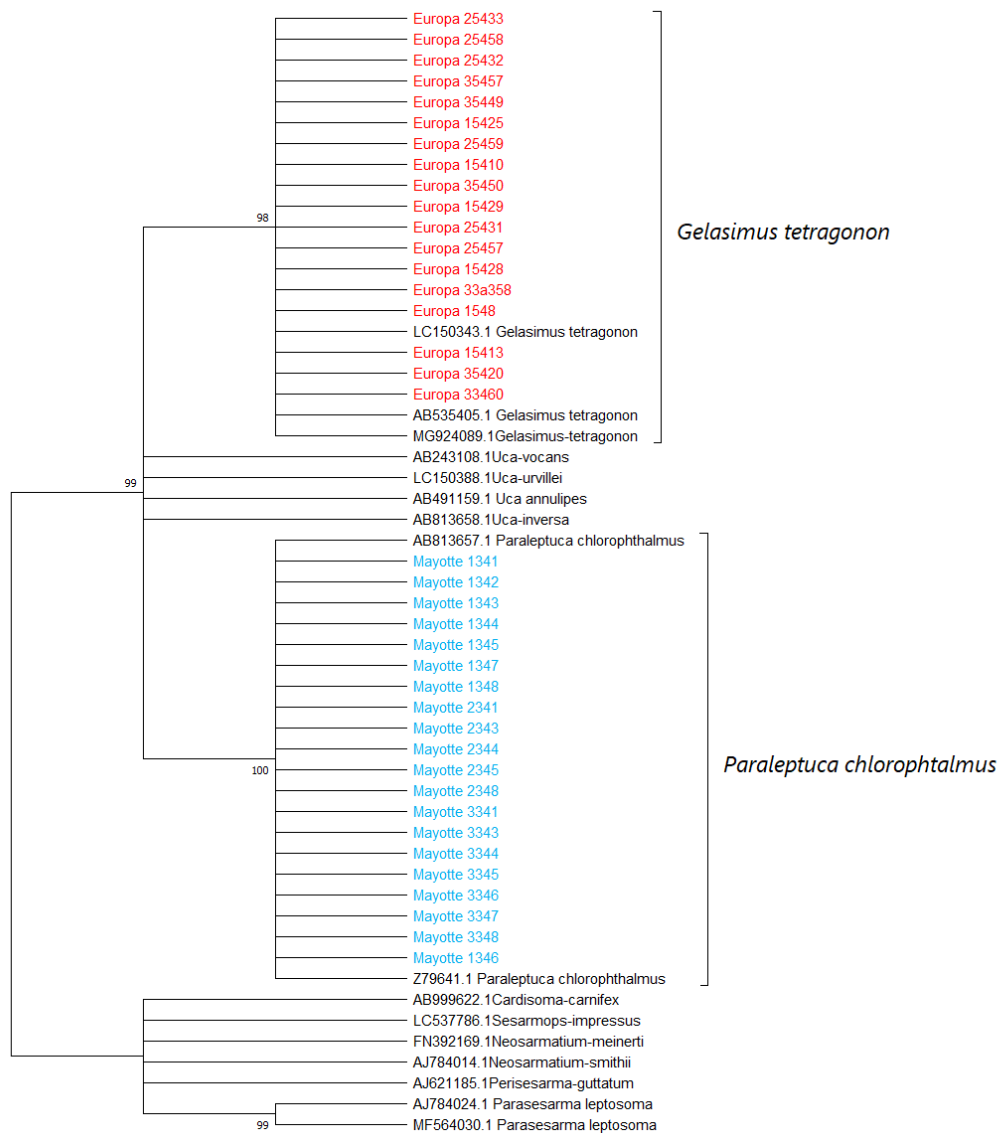


Figure 1: Phylogenetical analysis of 16r RNA sequences of crabs. The optimal tree is presented with bootstrap tests (1000 replicates) shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the maximum Composite likelihood method. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 539 positions in the final dataset. Sequences were condensed with a 97% similarity cut-off. Samples used in this study were annotated with a specific color (blue for samples from Europa Island and red for sample from Mayotte Island).

References

- Ahearn, G.A., Gerencser, G., Thamocharan, M., Behnke, R., Lemme, T., 1992. Invertebrate gut diverticula are nutrient absorbing organs. *Am. J. Physiol.* 263:R472–R.
- Alongi, D.M., 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environ. Conserv.* 29, 331–349. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000231>
- Amaral, V., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009. Effects of vegetation and sewage load on mangrove crab condition using experimental mesocosms. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.07.007>
- Azpeitia, E., Vanegas-Pérez, C., Moreno-Sáenz, E., Betancourt-Lozano, M., Miranda-Anaya, M., 2013. Effect of chronic ammonia exposure on locomotor activity in the fiddler crab *Uca princeps* upon artificial tides and light cycles. *Biol. Rhythm Res.* 44, 113–123. <https://doi.org/10.1080/09291016.2011.652864>
- Bermudes, M., Ritar, A.J., 2008. Tolerance for ammonia in early stage spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosoma larvae. *J. Crustac. Biol.* 28, 695–699. <https://doi.org/10.1651/08-2994.1>
- Borges, F.O., Sampaio, E., Figueiredo, C., Rosa, R., Grilo, T.F., 2018. Hypercapnia-induced disruption of long-distance mate-detection and reduction of energy expenditure in a coastal keystone crustacean. *Physiol. Behav.* 195, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.07.023>
- Boulet, V., 2014. The vegetation of the island of Europa (channel of Mozambique). 1- salt marshes and steppes. *Doc. phytosociologiques* 1, 501–535.
- Briscoe, N.J., Porter, W.P., Sunnucks, P., Kearney, M.R., 2012. Stage-dependent physiological responses in a butterfly cause non-additive effects on phenology. *Oikos* 121, 1464–1472. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.20049.x>
- Brodie, J.F., Redford, K.H., Doak, D.F., 2018. Ecological Function Analysis: Incorporating Species Roles into Conservation. *Trends Ecol. Evol.* 33, 840–850. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.08.013>
- Brooks, M.E., Kristensen, K., van Benthem, K.J., Magnusson, A., Berg, C.W., Nielsen, A., Skaug, H.J., Mächler, M., Bolker, B.M., 2017. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *R J.*

- 9, 378–400. <https://doi.org/10.32614/rj-2017-066>
- Burger, J., 2006. Bioindicators: A Review of Their Use in the Environmental Literature 1970–2005. *Environ. Bioindic.* 1, 136–144. <https://doi.org/10.1080/15555270600701540>
- Cannicci, S., Bartolini, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., Litulo, C., Macia, A., Mrabu, E.J., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009. Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.021>
- Capdeville, C., 2018. Évaluation des capacités de résistance et de résilience de l'écosystème mangrove en réponse à des apports d'eaux usées domestiques prétraitées. Université de Toulouse.
- Capdeville, C., Abdallah, K., Buffan-Dubau, E., Lin, C., Azemar, F., Lambs, L., Fromard, F., Rols, J.L., Leflaive, J., 2018. Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. *Mar. Pollut. Bull.* 129, 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.035>
- Ceccaldi, H.J., 1998. A synopsis of the morphology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. *Rev. Fish. Sci.* 6, 13–39. <https://doi.org/10.1080/10641269891314177>
- Charmantier, G., Giménez, L., Charmantier-Daures, M., Anger, K., 2002. Ontogeny of osmoregulation, physiological plasticity and larval export strategy in the grapsid crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 229, 185–194. <https://doi.org/10.3354/meps229185>
- Chen, J.C., Chen, C.T., 1996. Changes of osmotic and electrolyte concentrations in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 114, 35–38. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02110-8](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02110-8)
- Chu, K.H., 1987. Sodium transport across the perfused midgut and hindgut of the blue crab, *Callinectes sapidus*: The possible role of the gut in crustacean osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 87, 21–25. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90418-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90418-X)
- Chuine, I., 2010. Why does phenology drive species distribution? *Philos. Trans. R. Soc. B*

- Biol. Sci. 365, 3149–3160. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0142>
- Clark, T.D., Sandblom, E., Jutfelt, F., 2013. Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: Respirometry, relevance and recommendations. *J. Exp. Biol.* 216, 2771–2782. <https://doi.org/10.1242/jeb.084251>
- Coggan, N. V., Hayward, M.W., Gibb, H., 2018. A global database and “state of the field” review of research into ecosystem engineering by land animals. *J. Anim. Ecol.* 87, 974–994. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12819>
- Crane, J., 1975. Fiddler crabs of the world: Ocypodidae: Genus *Uca*. Princeton University press, New Jersey. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(78\)90130-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(78)90130-6)
- Dawn, W., Frith, C.B., 1977. Observations on fiddler crabs (Ocypodidae: genus *Uca*) on Surin Island, western peninsular Thailand, with particular reference to *Uca tetragonon* (Herbst). *Res. Bull. Phuket Mar. Biol. Cent.* 18, 14.
- De Lange, H.J., Sala, S., Vighi, M., Faber, J.H., 2010. Ecological vulnerability in risk assessment - A review and perspectives. *Sci. Total Environ.* 408, 3871–3879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.009>
- De Vries, M.C., Wolcott, D.L., Holliday, C.W., 1994. High Ammonia and Low pH in the Urine of the Ghost Crab, *Ocypode quadrata*. *Biol. Bull.* 186, 342–348. <https://doi.org/10.2307/1542280>
- Dittmann, S., 1996. Effects of macrobenthic burrows on infaunal communities in tropical tidal flats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 134, 119–130. <https://doi.org/10.3354/meps134119>
- Emmerson, W.D., McGwynne, L.E., 1992. Feeding and assimilation of mangrove leaves by the crab *Sesarma meinerti* de Man in relation to leaf-litter production in Mgazana, a warm-temperate southern African mangrove swamp. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 157, 41–53. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90073-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90073-J)
- Fox, J., Weisberg, S., 2019. *An R Companion to Applied Regression*, Third. ed. Sage, Thousand Oaks CA.
- Freire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C., 2008. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 151, 272–304. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.008>
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R.,

- Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* (80-). 320, 889–892. <https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- Genovese, G., Luchetti, C.G., Luquet, C.M., 2004. Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. *Mar. Biol.* 144, 111–118. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1169-6>
- Genovese, G., Luquet, C.M., Paz, D.A., Rosa, G.A., Pellerano, G.N., 2000. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialised cells. *J. Anat.* 197, 239–246. <https://doi.org/10.1017/S0021878299006615>
- Giddins, R., Lucas, J., Neilson, M., Richards, G., 1986. Feeding ecology of the mangrove crab. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33, 147–155.
- Gilles, R., Pequeux, A., 1983. Interactions of chemical and osmotic regulation with the environment, in: Bliss, D.E., Vernberg, W.B. (Eds. . (Ed.), *The Biology of Crustacea, Environmental Adaptations*, Vol. 8. Academic Press, New York, pp. 109–177.
- Gillikin, D.P., de Grave, S., Tack, J.F., 2003. The occurrence of the semi-terrestrial shrimp *Merguia oligodon* (De Man, 1888) in *Neosarmatium smithi* H. Milne Edwards, 1853 burrows in Kenyan mangroves. *Crustaceana* 74, 505–507. <https://doi.org/10.1163/156854001750243081>
- Gomez-Jimenez, S., Urias-Reyes, A.A., Vazquez-Ortiz, F., Hernandez-Watanabe, G., 2004. Ammonia efflux rates and free amino acid levels in *Litopenaeus vannamei* postlarvae during sudden salinity changes. *Aquaculture* 233, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.050>
- Gonçalves, R.R., Masui, D.C., McNamara, J.C., Mantelatto, F.L.M., Garçon, D.P., Furriel, R.P.M., Leone, F.A., 2006. A kinetic study of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase, and its role in ammonia excretion in the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 145, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.007>
- Green, J.W., Harsch, M., Barr, L., Prosser, C.L., 1959. The Regulation of Water and Salt By the Fiddler Crabs, *Uca Pugnax* and *Uca Pugilator*. *Biol. Bull.* 116, 76–87.

<https://doi.org/10.2307/1539157>

Gross, M.G., 1982. Oceanography: a view of the Earth., Third. ed.

Harris, R., Coley, S., Collins, S., McCabe, R., 2001. Ammonia uptake and its effects on ionoregulation in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 171, 681–693. <https://doi.org/10.1007/s003600100219>

Haywood, G.P., 1983. Ammonia Toxicity in Teleost Fishes: A Review. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences.

Henry, R.P., Lucu, Ć., Onken, H., Weihrauch, D., 2012. Multiple functions of the crustacean gill: Osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. Front. Physiol. 3 NOV, 1–33. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>

Herteman, M., 2010. Evaluation des capacités bioremédiatrices d'une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. <http://www.theses.fr>. Toulouse 3.

Ikeda, T., 2016. Routine metabolic rates of pelagic marine fishes and cephalopods as a function of body mass, habitat temperature and habitat depth. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 480, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.03.012>

Ippolito, A., Sala, S., Faber, J.H., Vighi, M., 2010. Ecological vulnerability analysis: A river basin case study. Sci. Total Environ. 408, 3880–3890. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.002>

Jeanson, M., Dolique, F., Anthony, E.J., Aubry, A., 2019. Decadal-scale Dynamics and Morphological Evolution of Mangroves and Beaches in a Reef-lagoon Complex, Mayotte Island. J. Coast. Res. 88, 195–208. <https://doi.org/10.2112/SI88-015.1>

Johnson, P.C.D., Barry, S.J.E., Ferguson, H.M., Müller, P., 2015. Power analysis for generalized linear mixed models in ecology and evolution. Methods Ecol. Evol. 6, 133–142. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12306>

Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. Oikos.

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. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2019.e00129>
- Killen, S.S., 2014. Growth trajectory influences temperature preference in fish through an effect on metabolic rate. *J. Anim. Ecol.* 83, 1513–1522. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12244>
- Koga, T., Murai, M., Goshima, S., Poovachiranon, S., 2000. Underground mating in the fiddler crab *Uca tetragonon*: The association between female life history traits and male mating tactics. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 248, 35–52. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00154-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00154-4)
- Kristensen, E., 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J. Sea Res.* 59, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.004>
- Kristensen, E., Alongi, D.M., 2006. Control by fiddler crabs (*Uca vocans*) and plant roots (*Avicennia marina*) on carbon, iron, and sulfur biogeochemistry in mangrove sediment. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1557–1571. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.4.1557>
- Kristensen, E., Penha-Lopes, G., Delefosse, M., Valdemarsen, T., Quintana, C.O., Banta, G.T., 2012. What is bioturbation? the need for a precise definition for fauna in aquatic sciences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446, 285–302. <https://doi.org/10.3354/meps09506>
- Lagarde, R., Teichert, N., Valade, P., Ponton, D., 2021. Structure of small tropical island freshwater fish and crustacean communities: A niche-or dispersal-based process? *Biotropica* 53, 243–254. <https://doi.org/10.1111/btp.12865>
- Lambs, L., Mangion, P., Mougin, E., Fromard, F., 2016. Water cycle and salinity dynamics in the mangrove forests of europa and juan de nova islands, Southwest Indian ocean. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30, 311–320. <https://doi.org/10.1002/rcm.7435>
- Lapègue, J., 1999. Aspects quantitatifs et qualitatifs de la pluviométrie dans deux enjeux majeurs de la problématique de l'eau à Mayotte: la ressource hydrique, l'assainissement pluvial et l'érosion. Université de La Réunion.
- Larsen, E.H., Deaton, L.E., Onken, H., O'Donnell, M., Grosell, M., Dantzler, W.H., Weihrauch, D., 2014. Osmoregulation and excretion. *Compr. Physiol.* 4, 405–573. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130004>
- Lee, S.Y., 1997. Potential trophic importance of the faecal material of the mangrove

- sesarmine crab *Sesarma masse*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 159, 275–284.
<https://doi.org/10.3354/meps159275>
- Lemarié, G., Dosdat, A., Covès, D., Dutto, G., Gasset, E., Person-Le Ruyet, J., 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture 229, 479–491. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00392-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00392-2)
- Lenth, R. V., 2016. Least-squares means: The R package lsmeans. J. Stat. Softw. 69. <https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01>
- Lignot, J.-H., Spanings-Pierrot, G., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191, 209–245.
- Lin, H.C., Su, Y.C., Su, S.H., 2002. A comparative study of osmoregulation in four fiddler crabs (Ocypodidae: Uca). Zoolog. Sci. 19, 643–650. <https://doi.org/10.2108/zsj.19.643>
- Lovett, D.L., Colella, T., Cannon, A.C., Lee, D.H., Evangelisto, A., Muller, E.M., Towle, D.W., 2006. Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. Biol. Bull. 210, 132–139. <https://doi.org/10.2307/4134602>
- Lovett, D.L., Verzi, M.P., Clifford, P.D., Borst, D.W., 2001. Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas*. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 128, 299–306. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00308-1)
- Lucu, Ć., Towle, D.W., 2003. Na⁺+K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 135, 195–214. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00064-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00064-3)
- Lugendo, B.R., Kimirei, I.A., 2021. Anthropogenic nitrogen pollution in mangrove ecosystems along Dar es Salaam and Bagamoyo coasts in Tanzania. Mar. Pollut. Bull. 168, 112415. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112415>
- Manning, C., 2007. Generalized Linear Mixed Models illustrated with R 1–40.
- Madden, T., 2003. The BLAST sequence analysis tool. NCBI Handb.

- Masui, D.C., Furriel, R.P.M., McNamara, J.C., Mantelatto, F.L.M., Leone, F.A., 2002. Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: A possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 132, 471–482. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00110-2)
- Masui, D.C., Mantelatto, F.L.M., McNamara, J.C., Furriel, R.P.M., Leone, F.A., 2009. Na⁺, K⁺-ATPase activity in gill microsomes from the blue crab, *Callinectes danae*, acclimated to low salinity: Novel perspectives on ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 153, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.01.020>
- McNamara, J.C., Faria, S.C., 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: A review. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 997–1014. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0665-8>
- Mégevand, L., Martínez-Alarcón, D., Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Lejeune, M., Lignot, J.-H., Sucré, E., 2021. The hepatopancreas of the mangrove crab *Neosarmatium africanum*: a possible key to understanding the effects of wastewater exposure (Mayotte Island, Indian Ocean). *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14892-5>
- Nagelkerken, I., Blaber, S.J.M., Bouillon, S., Green, P., Haywood, M., Kirton, L.G., Meynecke, J.O., Pawlik, J., Penrose, H.M., Sasekumar, A., Somerfield, P.J., 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquat. Bot.* 89, 155–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.007>
- Nixon, S.W., 1995. Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41, 199–219. <https://doi.org/10.1080/00785236.1995.10422044>
- Nixon, S.W., Ammerman, J.W., Atkinson, L.P., Pilson, M.E.Q., Seitzinger, S.P., 1996. The fate of nitrogen and phosphorus at the land-sea margin of the North Atlantic Ocean. *Biogeochemistry* 35, 141–180.
- Nott, J.A., Corner, E.D.S., Marvin, L.J., O'Hara, S.C.M., 1985. Cyclical contributions of the digestive epithelium to faecal pellet formation by the copepod *Calanus helgolandicus*. *Mar. Biol.* 89, 271–279. <https://doi.org/10.1007/BF00393661>

- O'Donnell, J.L., Beldade, R., Mills, S.C., Williams, H.E., Bernardi, G., 2017. Life history, larval dispersal, and connectivity in coral reef fish among the Scattered Islands of the Mozambique Channel. *Coral Reefs* 36, 223–232. <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1495-z>
- Ombres, E.H., Donnelly, J., Clarke, M.E., Harms, J.H., Torres, J.J., 2011. Aerobic and anaerobic enzyme assays in Southern California Rockfish: Proxies for physiological and ecological data. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 399, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.007>
- Ortega, P., Custódio, M.R., Zanotto, F.P., 2017. Characterization of cadmium transport in hepatopancreatic cells of a mangrove crab *Ucides cordatus* : The role of calcium. *Aquat. Toxicol.* 188, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.012>
- Ortega, P., Santos, R.A., Lacouth, P., Rozas, E.E., Custódio, M.R., Zanotto, F.P., 2014. Caracterização citoquímica de células de brânquias e hepatopâncreas de *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) validado por transporte celular de metais. *Iheringia - Ser. Zool.* 104, 347–354. <https://doi.org/10.1590/1678-476620141043347354>
- Ouyang, X., Guo, F., 2016. Paradigms of mangroves in treatment of anthropogenic wastewater pollution. *Sci. Total Environ.* 544, 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.013>
- Palumbi, S.R., Metz, E.C., 1991. Strong reproductive isolation between closely related tropical sea urchins (genus *Echinometra*). *Mol. Biol. Evol.* 8, 227–239. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040642>
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Kristensen, E., Paula, J., 2009. Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1694–1703. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.015>
- Pequeux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 15, 1–60.
- Piggott, J.J., Townsend, C.R., Matthaei, C.D., 2015. Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecol. Evol.* 5, 1538–1547. <https://doi.org/10.1002/ece3.1465>
- Pusineri, C., Barbraud, C., Kiszka, J., Caceres, S., Mougnot, J., Daudin, G., Ridoux, V., 2014. Capture-mark-recapture modelling suggests an Endangered status for the

- Mayotte Island (Eastern Africa) population of Indo-Pacific bottlenose dolphins. *Endanger. Species Res.* 23, 23–33. <https://doi.org/10.3354/esr00555>
- Rebelo, M.F., Santos, E.A., Monserrat, J.M., 1999. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda) Dana, 1851: Accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 122, 429–435. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00026-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00026-4)
- Renault, D., Laparie, M., McCauley, S.J., Bonte, D., 2018. Environmental Adaptations, Ecological Filtering, and Dispersal Central to Insect Invasions. *Annu. Rev. Entomol.* 63, 345–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043315>
- Rivera-Ingraham, G.A., Barri, K., Boël, M., Farcy, E., Charles, A.L., Geny, B., Lignot, J.H., 2016. Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: Is oxidative adaptation determined by gill function? *J. Exp. Biol.* 219, 80–89. <https://doi.org/10.1242/jeb.128595>
- Robertson, L.M., Kochhann, D., Bianchini, A., Matey, V., Almeida-Val, V.F., Val, A.L., Wood, C.M., 2015. Gill paracellular permeability and the osmorepiratory compromise during exercise in the hypoxia-tolerant Amazonian oscar (*Astronotus ocellatus*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 185, 741–754. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0918-4>
- Rodgers, G.G., Tenzing, P., Clark, T.D., 2016. Experimental methods in aquatic respirometry: The importance of mixing devices and accounting for background respiration. *J. Fish Biol.* 88, 65–80. <https://doi.org/10.1111/jfb.12848>
- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic Effects of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Decapod Crustaceans: A Review on Factors Influencing their Toxicity, Physiological Consequences, and Coping Mechanisms. *Rev. Fish. Sci.* 21, 1–21. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- Romano, N., Zeng, C., 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: Implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture* 334–337, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.035>
- Romano, N., Zeng, C., 2011. Importance of balanced Na⁺/K⁺ ratios for blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*, to cope with elevated ammonia-N and differences between in

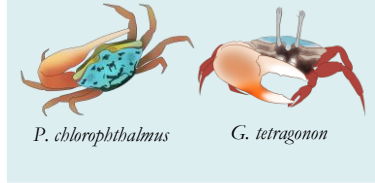
- vitro and in vivo gill Na⁺/K⁺-ATPase responses. *Aquaculture* 318, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.016>
- Romano, N., Zeng, C., 2007a. Acute toxicity of ammonia and its effects on the haemolymph osmolality, ammonia-N, pH and ionic composition of early juvenile mud crabs, *Scylla serrata* (Forskål). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.04.018>
- Romano, N., Zeng, C., 2007b. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture* 266, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.035>
- Ros, M., Guerra-García, J.M., Lignot, J.H., Rivera-Ingraham, G.A., 2021. Environmental stress responses in sympatric congeneric crustaceans: Explaining and predicting the context-dependencies of invader impacts. *Mar. Pollut. Bull.* 170, 112621. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112621>
- Rosenberg, M.S., 2020. A fresh look at the biodiversity lexicon for fiddler crabs (Decapoda: Brachyura: Ocypodidae). part 2: Biogeography. *J. Crustac. Biol.* 40, 365–383. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruaa029>
- Schubart, C.D., 2009. Mitochondrial DNA and decapod phylogenies: the importance of pseudogenes and primer optimization. *Crustacean* 47–65.
- Shchegolkova, N.M., Krasnov, G.S., Belova, A.A., Dmitriev, A.A., Kharitonov, S.L., Klimina, K.M., Melnikova, N. V., Kudryavtseva, A. V., 2016. Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions. *Front. Microbiol.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00090>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Taylor, H., Taylor, E., 1992. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 10. Decapod Crustacea. *Decapod Crustac.* 10, 203–293.
- Teets, N.M., Denlinger, D.L., 2013. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiol. Entomol.* 38, 105–116. <https://doi.org/10.1111/phen.12019>

- Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Mercky, Y., Lejeune, M., Lignot, J.H., Sucre, E., 2018a. Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: Integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species. *Aquat. Toxicol.* 196, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.003>
- Theuerkauff, D., Rivera-ingraham, G.A., Roques, J.A.C., Bertini, M., Lejeune, M., Farcy, E., Lignot, J., 2018b. Salinity Variation in a Mangrove Ecosystem : A Physiological Investigation to Assess Potential Consequences of Salinity Disturbances on Mangrove Crabs. *Zool. Stud.* 57, 1–16. <https://doi.org/10.6620/ZS.2018.57-36>
- Thomas, N., Lucas, R., Bunting, P., Hardy, A., Rosenqvist, A., Simard, M., 1996. Distribution and drivers of global mangrove forest change, 1996–2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179302>
- Thurman, C.L., 2004. Unravelling the ecological significance of endogenous rhythms in intertidal crabs. *Biol. Rhythm Res.* 35, 43–67. <https://doi.org/10.1080/09291010412331313232>
- Towle, D.W., Kays, W.T., 1986. Basolateral localization of Na⁺ K⁺-ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool.* 239, 311–318.
- Ungherese, G., Ugolini, A., 2009. Sandhopper solar orientation as a behavioural biomarker of trace metals contamination. *Environ. Pollut.* 157, 1360–1364. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.038>
- Vasselon, V., Rimet, F., Tapolczai, K., Bouchez, A., 2017. Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.024>
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H., Tilman, D.G., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecol. Appl.* 7, 737–750. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1997\)007\[0737:HAOTGN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0737:HAOTGN]2.0.CO;2)
- Vogt, G., 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* 114, 83–101. <https://doi.org/10.1007/BF00396642>
- Vogt, G., 1993. Differentiation of B-cells in the Hepatopancreas of the Prawn *Penaeus*

- monodon*. Acta Zool. 74, 51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1993.tb01220.x>
- Wear, R.J., Tanner, J.E., 2007. Spatio-temporal variability in faunal assemblages surrounding the discharge of secondary treated sewage. Estuar. Coast. Shelf Sci. 73, 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.03.008>
- Weihrauch, D., Becker, W., Postel, U., Luck-Kopp, S., Siebers, D., 1999. Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 169, 25–37. <https://doi.org/10.1007/s003600050190>
- Weihrauch, D., Becker, W., Postel, U., Riestenpatt, S., Siebers, D., 1998. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 168, 364–376. <https://doi.org/10.1007/s003600050156>
- Weihrauch, D., Morris, S., Towle, D.W., 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. J. Exp. Biol. 207, 4491–4504. <https://doi.org/10.1242/jeb.01308>
- Weihrauch, D., O'Donnell, M., 2017. Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates, Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39617-0>
- Weihrauch, D., O'Donnell, M.J., 2015. Links between osmoregulation and nitrogen-excretion in insects and crustaceans. Integr. Comp. Biol. 55, 816–829. <https://doi.org/10.1093/icb/icv013>
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., Shipin, O. V., 2009. Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. Ecol. Eng. 35, 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.021>
- Xiang, H., Li, K., Cao, L., Zhang, Z., Yang, H., 2020. Impacts of pollution, sex, and tide on the time allocations to behaviours of *Uca arcuata* in mangroves. Sci. Total Environ. 742, 140609. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140609>
- Young-Lai, W.W., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., 1991. Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*. Mar. Biol. 110, 293–300. <https://doi.org/10.1007/BF01313716>
- Zhang, K., Liu, H., Li, Y., Xu, H., Shen, J., Rhome, J., Smith, T.J., 2012. The role of

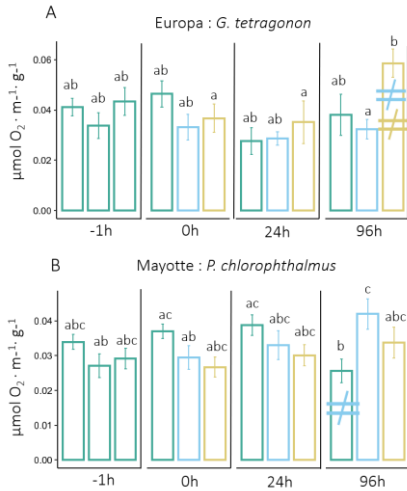
- mangroves in attenuating storm surges. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 102–103, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.021>
- Zhu, Z., Xiong, G., Xing, Z., 2005. Impacts of population growth and economic development on the nitrogen cycle in Asia. *Sci. China. C. Life Sci.* 48 Spec No, 729–737. <https://doi.org/10.1007/BF03187113>
- Zilli, L., Schiavone, R., Scordella, G., Zonno, V., Verri, T., Storelli, C., Vilella, S., 2003. Changes in cell type composition and enzymatic activities in the hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* during the moulting cycle. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 173, 355–363. <https://doi.org/10.1007/s00360-003-0348-6>
- Zuur, A.F., Hilbe, J.M., Ieno, E.N., 2013. *A Beginner's Guide to GLM and GLMM with R*, Beginner's Guide Series. Highland Statistics Limited.

Chapitre 3 – Conclusions



Résultats :

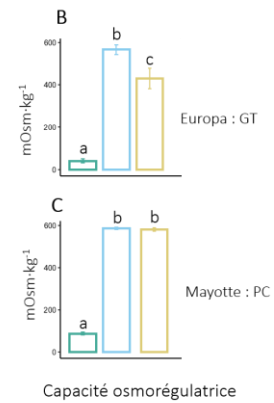
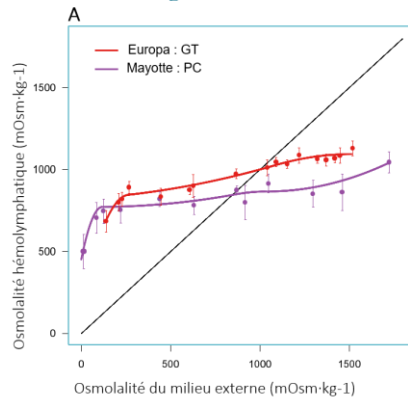
Consommation d'O₂ (96h)



Légende

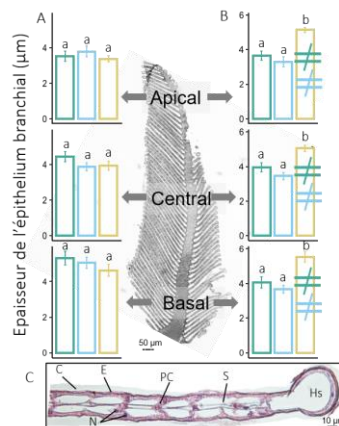
- Eau douce (0.5 ppt)
- Ammonium 10 mg·l⁻¹ (0.5 ppt)
- Eau usée prétraitée
- ≠ Diff. significative entre conditions (couleur)

Osmorégulation

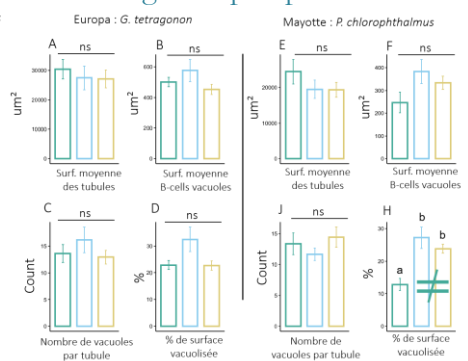


Histologie : branchie

Europa : *G. tetragonon* Mayotte : *P. chlorophthalmus*



Histologie : hépatopancréas



Points à retenir

- Les crabes d'Europa et de Mayotte sont de bons **hyper-hypo osmorégulateurs**, même si les crabes de Mayotte semblent mieux tolérer l'eau douce.
- Les crabes d'Europa exposés à l'eau douce + ammonium ont **du mal à maintenir leur capacité osmorégulatrice**, contrairement aux crabes de Mayotte.
- En 96h, la consommation d'O₂ des crabes d'Europa augmente lorsqu'ils sont exposés à l'ammonium, ce qui n'est pas le cas pour les crabes de Mayotte, qui voient au contraire leur consommation diminuer en eau de mer.
- Peu d'effets de l'eau douce et de l'ammonium sont observés à l'échelle de l'hépatopancréas.
- L'épaisseur de leur épithélium branchial des crabes de Mayotte augmente après 96h d'exposition à l'ammonium, ce qui peut représenter une acclimatation physiologique afin de **maintenir les fonctions** d'osmorégulation, d'excrétion d'ammonium et du métabolisme basal face à un **enrichissement nutritif**. Ce n'est pas le cas chez les crabes d'Europa.
- Les effets de l'ammonium ne sont pas **délétères** chez les deux espèces, cependant certaines fonctions importantes semblent **impactées chez les crabes d'Europa** ne connaissant pas d'enrichissement azoté. Les crabes de Mayotte montrent une **plasticité physiologique** leur permettant de **potentiellement mieux tolérer des épisodes de pollution**. Une vulnérabilité à l'« anthropisation » (enrichissement du milieu) plus importante de l'espèce de crabe dominante sur Europa dans l'habitat étudié tend à se confirmer.

Communication orale :

Congrès d'écophysiologie animale IV (CEPA) – Rennes – Novembre 2019



Discussion

Les objectifs de la thèse étaient les suivants :

- 1) Compléter les connaissances sur les effets de l'exposition à l'eau usée ou à l'ammonium sur la physiologie d'une espèce ingénier de crabe de mangrove (*Neosarmatium africanum*) de Mayotte en condition contrôlée en s'intéressant à un organe clé : l'hépatopancréas
- 2) Améliorer la compréhension des mécanismes écophysologiques individuels pouvant initier des modifications mesurables au niveau des communautés dans le milieu naturel anthropisé à travers l'étude de traits métaboliques et comportementaux d'une espèce de crabe violoniste (*Paraleptuca chlorophthalmus*) fortement impactée par les apports réguliers d'eau usée dans une mangrove de Mayotte
- 3) Étudier la vulnérabilité écophysologique des crabes de mangrove de deux îles connaissant des pressions anthropiques historiquement opposées, face une simulation d'anthropisation. Deux espèces de crabes (Ocypodidae) dominantes dans des habitats de canopée semi-ouverte sont étudiées dans les îles d'Europa (pristine) et de Mayotte (anthropisée) dans le Canal du Mozambique. Les réponses physiologiques des crabes sont étudiées face à un stress osmotique et à un apport d'ammonium qui simule des rejets hydrologiques issus d'une présence humaine.

Dans cette discussion, nous reviendrons dans une **première partie sur les résultats obtenus et sur la pertinence des marqueurs physiologiques et comportementaux utilisés** au regard des objectifs initiaux, des contaminants étudiés et des effets observés selon le niveau d'intégration.

Dans une **seconde partie, nous réfléchissons à l'apport de la physiologie dans la compréhension des processus écologiques des milieux naturels anthropisés**, au regard des résultats obtenus au cours de cette thèse et de la littérature scientifique. Nous discuterons des biais et des limites de l'extrapolation des résultats obtenus en laboratoire : peut-on passer de réponses physiologiques individuelles obtenues en conditions contrôlées à la compréhension de dynamiques naturelles complexes à l'échelle de l'écosystème ?

Dans une **troisième partie, nous réfléchissons à la notion de bioindication et à la mise en application de marqueurs sur des espèces bioindicatrices dans le cadre du suivi de l'état de santé des mangroves**. Les crabes de mangrove pourraient-ils être étudiés en tant qu'espèces bioindicatrices ? Quels liens pourrait-on établir entre les marqueurs écophysologiques développés et la mise en place de protocoles de suivi pour des gestionnaires ? Dans cette partie, nous introduirons également des travaux liés à la création d'un indicateur « crabe » dans le déploiement de la DCE mangrove (Directive Cadre sur l'Eau) auxquels nous avons participé et qui sont complémentaires à cette thèse.

1. Retour sur les biomarqueurs utilisés et les résultats obtenus au regard des différents niveaux d'intégration étudiés

La notion de **biomarqueur** a été définie par (Depledge, 1994) comme une “variation chimique, cellulaire, physiologique ou comportementale pouvant être mesurée dans des échantillons de tissus, de fluides corporels ou au niveau d'organismes entiers, et fournissant la preuve d'une exposition à un ou plusieurs polluants chimiques et/ou radiations, ainsi que les effets induits possiblement observables et/ou mesurables ” (trad. pers.). Ces biomarqueurs, en particulier ceux concernant les plus bas niveaux d'organisation biologiques, sont généralement considérés comme des **indices précoces et sensibles de stress chimique** (Amiard-Triquet and Berthet, 2015).

1.1 Mise en perspectives des résultats obtenus au regard des travaux antérieurs sur la thématique

Au cours de cette thèse, nous avons étudié les réponses physiologiques et comportementales de différentes espèces de crabes de mangrove en déployant des biomarqueurs à différents niveaux d'intégration. Les résultats obtenus répondent à nos objectifs et s'insèrent également dans un cadre plus global à l'échelle des études d'écophysiologie et d'écotoxicologie menées jusqu'alors à Mayotte. En effet, des précédents travaux portant sur les effets des rejets d'eau usée domestique et d'ammonium sur l'écophysiologie des crabes de mangrove ont déjà été réalisés sur le site d'étude de Malamani (Mayotte) par notre équipe. Nous proposons donc d'établir un premier bilan sur la base de nos résultats et de ceux préalablement acquis, au regard de données sur l'écologie des communautés de crabes collectées par nos collègues du laboratoire ECOLAB sur le même site (Capdeville, 2018). Ainsi, le **tableau 3** propose une synthèse des principales observations réalisées en milieu naturel sur les parcelles impactées (Capdeville, 2018; Herteman, 2010) en lien avec les principaux effets observés sur la physiologie des espèces de crabes (déclinés selon les biomarqueurs et les niveaux d'organisation biologique étudiés).

Eau usée domestique

Pour rappel, les seules espèces semblant avoir « tiré profit » des rejets d'eau usée domestique pendant plusieurs années appartiennent à la famille des Sesamidae, comme c'est notamment le cas de *P. guttatum* (**Figure 6** ; surabondance des individus de cette espèce sur les sites de rejet des eaux usées domestiques), dont les individus entrent en dépression métabolique lorsqu'ils sont exposés en laboratoire à de l'eau usée (Theuerkauff, 2019)(**Figure 27**). Par contre, *N. africanum*, appartenant à la même famille, connaît une diminution de son abondance sur les parcelles impactées. C'est également le cas de quasiment toutes les espèces d'Ocypodidae (parmi eux, les crabes violonistes), notamment *P. chlorophthalmus* qui disparaît quasiment des zones de rejets. Ce sont des espèces creusant des terriers, à la différence de *P. guttatum*. Toutes ces espèces de crabes ont témoigné d'une augmentation intense et rapide de leur consommation d'oxygène au cours d'expositions courtes à l'eau usée.

Chez toutes les espèces concernées par les expérimentations, les expositions à l'eau usée induisent une diminution de la capacité osmorégulatrice lorsqu'elles sont comparées à celles des crabes exposés aux mêmes salinités (0,5 – 5 ppt), ainsi qu'une diminution de l'activité de la NKA, même chez *P. guttatum*. Les autres marqueurs développés, lorsqu'ils sont communs, ont démontré des réponses différentes en fonction des espèces étudiées, et des résultats parfois complexes à interpréter : c'est notamment le cas des enzymes antioxydantes dans les branchies et l'hépatopancréas, ainsi que pour la production d'ERO's qui témoignent d'une grande variabilité inter-individuelle et de réponses sexe-spécifiques.

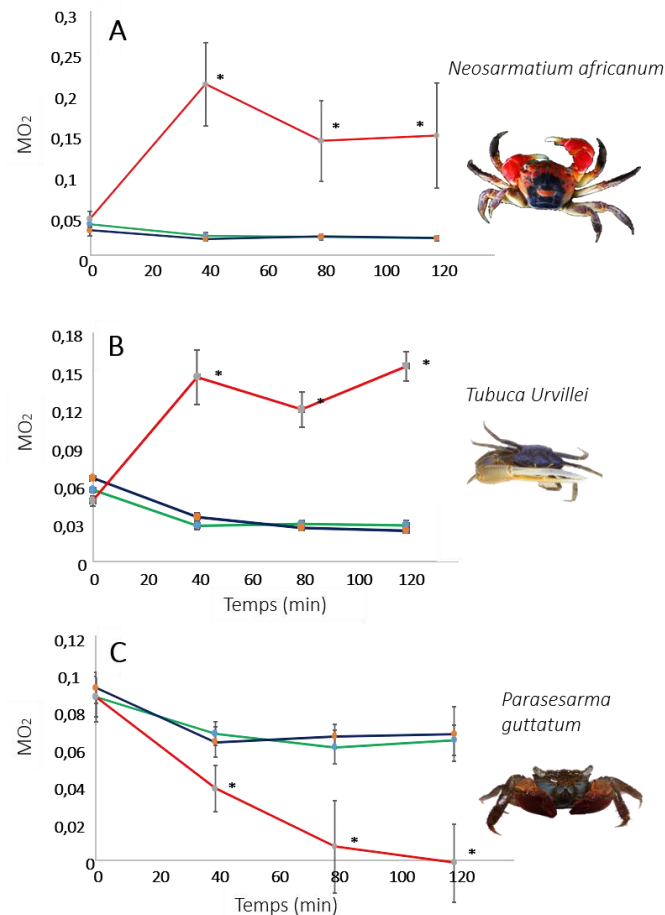


Figure 27. Aperçu des effets de l'eau usée sur la consommation d'O₂ de trois espèces de crabe de mangrove impactées différemment sur les parcelles polluées de Malamani (Theuerkauff et al., 2018a ; Theuerkauff et al., in prep) A, B : *N. africanum* et *T. urvillei* voient leur consommation d'O₂ augmenter rapidement lorsqu'ils sont exposés à l'eau usée, à l'inverse de *P. guttatum* qui diminue fortement sa consommation d'O₂. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les conditions ($p < 0,05$).

Dans cette thèse, nous avons pu compléter les connaissances des effets de l'eau usée sur *N. africanum* en développant des biomarqueurs à l'échelle de l'hépatopancréas. Ainsi, l'augmentation de la **vacuolisation des B-cells** ainsi que la **dilatation des tubules hépatopancréatique** (chapitre 1) révèlent l'existence d'un effet de l'eau usée à très court terme (5h), notamment sur les processus de digestion intracellulaire. En revanche, aucun effet n'a été observé sur les activités des enzymes antioxydantes, ni sur l'assimilation des nutriments à travers les activités des enzymes digestives.

Au regard des résultats obtenus sur les branchies (et les fonctions associées) dans les précédentes études, il apparaît que cet organe multifonctionnel serait le site le plus impacté par les rejets d'origine anthropique. Les marqueurs comportementaux développés avec *P. chlorophthalmus* ont permis d'apporter de nouveaux éléments de réponses quant aux effets potentiels de l'eau usée sur la physiologie des crabes de mangroves, mais également sur leurs potentielles stratégies de survie. En effet, l'augmentation rapide de la consommation

d'oxygène (chez toutes les espèces), la diminution de la capacité osmorégulatrice et de la production d'ERO's (confirmé chez une espèce : *T. urvillei*) en plus des autres effets que nous venons d'aborder, sont autant de causes potentielles d'une réponse d'émersion ou de fuite, qui pourrait expliquer pourquoi ces espèces quitteraient les zones impactées. Toujours dans ce sens, les résultats du **chapitre 2** ont permis de mettre en évidence une réponse d'émersion chez les crabes de mangrove, précédée d'une réponse d'agitation, « proxy » de fuite du milieu aquatique contaminé, qui disparaît une fois que les crabes sont tous émergés. Cette réponse est très rapide (3h d'exposition), et correspond à un potentiel épisode de pollution (pulse) dans une mangrove étudiée pour la bioremédiation, ou dans le cas d'un déversement ponctuel d'eau usée dans un cours d'eau. Ces réponses pourraient être différentes dans le cas de pollutions chroniques, où les sédiments deviendraient encore plus anoxiques et où les terriers ne seraient plus des refuges, mais des espaces contaminés. Ces terriers sont néanmoins indispensables à la survie de la majorité des espèces de crabes de mangrove. A l'échelle d'une journée, on observe généralement les crabes à l'extérieur de leurs terriers après la marée haute, sur un sédiment encore humide, mais il est beaucoup plus rare de les observer à l'extérieur lors des fortes températures et lors des épisodes secs où les crabes sont extrêmement vulnérables. Une exposition prolongée hors de leurs terriers pourrait alors augmenter fortement les risques de prédation (oiseaux, rats, chiens errants, ...), mais également le risque de dessiccation et favoriserait ainsi de mauvaises conditions de vie. En somme, **nos résultats tendent à supporter l'hypothèse que les populations stressées par les eaux usées se déplaceraient, modifiant *in fine* la structure des communautés dans les zones impactées.**

Il est à noter qu'aucune modification dans les marqueurs de métabolisme aérobie (citrate synthase) et anaérobie (LDH) n'a été identifiée lors de nos expérimentations. Il serait intéressant d'étudier ces types de marqueurs chez *P. guttatum*, qui réduit très fortement sa consommation d'O₂ lorsqu'il est exposé à l'eau usée. Cette dépression métabolique est souvent le signe d'un passage du métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie (Cooper et al., 2002; Fusi et al., 2017; Vianna et al., 2020), et cette espèce gère peut-être mieux les conditions hypoxiques que les autres espèces de crabes creusant des terriers. Un changement des communautés au profit des espèces ne creusant pas de terrier au détriment des espèces ingénieurs « à terrier » pourrait avoir des conséquences importantes sur l'écosystème, du fait de la diminution de la bioturbation et donc, des surfaces d'échange entre les compartiments. A cela s'ajoutent les observations réalisées sur d'autres mangroves (*in natura* ou en mésocosmes) où les activités des crabes et/ou les processus de remaniement sédimentaires ont été mesurés. Une corrélation a pu être réalisée entre des sédiments plus riches en nutriments et une diminution du temps passé par les crabes à se nourrir (en retournant le sédiment), voire à creuser des terriers (Bartolini et al., 2009; Xiang et al., 2020). Sur le site d'étude de Malamani, Theuerkauff et al., (2020) ont observé une diminution du nombre de terriers (Sesarmidae et Ocypodidae) fortement corrélée aux

salinités des eaux interstitielles représentant les zones de rejets d'eau usée, bien que les mêmes résultats n'aient pas été observés par Capdeville et al. (2018). En somme, la bioturbation réalisée par les crabes s'entend à deux niveaux : (1) le creusement des terriers et (2) le retournement de la couche de sédiments de surface lors de l'alimentation (pour les crabes violonistes). L'apport d'eaux usées impacterait le premier niveau de bioturbation (Theuerkauff et al., 2020) mais également le second lorsqu'avec des sédiments enrichis en nutriments, les crabes trouveraient plus rapidement de quoi se nourrir (Bartolini et al., 2009; Xiang et al., 2020). Dans le cas de Malamani, il n'est pas possible de conclure que le phénomène de bioturbation est impacté dans son ensemble car la réduction du nombre de terrier n'est pas nécessairement un proxy d'une réduction de biomasse de la communauté de crabes. En revanche, on peut dire que le premier niveau de bioturbation est négativement impacté par un remaniement en profondeur du sédiment limité dans les zones impactées. Les processus d'infiltration des eaux de surface (usées ou non) dans le sédiment seraient eux aussi impactés, ce qui engendrerait possiblement *in fine* une modification de la disponibilité des nutriments et de l'eau dessalée pour les palétuviers.

Dans tous les cas, les méthodologies consistant à étudier l'eau usée comme une condition d'expérimentation se heurtent à des biais rendant difficiles les comparaisons entre publications.

En effet, l'eau usée domestique représente la réalité de manière fidèle en termes de pertinence écologique, mais son caractère changeant la rend peu reproductible et limite donc les comparaisons entre les études (Theuerkauff, 2019). L'utilisation de l'ammonium seul a été proposée comme un proxy de l'eau usée qui permettrait de créer des conditions d'exposition contrôlées. Si nous avons vu que l'utilisation en tant que proxy n'était pas satisfaisante, cela a tout de même permis de relever des effets propres à ce contaminant principal de la majorité des eaux usées domestiques et d'ouvrir des perspectives d'études de stress combinés.

Ammonium

L'ammonium a donc représenté une composante importante étudiée au cours de cette thèse et des précédents travaux menés par Theuerkauff (2019). Comme mis en évidence lors du **chapitre 2** et au vu du tableau 3, le paramètre de l'eau usée qui semble finalement être le plus délétère pour les crabes est son caractère hypoxique, sans doute associé à des effets combinés de multiples contaminants que nous n'avons pas investigués. Il nous semble donc finalement inadapté d'utiliser l'ammonium comme proxy dans l'idée d'obtenir une condition d'exposition stable et représentative des eaux usées domestiques. Cependant, l'ammonium est bel et bien l'un de composants principaux de l'eau usée domestique et ses effets néfastes sur les crustacés aquatiques ont été étudiés depuis longtemps : cela a été discuté au cours des **chapitres 2 et 3**. D'un point de vue

méthodologique, cette condition est intéressante puisqu'elle permet de discriminer les effets « hypoxiques » des effets « autres contaminants » de l'eau usée. Nous l'avons vu lors du premier chapitre, l'exposition à l'ammonium provoque très peu d'effet sur l'hépatopancréas de *N. africanum*, et l'augmentation de la digestion intracellulaire ne semble pas liée au caractère hypoxique de l'eau usée. D'autres composantes pourraient donc entrer en jeu, sans doute de manière synergique.

Au cours du **chapitre 2**, l'exposition à l'ammonium a généré une augmentation de l'activité des crabes (sans faire augmenter l'agitation des pattes), mais ne déclenche pas de comportement d'émersion. Les crabes semblent donc capables de tolérer ce contaminant (en tout cas plus longtemps), auquel ils sont exposés à des concentrations environnementales durant 6h. Le chapitre 3 a confirmé cette tolérance chez la même espèce de crabe, provenant du même site en mangrove : l'exposition, cette fois prolongée à 96h, n'a pas généré d'augmentation de la consommation d'O₂, ni de dérèglement de la fonction osmorégulatrice et ne semble pas avoir modifié le fonctionnement des B-cells de l'hépatopancréas. En revanche, un processus d'acclimatation physiologique a été observé avec l'épaississement de l'épithélium branchial, fortement impliqué dans les mécanismes d'osmorégulation. Ce résultat contraste avec la réduction drastique de l'épaisseur de l'épithélium qui avait été observé chez *N. africanum* exposé durant 5h seulement à l'eau usée. Exposé à l'ammonium, *G. tetragonon* qui provient d'une mangrove pristine à forte influence marine, voit sa consommation légèrement augmenter au fil des 96h et sa capacité osmorégulatrice diminuer sans aucune modification de l'épithélium branchial (ni dommage, ni épaississement). C'est également le cas de *N. africanum* exposé à des concentrations légèrement plus importantes pendant 24h à 72h. Ainsi, les expositions à l'ammonium ont montré que *G. tetragonon* était une espèce potentiellement moins tolérante à un enrichissement azoté en ne développant pas d'acclimatation physiologiques visibles en 96h. Cependant, elle pourrait également recourir à d'autres mécanismes plus coûteux en énergie, basés sur l'utilisation d'autres types de transporteurs ioniques que nous n'avons pas étudiés.

On peut alors émettre l'hypothèse qu'une implantation humaine génératrice d'eaux usées domestiques non traitées, sur des territoires jusqu'alors pristines, pourrait avoir des conséquences drastiques sur certaines populations de crabes. Un tel scénario écologique est tout à fait envisageable dans le contexte Ouest africain et malgache où les écosystèmes insulaires inhabités connaissent une expansion humaine massive depuis une dizaine d'années.

On peut également s'attendre à ce que des espèces de crabes telles que *P. chlorophthalmus*, capables de tolérer les épisodes d'apports azotés en développant des acclimations physiologiques, deviennent dominantes dans les zones contaminées par les rejets qui étaient auparavant dominées par des espèces sensibles telles que *G. tetragonon*. A Mayotte,

où les rejets d'eaux usées sont fréquents dans les mangroves, on constate que *P. chlorophthalmus* est très répandu alors que *G. tetragonon* est beaucoup moins observé. Dans cette section nous avons abordé l'ammonium, mais il faut également préciser que les eaux usées sont aussi des eaux dessalées et que *G. tetragonon*, bien qu'étant un excellent osmorégulateur a une tolérance plus réduite aux basses salinités. Ceci constitue un autre facteur aggravant potentiel dans le contexte étudié.

De manière très synthétique, nous pouvons retenir que :

- **L'osmorégulation et la respiration** (taux métabolique) sont les fonctions les plus sensibles (réponse précocement détectables) face à une pollution à **l'eau usée** domestique chez les **crabes** de mangrove ;
- Les **branchies** antérieures et postérieures représentent les **organes les plus impactés** ;
- Des **réponses différentes** entre les espèces sont observées ;
- **L'ammonium a des effets limités** sur la physiologie des crabes de mangrove exposés à **court terme** à des **concentrations environnementales** ;
- **L'hypoxie** représente l'effet le **plus délétère et indirect** observé dans l'eau usée étudiée ;
- Des études basées sur l'utilisation **d'eaux usées artificielles** (composition maîtrisée) en conditions contrôlées permettraient une **reproductibilité** des expérimentations
- Des **réponses comportementales « simples »** sont très rapidement observées et ouvrent des **perspectives** d'études permettant de mieux comprendre les **observations *in natura***;

1.2 Marqueurs biochimiques et histologiques au niveau cellulaire et subcellulaire

Si le développement des biomarqueurs en tant que système d'alerte précoce d'éventuels changements écologiques remonte aux années 1980's, les méthodologies d'utilisation et d'interprétation sont sans cesse révisées, remises en cause et augmentées de nouveaux biomarqueurs (Tlili and Mouneyrac, 2021). L'une des causes principales de ces révisions sont les critiques ciblant généralement leur manque de spécificité et/ou de pertinence écologique (Amiard-Triquet et al., 2011; Cairns, 1992; Forbes et al., 2006). En effet, les biomarqueurs sub-individuels et/ou individuels sont importants dans la détermination de la base mécanistique des effets du stress sur les systèmes biologiques, mais le **lien entre des réponses cellulaires et de potentiels impacts écologiques** est souvent complexe à réaliser (Mouneyrac and Amiard-Triquet, 2013). Il y a quelques années, les études mettant en évidence les liens entre les réponses biologiques infra- et supra-individuelles étaient en effet plus rares (De Coen and Janssen, 2003; Weis et al., 2001), mais de plus en plus d'études visent aujourd'hui à utiliser des biomarqueurs individuels fortement liés aux observations écologiques.

Les biomarqueurs ont ainsi été classés selon des catégories dépendantes de leur objectif et de leur niveau d'intégration. Il existe, d'abord, une distinction entre les marqueurs permettant aux organismes de faire face à la présence de contaminants dans le milieu extérieur, et ceux visant à révéler des effets délétères, que nous pouvons nommer respectivement **biomarqueurs de défense et de dommages** (De Lafontaine et al., 2000). Il est admis que les mécanismes de tolérance chez les organismes aquatiques incluent la limitation de l'absorption, la détoxification des contaminants bioaccumulés ainsi que l'augmentation de l'excrétion (Amiard-Triquet et al., 2011). Au cours du premier chapitre de cette thèse, nous avons utilisé des marqueurs de défense et de dommage à des niveaux d'organisation assez bas (cellulaire, subcellulaire), afin d'obtenir une vision fine des potentiels effets des eaux usées sur les fonctions physiologiques principales de *Neosarmatium africanum*.

Ces marqueurs ont été sélectionnés dans le but de cibler certaines fonctions cruciales de l'**hépatopancréas, organe majeur du métabolisme**, aussi impliqué dans les fonctions de digestion, de détoxification et de sécrétion comme nous l'avons vu. Plusieurs études ont montré l'importance de l'hépatopancréas dans la compréhension des modifications biochimiques et histologiques causés par les polluants chez les crustacés (Das et al., 2019; Lin et al., 2017; Saravana Bhavan and Geraldine, 2009), notamment le cadmium ou des pesticides, mais très peu d'entre elles portent sur les effets des eaux usées domestiques. Ce choix a également été réalisé au regard des travaux ayant déjà été publiés sur la physiologie de cette espèce et qui concernaient les branchies ou le métabolisme global (Theuerkauff et al., 2018a, 2018b). Nous souhaitons ainsi obtenir une **vision intégrative des atteintes**

des processus physiologiques par les eaux usées sur une espèce ingénier de crabe de mangrove à une échelle assez fine, d'où le choix de continuer à travailler sur *N. africanum* dans cette première partie de la thèse. Les activités de la GST, CAT et SOD mesurées lors du premier chapitre sont reconnues dans la littérature comme des biomarqueurs de défense : la GST pour son rôle dans la biotransformation des contaminants organiques, la CAT et la SOD comme défenses antioxydantes contre les pro-oxydants environnementaux (Roméo and Wirgin in Amiard-Triquet et al. (2011), Regoli et al. in Amiard-Triquet et al. (2011)). Nous avons vu que ces fonctions n'étaient globalement pas impactées : les crabes exposés durant 5h à l'eau usée ou à l'ammonium n'augmentent pas leurs mécanismes de défenses, et celles-ci ne sont pas non plus saturées au point de devenir des marqueurs de dommages. Les autres activités mesurées sont celles des enzymes digestives : protéases totales, trypsine et chymotrypsine, souvent utilisées comme des marqueurs de dommages en relation à des contaminants du fait de leur rôle central dans le processus de digestion de nourriture (De Coen and Janssen, 1998). Aucune modification desdites activités n'a été remarquée chez *N. africanum*, où l'exposition à l'eau usée et à l'ammonium n'engendre pas de hausse ni de diminution de l'activité digestive. Les analyses histologiques sont également utilisées depuis longtemps comme marqueurs de dommages sur différents tissus de l'organisme des crustacés. Nous avons utilisé quatre paramètres histologiques plutôt basés sur les fonctions de digestion intracellulaire et de potentielle excrétion, afin d'obtenir à l'échelle de l'hépatopancréas des marqueurs témoignant des trois fonctions principales. Ces marqueurs histologiques ont montré que l'eau usée domestique semble engendrer une hausse de la vacuolisation au sein des B-cells, qui n'est pas forcément liée à une excrétion des polluants mais sans doute à une augmentation de la digestion intracellulaire.

Les trois types de marqueurs utilisés dans le chapitre 1 peuvent jouer un rôle à un niveau d'intégration plus haut, l'organisme. En effet, les défenses antioxydantes pouvant être déployées contre les polluants reposent sur des mécanismes métaboliques coûteux (Calow, 1991). De même, les polluants ingérés par les crustacés peuvent interférer avec les processus de digestion, entraînant parfois l'inhibition de l'activité des enzymes digestives.

Limites rencontrées - Chapitre 1

- Grande variabilité interindividuelle notamment pour les activités enzymatiques, qui peut être due au N relativement faible ($N \sim 8$)
- Difficulté d'interprétation des réponses des enzymes antioxydantes
- Marqueurs histologiques se focalisant sur un seul type cellulaire (B-cells) dont les fonctions sont encore débattues

Cette inhibition génère des problèmes d'assimilation des nutriments et impacte les réserves énergétiques, pouvant conduire à des dysfonctionnements métaboliques à l'échelle de l'organisme (De Coen et al., 2000; Seebaugh et al., 2011; Weis, 2015). Enfin, l'augmentation de la vacuolisation des B-cells observée chez *N. africanum* entre également en compte dans les compromis métaboliques déjà observés dans l'article de Theuerkauff et al. (2018a) à l'échelle des

branchies. La mise en place de ces différents biomarqueurs à l'échelle des branchies et de l'hépatopancréas a permis de mieux comprendre quelles fonctions cruciales étaient potentiellement impactées et quels **compromis métaboliques** pouvaient être induits : compromis entre respiration et excrétion de l'ammonium (modification de l'épaisseur des branchies), entre respiration et osmorégulation (diminution de la capacité osmorégulatrice dans l'eau usée), augmentation de processus métaboliques coûteux (respiration, excrétion, digestion intracellulaire). Dans le chapitre trois, nous avons souhaité étudier ces deux organes chez *P. chlorophthalmus* et *G. tetragonon* en procédant à des analyses histologiques suivant le même protocole que (Theuerkauff et al., 2018a) pour les branchies postérieures, ainsi que celui déjà mis au point lors du chapitre 1 (Mégevand et al., 2021) pour l'hépatopancréas, avec des expositions de 96h à l'eau de mer diluée et à l'ammonium.

Les résultats tendent à montrer ici une **acclimatation des crabes de Mayotte** face à l'exposition à l'ammonium au niveau branchial (épaississement de l'épithélium) et au niveau de l'hépatopancréas (augmentation de la vacuolisation) sans dommage observé chez l'une ou l'autre espèce de crabe. Ces acclimations observées permettent sans doute de pallier la demande énergétique potentiellement accrue du fait de l'exposition à l'ammonium de 96h : augmentation de l'excrétion de l'ammonium et de la fonction osmorégulatrice par exemple, discutées plus précisément dans le chapitre 3. Chez *G. tetragonon* où ces acclimations ne sont pas observées, nous avons mesuré une consommation d'oxygène qui augmente après 96h d'exposition à l'ammonium. Les marqueurs à l'échelle infra-individuelle nous ont permis, dans ce chapitre également, de mieux comprendre les mécanismes pouvant se mettre en place sur une exposition relativement courte à un contaminant comme l'ammonium.

1.3 Le taux métabolique : un marqueur intégratif à l'échelle de l'organisme et au-delà

Les branchies étant le site majeur de la respiration, de l'osmorégulation et de l'excrétion de l'ammonium, ce sont elles qui semblent être le plus sujettes aux effets, voire aux dommages engendrés par les eaux usées mais également à l'ammonium. Chez *P. chlorophthalmus* exposé à l'eau usée (chapitre 2), des marqueurs métaboliques ont été utilisés en complément de l'expérimentation de respirométrie pour justement affiner les connaissances des mécanismes générant une augmentation de la consommation d'oxygène observée quasiment immédiatement après exposition. Aucune modification n'a été observée dans l'activité de la CS (marqueur de métabolisme aérobie) ni la LDH (marqueur du métabolisme anaérobie), tandis qu'une très forte augmentation de la consommation d'oxygène a été remarquée, tout comme chez *N. africanum* exposé à l'eau usée durant 5h.

Ainsi, les biomarqueurs mis en place au cours de cette thèse à l'échelle infra-individuelle ont été mis en lien avec des niveaux d'organisation plus hauts notamment à l'aide de

mesures du métabolisme “au repos”. Il semble clair qu’un stress lié à des contaminants peut augmenter la demande métabolique basale, principalement pour compenser les coûts liés à la régulation de mécanismes cellulaires de protection tels que la synthèse des métalloprotéines (pour les métaux), les défenses antioxydantes, la régulation ionique, etc. (McGeer et al., 2000; Sokolova and Lannig, 2008; Theuerkauff, 2019; Valavanidis et al., 2006). Les mesures de taux métabolique aérobie (consommation d’oxygène, ou MO_2) appliquées à des problématiques d’écologie animale ont été de plus en plus populaires depuis les années 2000, notamment grâce aux hypothèses concernant la **théorie métabolique de l’écologie** (Clark et al., 2013). Cette théorie, publiée par Brown et al. (2004), a été décrite comme l’une des plus significatives de son temps (Whitfield, 2004). Elle prédit les effets de la taille du corps et de la température sur le métabolisme, en prenant en compte les réseaux de distribution vasculaire et la cinétique biochimique : l’activité métabolique (comme la respiration, la synthèse de nouveaux tissus, la production primaire) serait limitée par le transport des nutriments et leur distribution dans le corps (O’Connor et al., 2007). Cette théorie part du principe que le taux métabolique d’un organisme (influencé par sa taille et la température) représente la principale limite de nombreux autres traits essentiels, comme la rapidité avec laquelle l’organisme peut croître et se développer, ainsi que d’autres paramètres à des niveaux d’intégrations à l’échelle infra- et supra-individuelle. Ainsi, le taux métabolique devient un facteur de poids dans les réponses des organismes, des communautés, des populations voire des écosystèmes. Par exemple, Schramski et al. (2015) ont extrapolé la théorie afin de démontrer que le métabolisme individuel des organismes était impliqué dans le contrôle des cycles de matière (notamment du carbone) et les flux d’énergie à l’échelle des écosystèmes. L’importance de ce métabolisme portée à des niveaux de compréhension des flux de carbone et donc de conservation des écosystèmes a donné aux mesures de taux métaboliques une place importante dans les marqueurs capables de faire le lien entre différents niveaux d’intégration. Si cette théorie est de plus en plus controversée (Hatton et al., 2019; O’Connor et al., 2007; Price et al., 2012), il n’en reste pas moins que **le taux métabolique est souvent considéré comme un marqueur pouvant représenter un "chaînon manquant"** dans la compréhension des dynamiques de croissance, de fitness, de survie entre des niveaux d’intégration très différents. Récemment, l’étude des taux métaboliques a fait l’objet d’une attention encore grandissante en raison de la nécessité de comprendre la plasticité et les réponses évolutives face aux changements environnementaux, notamment au sein des écosystèmes aquatiques (Killen et al., 2021).

De manière concrète, la vitesse de consommation d’oxygène d’un organisme dans son environnement est censée être liée au taux de production d’ATP par phosphorylation oxydative mitochondriale. Par conséquent, elle est considérée comme un proxy du taux métabolique (Nelson, 2016). La méthode la plus largement répandue pour la mesure de taux métabolique chez les animaux aquatiques est celle de la respirométrie à flux

intermittent (Steffensen et al., 1984; Svendsen et al., 2016). Plusieurs types de traits métaboliques peuvent être mesurés en fonction des questions posées : s'intéresse-t-on au métabolisme et à son fonctionnement basal (correspondant au taux métabolique standard ou au repos) ? Cherche-t-on plutôt à l'étudier à un certain niveau d'activité défini, ou en lien avec un certain type de comportement (taux métabolique de routine) ? Ces différents traits sont définis brièvement dans le **Tableau 4**.

Tableau 4. Principaux taux métaboliques étudiés chez les poissons et les invertébrés aquatiques, définitions et type de problématiques pouvant être envisagées.

Type de variable métabolique	Définition	Condition de mesure	Types de problématiques étudiées	Références
Taux métabolique standard (anglais : SMR)	Consommation d'O₂ minimale nécessaire au maintien des fonctions vitales d'un organisme (ex : ventilation, travail cardiaque, osmorégulation, renouvellement cellulaire, etc.)	Mesuré chez un individu à jeun, au repos et hors maturation sexuelle.	Importance fonctionnelle majeure Allocation énergétique Etude de l'impact sur les fonctions physiologiques sans réponses de fuite ou de défense	Fry, 1971; Durolet, 2015; Chabot, 2016
Taux métabolique de routine (anglais : RMR)	Taux métabolique moyen d'un individu effectuant des activités spontanées . Correspond au métabolisme de base + activités discrétionnaires et spontanées (nage, digestion). Se situe entre le SMR et le MMR.	L'individu est libre de ses mouvements.	Souvent utilisé pour mesurer une réponse métabolique à un stress : perception d'un prédateur. Proxy de réponses comportementales en cas de stress chez les crustacés, poissons et céphalopodes	Killen et al., 2021; Durolet, 2015, Chabot et al., 2016, Ikeda, 2016; Borges, 2018
Taux métabolique maximum (anglais : MMR)	Taux maximal d'absorption d'O₂ , qu'un animal peut atteindre pour générer de l'ATP aérobie . Estimation de la dépense énergétique maximale atteinte lors d'activité soutenues.	Poissons : tunnel de nage à vitesse croissant ou chasse jusqu'à épuisement. Crustacés : stimulation et placement sur le dos répétés jusqu'à impossibilité de se retourner.	Limites de l'individu	Norin and Clark, 2016 Durolet, 2015 Rosewarne et al., 2016
Capacité métabolique aérobie (anglais : aerobic scope, AS)	Capacité maximale à fournir de l'O ₂ pour soutenir les activités métaboliques au-delà du SMR . Quantité globale d'O ₂ pouvant être consommée par l'animal.	MMR – SMR (absolue) MMR / SMR (factorielle)	Considérée comme un « proxy de la fitness » de l'animal Définition des limites et optimum de tolérance de la température chez les poissons	Fry, 1971 ; Durolet, 2015; Priede, 1985; Claireaux et Lefrançois, 2007

Au cours de cette thèse, nous avons principalement étudié le **taux métabolique au repos** (“resting metabolic rate”), qui peut être considéré comme un taux métabolique standard moins exigeant (Killen et al., 2021), dans les cas où il est connu que l'activité de l'animal sera très limitée (Chabot et al., 2016) : c'est le cas des crabes étudiés qui sont connus pour être « léthargiques » (Crane, 1975; Weis and Weis, 2004) et qui sont maintenus dans des chambres métaboliques limitant leurs mouvements. L'intérêt ici était de comprendre les effets des contaminants sur le métabolisme des crabes à l'échelle des fonctions vitales : respiration, ventilation, osmorégulation, excrétion de l'ammonium, sans mesurer en

addition de réponse spontanée liée à la mobilité de l'organisme comme un comportement d'évitement par exemple (cas du RMR). La mesure d'un taux métabolique de routine aurait également pu représenter un proxy de réponses comportementales si celles-ci n'avaient pas été mesurées par ailleurs, en intégrant dans les mesures les potentiels mouvements des crabes par exemple, lorsqu'ils se retrouvent totalement immergés.

Nos résultats ont montré une explosion de la consommation d'oxygène chez *P. chlorophthalmus* exposé à l'eau usée domestique durant 6h (chapitre 2) où, nous l'avons vu, la consommation d'origine bactérienne et microbienne est soustraite des mesures. Les résultats de Theuerkauff, (2019) et Theuerkauff et al. (2018a) montrent également des effets remarquables sur la balance énergétique des trois espèces de crabes étudiées. *N. africanum* (anciennement *meinerti*) et *T. urvillei*, ont vu leur demande énergétique augmenter fortement lors d'expositions courtes aux eaux usées domestiques. Au contraire, la troisième espèce étudiée, *P. guttatum* (espèce devenant plus abondante dans la zone impactée d'après Capdeville (2018) connaît une forte baisse de son taux métabolique (**Figure 27**), ce qui correspondrait à une stratégie plus souvent adoptée par les organismes aquatiques en condition hypoxique (Cooper et al., 2002). Les réponses observées chez *P. chlorophthalmus* sont cohérentes avec celles décrites ici.

Cette hausse du taux métabolique quasi immédiate dans un contexte expérimental où les crabes ne peuvent pas émerger n'est cependant pas forcément représentative des phénomènes se produisant dans le milieu naturel impacté. Dans le cadre d'un processus de bio-épuration comme celui mis en place dans la mangrove de Malamani, les effluents prétraités étaient aspergés à marée basse dans les parcelles de mangrove. Dans ce cas, les terriers peuvent être inondés après plusieurs heures d'aspersion, mais les crabes ont généralement la possibilité de sortir de leur terrier et de se réfugier sur des zones topographiquement plus élevées (en augmentant les risques de prédation et de dessiccation), ou de rester dans leurs terriers auxquels ils sont fidèles (Cannicci et al., 1999). C'est avec ces possibilités en tête et au regard des résultats évoqués dans la littérature que nous avons souhaité investiguer certaines réponses comportementales des crabes exposés à l'eau usée et à l'ammonium.

1.4 Traits comportementaux

Ces traits comportementaux ont été étudiés dans des microcosmes n'ayant pas l'ambition de recréer un milieu de mangrove. Nous souhaitons, pour une première expérience de la sorte, travailler sur des **réponses relativement binaires (émersion/immersion)** et suivre des paramètres précis qui pourraient aider à mieux comprendre des réponses comportementales retrouvées dans le milieu naturel : distance parcourue, mobilité, agitation des pattes. Dans cette thèse, les réponses comportementales représentent le plus haut niveau d'intégration étudié. De nombreuses études ont démontré l'intérêt de

marqueurs comportementaux dans le domaine de l'écotoxicologie, ce niveau d'intégration permettant de faire le lien entre des fonctions physiologiques (pouvant être impactées) et des processus écologiques observés suite à une contamination (Scott and Sloman, 2004; Sloman and Mcneil, 2012) (**Figure 28**).

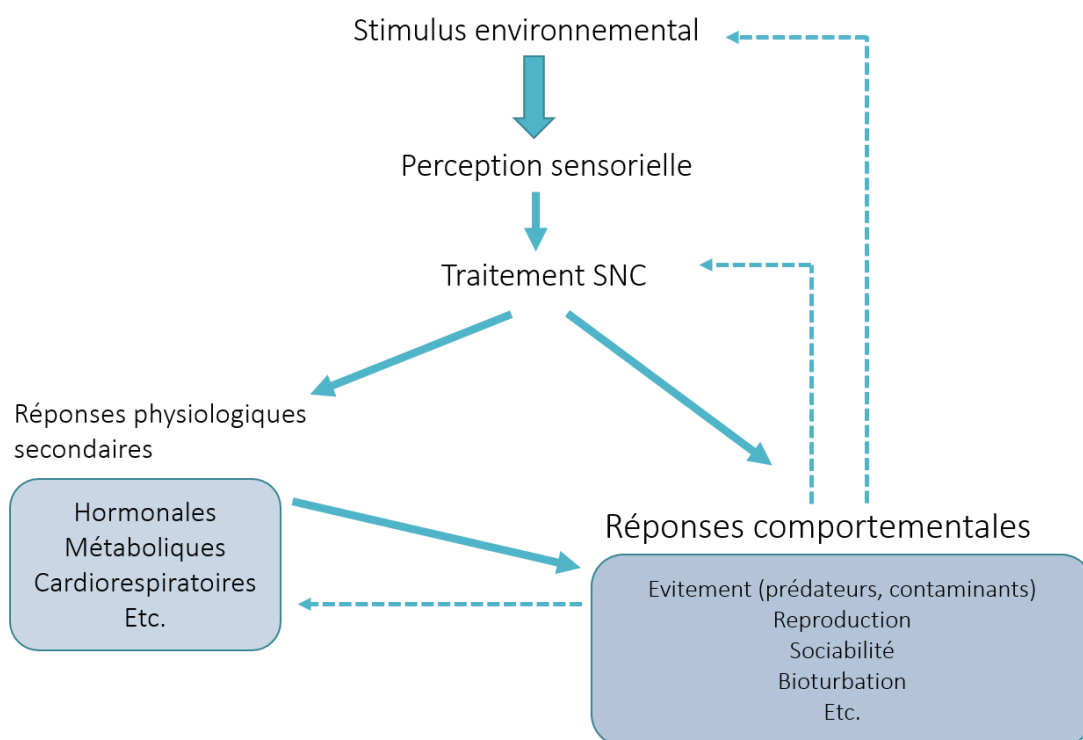


Figure 28. Schématisation des interactions entre les processus environnementaux, les réponses physiologiques et le comportement chez des poissons mais pouvant s'appliquer aux crabes. De nombreux facteurs physiologiques et environnementaux influencent le comportement basique des organismes. Après la perception appropriée d'un stimulus environnemental, l'information sensorielle est généralement intégrée par le système nerveux central des vertébrés, ou à travers les ganglions chez les crustacés décapodes. Des réponses physiologiques secondaires peuvent alors se déclencher, et ces changements physiologiques (à différents niveaux d'organisation biologique) vont déterminer les réponses comportementales aux stimuli. Les changements comportementaux peuvent par la suite influencer à leur tour les processus physiologiques ultérieurs et les stimuli environnementaux. D'après Scott and Sloman (2004).

Si ces réponses sont observées et mesurées chez les crustacés depuis longtemps, la connaissance préalable de leur comportement en milieu naturel est cruciale afin de pouvoir par la suite établir des marqueurs de changement. Des auteurs comme Crane (1975), de la Iglesia et al. (1994), Kohler et al., (2018), Nordhaus et al., (2009), Weis and Weis, (2004) ont travaillé à la caractérisation de comportements de base chez les crustacés (crabes de mangroves, crevettes, amphipodes) en milieu naturel. On peut citer notamment pour les crabes de mangrove :

- Comportement alimentaire

- “Waving” et interactions sexuelles
- Toilettage
- Interactions agonistiques (offensives et défensives)
- Construction de terriers
- Déplacement - éloignement du terrier
- Temps passé dans les terriers
- Rythmes de vie : temps passé pour chacune de ces activités

Ces études sont absolument nécessaires préalablement au choix de traits comportementaux faisant office de marqueurs permettant de comprendre les effets d'un stress sur des comportements de base. Il est cependant important de noter que ces comportements de base, en milieu naturel, sont très souvent dépendants de l'espèce. Ainsi, même si plusieurs espèces de crabes violonistes partagent le même habitat, il a été prouvé qu'ils ne partagent pas forcément le même rythme de vie, ni le même temps alloué à chaque activité. *P. chlorophthalmus* est par exemple plutôt caractérisé comme un crabe “léthargique” dont la principale activité est l'alimentation, contrairement à ses congénères *Gelasimus vocans*, occupant le même habitat, caractérisés comme très actifs, se déplaçant beaucoup et ayant un comportement agressif à l'égard de leurs congénères (Weis and Weis, 2004). Il semble alors important d'adapter chaque marqueur comportemental aux caractéristiques de base des espèces étudiées afin de pouvoir interpréter finement les réponses observées sans sous-estimer ni surestimer la sensibilité des espèces (Kohler et al., 2018).

Dans notre étude, nous avons cherché à comprendre si les crabes développeraient un comportement de fuite et/ou d'émersion potentielle en étant exposés à de l'eau usée dans un microcosme très simplifié offrant un choix binaire. Le marqueur comportemental pourrait servir à relier certaines réponses à des niveaux d'intégration inférieurs (notamment

Limites rencontrées - Chapitre 2

- Taux métabolique dans l'eau uniquement : échec de la mise en place d'une méthode de respirométrie bimodale sur l'espèce étudiée dont la taille est trop petite (*P. chlorophthalmus*)
- Pertinence écologique en conditions expérimentales : microcosmes très simplifiés, réponses individuelles, une seule « pulse exposure » (Table 3)
- Poids des branchies < 3 mg : peu de tissu pour réaliser les activités enzymatiques (CS, LDH), signal assez faible

le taux métabolique), avec des observations réalisées en milieu naturel sur le site de Malamani. En effet, nous avons vu que les crabes exposés à l'eau usée augmentent très fortement et très rapidement leur consommation d'oxygène (moins de 6h). Nous n'avons pas observé de mortalité car ce laps de temps est court, et que l'eau usée était régulièrement

réoxygénée afin d'éviter justement aux crabes un stress anoxique (qui n'était pas l'objet de notre étude). Ce design expérimental ne permettait cependant pas aux crabes d'émerger du milieu d'exposition, ce qui n'est pas forcément cohérent avec la réalité du milieu naturel.

L'expérience comportementale mise en place, même si très basique, permettait d'avoir une approche un peu plus cohérente avec les choix potentiels réalisés par les crabes lors des phases de pollution dans le milieu naturel. Avec l'étude du taux métabolique, nous avons pu voir à quel point l'exposition à l'eau usée engendrait une hausse intense de la consommation d'oxygène à très court terme. L'expérience comportementale a permis de montrer que les crabes, lorsqu'ils n'étaient pas contraints par la chambre métabolique, optaient pour un potentiel comportement de fuite et d'émersion. Ces **réponses à très court terme** représentent un premier élément contribuant à la compréhension des changements observés dans cette population à Malamani, à savoir leur quasi disparition des zones régulièrement impactées. Une étude à moyen voire long terme en mésocosme recréant des conditions de marée en mangrove représenterait une étape cruciale pour vérifier les réponses comportementales aux modifications observées à l'échelle des communautés par Capdeville et al. (2018).

2. Des biomarqueurs en appui à la compréhension des dynamiques en milieu naturel : apports de l'écophysiologie

2.1 Du milieu naturel vers le laboratoire : simplification et reproductibilité

Nous l'avons vu, l'écophysiologie se situe à l'interface entre la **description des réponses individuelles ou de groupe face à des conditions environnementales, et l'analyse des mécanismes engendrant ces réponses dépendantes de l'environnement, à différents niveaux d'organisation** (Block and Vannier, 1994). L'analyse des mécanismes physiologiques est donc interprétée à la lumière de conditions environnementales données, qui peuvent être naturelles (site d'étude anthropisé ou non) ou plus ou moins contrôlées (site pilote de Malamani, création de mésocosmes ou de conditions expérimentales avec des stress et contaminants définis). Dans cette thèse, nous nous situons principalement dans ce deuxième cas puisque nous avons exposé nos crabes à des stress de contaminant précis en condition contrôlée. Si le premier chapitre avait pour vocation principale la compréhension des mécanismes physiologiques face aux contaminants pouvant être retrouvés en mangrove (eau usée, ammonium), le deuxième chapitre avait pour objectif de comprendre si ces mécanismes physiologiques pouvaient contribuer à expliquer des modifications observées à l'échelle des populations voire des communautés en milieu naturel anthropisé. Dans ce cas, nous pouvons penser que les expérimentations réalisées relèvent bien du domaine de l'écophysiologie comme définie plus haut. Notre démarche tend à faire le lien entre la réponse des crabes observée sur le terrain à l'échelle des communautés face à des conditions environnementales stressantes : rejets d'eau usée domestique (Capdeville, 2018), et les capacités physiologiques de trois espèces de crabes

représentatives de cette communauté (Theuerkauff, 2019). Ainsi nous visons à mieux comprendre, à différents niveaux d'intégration, quels mécanismes physiologiques pouvaient être impactés ou mis en œuvre pour induire les réponses observées dans le milieu naturel. Cela implique la mise en place d'expérimentations reproductibles en conditions contrôlées, mais représentatives de conditions environnementales, à travers une représentation simplifiée de ce que les crabes pourraient connaître en milieu naturel, considérant tous les biais que cela peut impliquer. Les biais de simplification que nous avons rencontrés sont expliqués dans le **tableau 5** en lien avec le chapitre 2.

Tableau 5. Pertinence des marqueurs physiologiques mis en place dans le chapitre 2 au regard de leur cohérence écologique et présentation des biais issus de la simplification pour réaliser les expérimentations

Contaminants - Expérimentations	Intérêt condition contrôlée	Enjeu milieu naturel	Biais de simplification	Pistes d'amélioration
Eau usée domestique	Représentation fidèle des conditions environnementales	Représentation fidèle des conditions environnementales	Composition changeante (sites, saison)	Fabriquer une eau usée artificielle répliquable
			Quelle conservation ?	
			Complexité d'acquisition	
Ammonium	Effet du contaminant sans effets multiples ni hypoxie	Composante principale de la plupart des eaux usées	Une seule concentration testée Proxy de l'eau usée peu satisfaisant	Développer des expérimentations à stress multiples (ammonium + hypoxie par exemple)
Comportement	Design binaire simple à mettre en place	Simulation d'un épisode de pollution <i>in situ</i> Une certaine cohérence biologique des traits mesurés : - Entrée/ sortie de terrier - Fuite, agitation	Peu représentatif du milieu naturel : - Marées - Sédiments et terriers - Relations inter- et intraspécifiques - Prédation	Mise en place de mésocosmes plus réalistes Observations et prise de vidéos directement en milieu naturel
	Acquisition de paramètres basiques		Temps d'exposition court : pas représentatif de la chronicité des épisodes de pollution	Répéter les expositions de 6h pendant plusieurs semaines
Consommation d'O ₂	Réponse individuelle contrôlée Méthodologie maîtrisée et répliquable	Simulation d'un terrier ennoyé par l'eau usée	Respiration aquatique uniquement Pas de prise en compte de la possibilité d'émersion en milieu naturel	Développement d'un système de respirométrie bimodale
Marqueurs métaboliques (CS - LDH)	Mécanismes physiologiques sous-jacents	Potentielles modifications dans les allocations d'énergie	/	/
	Lien possible avec des marqueurs à d'autre niveau d'organisation biologique	Indication sur le mode d'action de l'eau usée domestique		

Ainsi, s'il semble acquis que la compréhension des réponses physiologiques représente une composante très importante de l'explication du comportement des organismes et des

interactions avec leur environnement, on retrouve souvent la thématique du “chaînon manquant” entre la physiologie et l’écologie (Karasov and del Rio, 2020). Dans le cas de notre deuxième chapitre, nous pouvons conclure à des réponses assez aiguës à court terme face à l’exposition à l’eau usée. La simplification consistant à étudier la possibilité d’utiliser le principal contaminant présent dans l’eau usée comme proxy a montré que celui-ci n’était pas satisfaisant car il ne prend pas en compte la consommation bactérienne importante dans l’eau usée. Nous avons ainsi pu vérifier que l’ammonium engendre à lui seul une hausse de l’activité et un comportement pouvant s’apparenter à celui d’une fuite, sans pour autant générer une émergence ni une augmentation de la consommation d’O₂. Les réponses des crabes face à l’eau usée sont plus aiguës, notamment du fait du caractère hypoxique de l’eau usée, et sans doute à cause d’effets combinés entre les différents contaminants, que nous n’avons pas pu investiguer. L’expérimentation comportementale a également engendré une réponse d’émergence chez les crabes exposés à l’eau usée alors que dans les autres conditions, nous n’avons observé aucune préférence entre le milieu aérien et aquatique. Pouvons-nous, pour autant, affirmer que cela se produit aussi dans le milieu naturel ? Notre expérimentation ne prend pas en compte les paramètres biotiques et abiotiques pouvant jouer sur les réponses comportementales : qu’en est-il du risque de prédation, de l’heure de la journée et de l’exposition au soleil (risque de dessiccation), des expositions prolongées aux contaminants ?

L’une des critiques faite aux biomarqueurs appliqués à des problématiques environnementales, est que les méthodes extrapolent généralement des réponses dans le mauvais sens : du bas vers le haut (« bottom-up ») au lieu de partir du haut vers le bas (« top-down ») (McCarty et al., 2002), à propos des niveaux d’organisation biologique.

Ainsi, F.E.J Fry proposait de considérer l’écosystème dans son ensemble afin d’en comprendre les propriétés. Il recommande d’étudier les propriétés d’un niveau d’organisation défini, et d’utiliser ces observations pour étudier le niveau d’intégration juste en-dessous. Il ajoute: **“The truth of the matter is that one man’s observations are the next man’s analysis (...). If you take the properties too many steps down you’re being stupid: and you cannot go in the other direction.”** (Kerr, 1976).

Lors de nos travaux, nous nous sommes inspirés des observations réalisées à l’échelle des populations et des communautés par Capdeville (2018) afin de déterminer les espèces et les marqueurs que nous souhaitons intégrer pour étudier les réponses physiologiques des crabes. Notre approche a donc été descendante dans un premier temps (**Figure 29**). Une fois nos protocoles calibrés au regard de ces données écologiques, nous avons ensuite étudié des niveaux d’intégration allant du comportement aux activités enzymatiques. Les réponses obtenues chez les crabes exposés à l’eau usée et à l’ammonium nous ont par la suite donné la possibilité de mieux comprendre les niveaux d’intégration supérieurs selon un raisonnement « bottom-up » incontournable dès lors qu’on adopte une démarche

mécanistique, mais qui serait critiquable selon Fry (Kerr, 1976) et McCarty et al. (2002). Dans le **tableau 5**, des pistes sont proposées qui permettraient d'améliorer la cohérence des expérimentations au regard des conditions écologiques rencontrées dans la mangrove de Malamani.

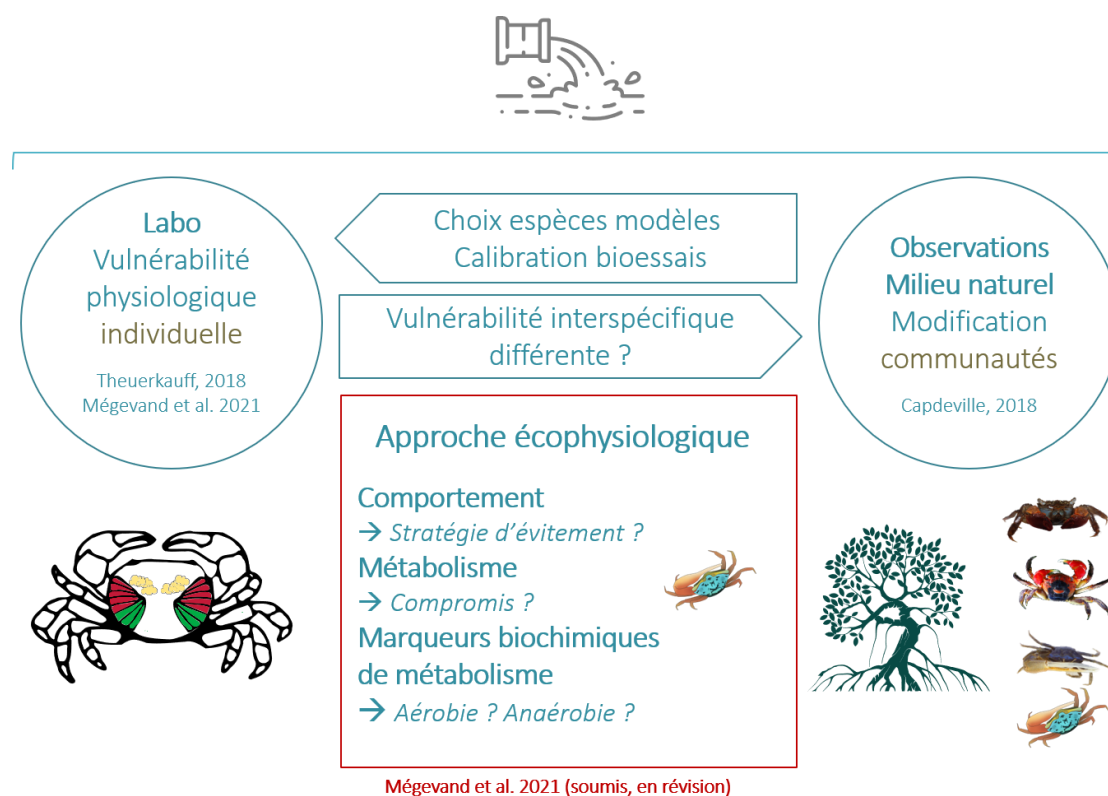


Figure 29. Démarches ayant mené au développement d'une approche écophysiologicalue pour répondre aux objectifs scientifiques du chapitre 2.

2.2 Approche écophysiologicalue pour le suivi de mangroves connaissant des pressions anthropiques opposées

Dans le troisième chapitre de cette thèse, nous avons également étudié les réponses individuelles de crabes de mangrove dans un contexte d'anthropisation, en travaillant cette fois dans **deux mangroves connaissant des pressions anthropiques très différentes**, sur deux espèces proches de **crabes violonistes**, dominantes dans les habitats ouverts des chenaux de marées.

Nous l'avons vu au cours du chapitre 3, l'étude de la vulnérabilité des écosystèmes est devenue une composante importante à prendre en compte dans la gestion des risques environnementaux (Brodie et al., 2018; De Lange et al., 2010; Ippolito et al., 2010). Plusieurs cadres théoriques ont été proposés dans la littérature scientifique afin de combler le fossé existant entre les études écotoxicologiques (principalement en laboratoire) et la complexité des effets d'une pollution générant la qualité (ou l'état de santé) réelle d'une

communauté ou d'un écosystème. Malgré cela, le développement d'outils permettant d'extrapoler les effets de substances toxiques sur des organismes face à des scénarios observés en milieu naturel est principalement réalisé en laboratoire. Par conséquent l'évaluation des risques extrapolée à l'échelle des écosystèmes est souvent dérivée de réponses biologiques qui témoignent de dommages physiologiques mesurés à l'échelle de l'espèce (Medina et al., 2007).

La rareté des écosystèmes encore non impactés par les activités anthropiques les rend essentiels en matière de conservation, mais ils représentent également des sites "témoins" n'ayant connu aucune ou peu d'altération. Dans le troisième chapitre, notre approche écophysiological diffère de celle adoptée lors du second chapitre. Nous ne sommes pas partis d'observations réalisées dans le milieu naturel et au laboratoire pour essayer de nous focaliser sur des réponses qui pourraient potentiellement être écologiquement cohérentes. Nous avons cherché à **étudier des écosystèmes de mangrove qui connaissent des pressions anthropiques opposées à travers la description des réponses physiologiques de deux espèces de crabes dominantes sur chaque site. La vulnérabilité physiologique différente des deux espèces face à la simulation *in vitro* d'un impact anthropique contribuerait à expliquer leur dominance dans le milieu naturel** (Figure 30).

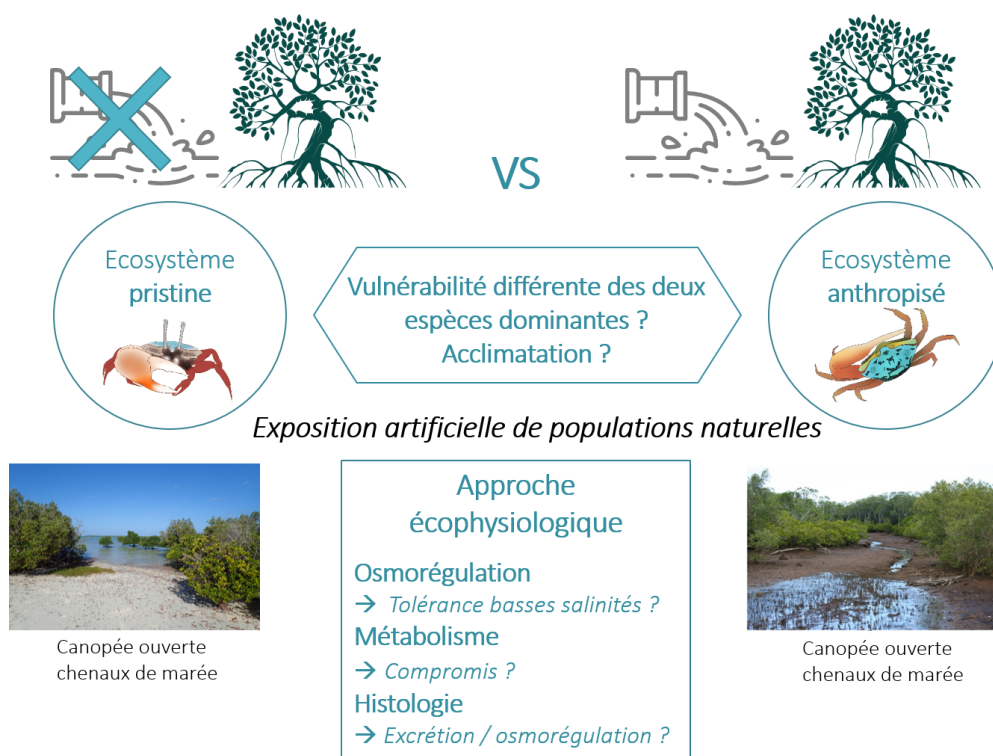


Figure 30. Démarches ayant mené au développement d'une approche écophysiological pour répondre aux objectifs scientifiques du chapitre 3

Comme discuté dans le chapitre 3, la tolérance aux variations de salinité et à la présence d'ammonium est très souvent liée à l'habitat des espèces (Lin et al., 2002; Weihrauch et al., 1999). De très nombreuses études de physiologie comparative se sont penchées sur ces questions de tolérance (salinité, contaminants) chez les crustacés, avec des objectifs et des comparaisons différentes. On trouve, par exemple, des études s'intéressant aux mécanismes d'osmorégulation chez les crustacés décapodes selon différents stades de vie (Anger and Charmantier, 2000; Charmantier et al., 2009), avec des expositions à des salinités différentes testées sur une seule espèce sans lien étroit avec des conditions environnementales particulières. On retrouve également des études sur la capacité osmorégulatrice de deux espèces d'un même genre, exposées à des variations de salinité et de température mises en lien avec les variations environnementales saisonnières (Dehnel, 1962).

Depuis les années 2000, il semble que de plus en plus d'études aient utilisé les paramètres physiologiques de crustacés comme marqueurs de stress potentiels provenant de milieux naturels anthropisés. En effet, les études portant sur les impacts anthropiques sur les écosystèmes étaient, il y a vingt ans, généralement reliées à la manière dont la perte d'espèces sensibles affecte les taux de transformation de matière et les propriétés fonctionnelles d'un écosystème (voir Kinzig et al. (2013) et Middleton and Grace (2004) pour des reviews). Selon la **théorie de la redondance fonctionnelle** (Yachi and Loreau, 1999), les communautés composées de groupes fonctionnels comportant de nombreuses espèces rendront le fonctionnement écosystémique plus résistant à la perte d'espèces, car **les espèces les plus tolérantes pourront compenser la disparition de celles n'ayant pas toléré le stress**. Ainsi, les espèces sont étudiées comme des proxys d'entités fonctionnelles dans le cadre de l'évaluation des impacts sur les écosystèmes et leurs propriétés fonctionnelles sont directement liées à leur nombre et à leur abondance (Hooper and Vitousek, 1997; Mikola et al., 1998). Cependant, il a été de plus en plus démontré que les mécanismes par lesquels la diversité peut influencer le fonctionnement des écosystèmes sont **liés aux attributs fonctionnels des espèces plutôt qu'à la richesse spécifique** elle-même (Medina et al., 2007). Ainsi, il a été suggéré par la suite que la **diversité des traits** (par exemple physiologiques, morphologiques, comportementaux) devrait recevoir plus d'attention que la diversité des espèces si l'objectif est de comprendre les conséquences fonctionnelles de la perte de biodiversité sur le fonctionnement global de l'écosystème (Giller et al., 2004).

Par exemple, dans notre domaine d'étude, les mécanismes d'osmorégulation sont peu à peu devenus des marqueurs d'acclimatation (voire d'adaptation) à des conditions environnementales changeantes (Lignot et al., 2000), et la **physiologie comparative** a permis de mieux comprendre quels mécanismes permettraient à certaines espèces de survivre plus favorablement en cas de changements environnementaux (température, pollution, salinité, etc.). Le **tableau 6** propose quelques exemples d'études où des

paramètres physiologiques ont été mesurés sur une ou plusieurs espèces choisies généralement pour leur importance (espèce ingénier et / ou espèce dominante), dans des estuaires ou des mangroves connaissant un ou plusieurs degrés d’anthropisation différents. Par exemple, Vianna et al. (2020) ont étudié les effets physiologiques de la hausse des températures sur deux espèces de crabes violonistes habitant la même mangrove mais pas exactement le même habitat. L’une des deux espèces (*Leptuca uruguayensis*) vit sous canopée fermée, sur des sédiments humides tandis que l’autre (*Leptuca leptodactyla*) occupe un étage de mangrove plus haut à canopée ouverte et tolère un habitat plus sec. Les auteurs ont montré que les crabes occupant les aires végétalisées sont plus vulnérables à la hausse des températures que ceux occupant un habitat offrant déjà peu d’abri face à la chaleur et à la dessiccation, parlant ainsi “d’avantage compétitif” quant à la colonisation des habitats de mangroves, voire à la survie, en contexte de changements climatiques. Le troisième chapitre de cette thèse s’inscrit dans ces études de **physiologie comparatives appliquées à des conditions environnementales basées sur des scénarios probables de changements environnementaux**. Ainsi, nous avons pu voir que les crabes de mangrove occupant des habitats plus souvent exposés à des eaux saumâtres, mais également à des concentrations en ammonium plus élevées, s’acclimatent plus facilement à des apports anthropiques. En revanche, les crabes de mangrove qui occupent des milieux salés et non anthropisés, auront plus de mal à développer des acclimations leur permettant de faire face à un potentiel apport d’effluents riche en ammonium. Quelles implications en matière d’évaluation des risques environnementaux peuvent découler de ces observations ?

En fonction du degré et de la durée des épisodes de pollution, les **modifications dans les structures des communautés et dans le fonctionnement de l’écosystème** générées par la présence de substances toxiques, peuvent théoriquement résulter de : (i) la **disparition d’espèces** sensibles à cause d’effets toxiques directs, (ii) le **remplacement de ces espèces** par des espèces moins sensibles (compétition), (iii) des **changements dans les réseaux trophiques** résultant d’une prédation/d’un broutage diminué du fait de la disparition d’espèces sensibles (iv) de **l’acclimatation** (adaptations) physiologiques et (v) de la sélection d’une tolérance héritée génétiquement (**adaptation génétique**) (Medina et al., 2007). Nous avons vu que les rejets d’eau usée domestique provoquent des modifications à l’échelle des communautés, parfois contradictoires (Cannicci et al., 2009; Capdeville, 2018; Wear and Tanner, 2007; Wickramasinghe et al., 2009). Nous avons vu que les crabes de mangroves sont étudiés en raison de leurs réponses (ou traits fonctionnels de réponse) face à des changements

Limites rencontrées - Chapitre 3

— Etude de deux espèces différentes (absence ou quasi-absence de *P. chlorophthalmus* malgré la bibliographie)

— Une seule concentration d’ammonium testée car départ prématuré d’Europa

— Etude à l’échelle de l’individu : manque de liens pour parvenir à évaluer la vulnérabilité de l’écosystème

environnementaux et en raison de leurs fonctions écologiques (ou traits fonctionnels d'effets), notamment la bioturbation (Brodie et al., 2018; Hooper et al., 2005). Il est envisageable d'imaginer qu'un changement environnemental lié à une pollution anthropique sur une mangrove pristine telle que celle d'Europa provoquera des réponses à l'échelle des communautés telles que celles venant d'être énumérées. De nombreux autres marqueurs pourraient être mis en place afin d'approfondir les effets observés, par exemple au niveau des relations trophiques et des modifications de la diversité et de l'abondance, comme l'ont fait Capdeville et al. (2018) dans la mangrove de Malamani. Pour le moment, une concentration environnementale d'ammonium ne semble pas provoquer d'acclimatation physiologique chez les crabes d'Europa, contrairement à ceux de Mayotte. Se pourrait-il alors qu'en cas de pollution, on assiste plutôt à une disparition de certaines espèces plus sensibles qui seraient remplacées par d'autres espèces tolérantes ? Quelles seraient les conséquences en termes de fonctionnement de l'écosystème dès lors qu'on sait que toutes les espèces de crabe n'ont pas le même rôle fonctionnel dans la mangrove ? Les acclimations rapidement mises en place chez les crabes connaissant un environnement régulièrement pollué pourraient-elles découler d'adaptations aux conditions environnementales ?

Tableau 6. Exemple d'études ayant utilisé des réponses (éco)physiologiques dans la comparaison d'espèces et/ou de sites différents. Sont surlignés en gras les marqueurs et les objectifs pouvant rejoindre ceux étudiés au cours de la thèse.

Genre	Espèce	Stade	Site	Stress	Temps	Marqueurs	Comparaison	Objectifs	Réf.
<i>Hemigrapsus</i>	<i>oregonensis nudus</i>	Adulte	Estuaire	<ul style="list-style-type: none"> Salinité 2 → 50 ppt (8 salinités) Température : 5 → 25 °C (5 T°C) 	48h max	Osmorégulation	Salinité et température par espèce	<ul style="list-style-type: none"> Acquisition de connaissances sur la physiologie d'espèces estuariennes. Lien avec les variations saisonnières du milieu naturel (été/hiver) 	Dehnel (1962)
<i>Sesarma</i>	<i>curacaoense</i>	Ecllosion Adulte	Mangrove	<ul style="list-style-type: none"> Salinité 15 → 32 ppt (5 salinités) 	48h max	Mortalité Développement (jours) Osmorégulation	Salinité	Ontogénie de l'osmorégulation	Anger et Charmantier, (2000)
<i>Neosarmatium</i>	<i>meinerti smithii</i>			<ul style="list-style-type: none"> Salinité 16 → 65 ppt (4 salinités) 		Budget énergétique : nourriture consommée - (conso. O ₂ + excrétion amm.) Osmorégulation	Salinité X espèce	Compréhension des effets à long terme des variations de salinité (mangrove) sur la bioénergétique de deux des espèces de crabes	Gillikin et al. (2004)
<i>Ucides Callinectes</i>	<i>cordatus danae</i>	Adulte	Mangrove polluée (métaux lourds) / Non polluée	<ul style="list-style-type: none"> Salinité 9 → 32ppt (4 salinités) 	24, 48, 72h	Concentration métaux tissus Capacité osmo- et iono-régulatrice NKA Consommation O ₂ (air et eau) Efflux ammonium (dans l'eau)	Salinité X Site (par espèce)	Comparaisons des réponses physiologiques de 2 espèces dominantes de crabes prélevées en mangrove polluée et non polluée	Harris et Santos (2000)
<i>Ucides</i>	<i>cordatus</i>	Adulte	Estuaire pollué / estuaire non pollué	Pas d'exposition	/	Transport Cd intracell. (branchies, hépatopancréas) Acides gras (%) Omega 3	Site Acclimatation?	Mécanismes physiologiques permettant aux crabes de mangrove de survivre dans des milieux stressants (pollué/non pollué)	Ortega et al. (2017)
<i>Leptuca</i>	<i>uruguayensis leptodactyla</i>	Adulte	Mangrove canopée ouverte/ canopée fermée	Température 27 → 33 °C (3 T°C)	2 semaines	Consommation O ₂ Excrétion de l'ammonium Indice hépatosomatique Taux d'alimentation Entrée dans les terriers	Température X espèce	<ul style="list-style-type: none"> Effets de la température sur la physiologie et le comportement de 2 espèces de crabes de mangrove. Prédictions d'espèces mieux adaptées aux changements globaux 	Vianna et al. (2020)

2.3 Processus écophysologiques à court et long terme : plasticité phénotypique et adaptation

L'homéostasie des organismes est maintenue tout au long de la vie de l'individu à travers des ajustements phénotypiques pouvant s'exprimer à travers une suite de réponses allant des ajustements physiologiques (Teets and Denlinger, 2013) aux changements dans la phénologie et des aires de répartition (Briscoe et al., 2012; Chuine, 2010; Renault et al., 2018). A court terme, des changements génétiques rapides ou des processus évolutifs à petite échelle, associés à une augmentation de la tolérance (génétiquement héritée), pourraient être déclenchés par des substances toxiques libérées dans l'environnement (Medina et al., 2007). Ce processus, que l'on peut nommer **micro-évolution** due à la pollution, peut se produire en quelques années ou après quelques générations au lieu de siècles ou de millénaires (Klerks and Levinton, 1989; Theodorakis et al., 1997). Ces micro-évolutions pourraient potentiellement influencer les réponses des populations face à des changements environnementaux, générant **des modifications de leurs traits fonctionnels** (les fonctions écologiques comme la bioturbation par exemple) en modifiant la manière dont les espèces exploitent leurs niches écologiques et participent de manière globale au fonctionnement de l'écosystème. Par exemple, il a été prouvé que des crabes violonistes (*Uca inversa* et *Uca annulipes*) exposés à différentes concentrations d'eau usée en mésocosme allouaient moins de temps à l'alimentation. Ces crabes se nourrissant principalement de biofilm (micro-algues et bactéries en surface des sédiments), une partie de leur activité bioturbatrice est assurée lorsqu'ils retournent les sédiments à la recherche de nourriture. L'apport d'eau usée augmentant la teneur en bactéries et en micro-algues dans les sédiments, les crabes passeraient donc moins de temps à se nourrir, et donc à retourner les sédiments, puisqu'ils atteindraient le seuil de leurs besoins nutritifs plus tôt (Bartolini et al., 2011; Penha-Lopes et al., 2009). Est-il possible que ces modifications comportementales ayant un impact sur l'allocation de temps et de réserves des individus, s'apparentent sur un plus long terme à des micro-évolutions générant potentiellement des impacts sur le fonctionnement des écosystèmes de mangrove ? Pour le moment, des études portant sur les effets des caractéristiques environnementales façonnant la structure génétique et la diversité manquent encore (Kasumovic, 2013; Renault et al., 2018), mais elles offrent des perspectives très intéressantes. Si les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3 nous permettent de comprendre des effets de l'eau usée ou de l'ammonium sur la physiologie des crabes de mangrove sur des temps relativement courts, nous ne pouvons que supposer les impacts potentiels d'une exposition progressive à long terme (Malamani) ou celle d'une exposition soudaine (Europa).

Ainsi, les réponses évolutives sont importantes en écophysologie et en écotoxicologie parce que les acteurs de ces disciplines s'intéressent de plus en plus aux phénomènes à long terme sur les populations, alors que la grande majorité des études étaient jusqu'alors basées

sur des tests à court terme (Kimberly and Salice, 2015). Chaque modification de l'environnement d'une espèce (de manière très générale), comme par exemple les modifications liées aux changements globaux ou à des contaminants environnementaux, est une cause potentielle de réponses nouvelles ou intensifiées selon différentes échelles temporelles pouvant être de l'ordre d'une acclimatation ou d'une adaptation physiologique. **En fonction de l'intensité, de la prédictibilité et de la récurrence du stress, les réponses peuvent aller de l'évitement (comportement), en passant par l'acclimatation (plasticité phénotypique) aux adaptations à travers des changements génétiques** (Davis et al., 2005; Holt, 1990; Kimberly and Salice, 2015; Klerks and Weis, 1987).

Au cours de cette thèse, nous avons pu voir qu'une exposition à court terme (6h) à l'eau usée engendre des réponses comportementales d'évitement :

- Augmentation de la distance parcourue et de l'agitation chez *P. chlorophthalmus*
- Comportement d'émersion après 6h d'exposition à l'eau usée chez *P. chlorophthalmus*

Nous avons également pu observer des réponses physiologiques à différents niveaux d'intégration :

- Augmentation de la vacuolisation des B-cells (digestion intracellulaire) chez *N. africanum*
- Augmentation conséquente du taux métabolique de *P. chlorophthalmus* (aussi observé chez *N. africanum* par Theuerkauff et al. (2018))

En ce qui concerne les réponses face à l'exposition à l'eau de mer diluée (5 ppt) et à l'ammonium pendant 96h, nous avons pu observer des réponses physiologiques :

- Augmentation du taux métabolique pour *G. tetragonon* provenant d'un écosystème pristine
- Réduction de la capacité osmorégulatrice pour *G. tetragonon* (Europa)
- Augmentation de l'épaisseur de l'épithélium branchial chez *P. chlorophthalmus* (Mayotte)

Certaines réponses physiologiques peuvent être apparentées dans certains cas à des acclimations (vacuolisation chez *N. africanum*, augmentation de l'épithélium branchial chez *P. chlorophthalmus* par exemple). L'augmentation du taux métabolique chez les trois espèces pourrait également correspondre à une acclimatation permettant le maintien des fonctions vitales et d'assurer les compromis mis en œuvre à des niveaux d'intégration plus faibles. Cependant, cette augmentation très forte dans l'eau usée pourrait ne pas être viable lors d'expositions plus longues. De la même façon les réponses d'évitement observées pourraient conduire les crabes à s'installer dans des habitats moins favorables (ressources,

compétition), où ils feraient potentiellement face à des **pièges évolutifs**¹⁶ (Schlaepfer et al., 2002). De la même manière, dans le cadre des résultats des chapitres 2 et 3, nous ne pouvons pas savoir si l'acclimatation des crabes de Mayotte aux apports d'eau douce, d'ammonium et d'eaux usées provient de cette plasticité phénotypique, ou pourrait découler d'adaptations génétiques sur le plus long terme dans un environnement régulièrement soumis à des effluents d'origine anthropique. Une perspective serait de maîtriser le cycle de vie des deux espèces, notamment la phase pélagique, et d'étudier plusieurs générations au niveau de ces crabes, ce qui est pour l'instant difficile au vu de nos moyens. Une autre alternative serait de développer des marqueurs en transcriptomique notamment au niveau du polymorphisme nucléotidique (analyse de SNPs), de la structure de certaines molécules clefs, etc.

En se replaçant dans un contexte d'**évaluation des risques environnementaux**, plusieurs auteurs ont pointé du doigt la nécessité d'intégrer les impacts des pollutions sur le long terme à des niveaux d'organisation biologiques différents (en plus des cadres théoriques que nous avons étudiés jusqu'à présent). Ainsi, on a pu observer un intérêt croissant pour les **études transgénérationnelles** concernant l'impact de contaminants sur les traits d'histoire de vie de différentes espèces (Barata et al., 2004; deFur, 2004; Hutchinson, 2007; Kramer et al., 2011; Prud'homme et al., 2017), en utilisant des marqueurs (pouvant être physiologiques) sur le cycle de vie complet des organismes. En outre, l'évaluation de l'impact transgénérationnel des polluants et la question de l'exposition multigénérationnelle des populations préoccupent de plus en plus la communauté scientifique, en raison des conséquences écologiques importantes sous-jacentes à ces pollutions et à leur impact sur le long terme.

Certaines études, notamment celle publiée par Untersee and Pechenik (2007), se sont intéressées aux adaptations locales chez deux espèces de gastéropodes (genre *Crepidula*) en testant leur tolérance au cuivre pendant 96h. La capacité d'adaptation d'une espèce aux conditions locales dépend partiellement du flux de gènes entre des populations connaissant différents degrés de pression de sélection (Kawecki and Ebert, 2004). Un brassage génétique important entre deux zones différentes en matière de pression environnementale annulera l'adaptation locale, tandis qu'un flux génétique limité entre ces zones aura tendance à la maintenir. Le rôle que la dispersion peut jouer dans la capacité des invertébrés marins benthiques à s'adapter à des sources localisées de pollution n'a été pris en compte que dans très peu d'études (Rainbow et al., 1999). Les auteurs ont ainsi voulu comprendre si les deux espèces auraient évolué vers une tolérance au cuivre dans un site fortement pollué, et si la capacité d'une tolérance accrue au cuivre aurait pu être limitée chez l'une des

¹⁶ Dans un environnement qui a été soudainement modifié par les activités humaines, un organisme fait un choix comportemental ou d'histoire de vie inadapté basé sur des indices environnementaux autrefois fiables, malgré la disponibilité d'options de meilleure qualité (Schlaepfer et al., 2002)

deux espèces par la dispersion larvaire au cours du développement. Ce type d'étude pourrait se révéler très intéressant dans le cadre du suivi de populations occupant des milieux connaissant des pressions anthropiques différentes, comme c'est le cas dans notre troisième chapitre. Nous pourrions, par exemple, en savoir plus sur les potentielles adaptations développées par *P. chlorophthalmus*, exposé à des apports d'effluents anthropiques depuis de nombreuses générations, en intégrant des données sur la dispersion des différents stades de développement des espèces de crabes étudiées, à Europa et à Mayotte.

Nous avons ainsi pu voir comment notre **démarche écophysiological** peut s'intégrer dans les réflexions concernant les **risques environnementaux** et la **vulnérabilité des écosystèmes** face aux pressions anthropiques. Nous avons proposé des pistes d'amélioration et des perspectives, toujours dans l'idée de renforcer la **cohérence écologique des études expérimentales d'écophysiological et d'écotoxicologie**. Nos résultats nous ont permis de mieux comprendre pourquoi la population de *P. chlorophthalmus* disparaît quasiment totalement de la zone impactée de Malamani, en étudiant des **réponses à très court terme**. Ces temps d'exposition mériteraient de plus d'être prolongés sur plusieurs semaines. Nous avons également pu envisager une **vulnérabilité différentielle** de populations de crabes présents dans des mangroves connaissant des pressions anthropiques totalement opposées et les implications en matière de **risques environnementaux** que cela pourrait engendrer en soulevant des questions **d'acclimatation et de micro-évolution**. Il reste que ces études, comme de nombreuses autres dans ce domaine, sont centrées sur les **réponses d'une seule espèce** et qu'elles n'ont pas forcément de portée appliquée pour le suivi de l'état de santé des écosystèmes. Quels sont les enjeux en matière de **suivi des écosystèmes de mangroves** et comment des **marqueurs opérationnels** pourraient être mis en place à partir des études réalisées en laboratoire ?

3. Vers une potentielle mise en application : du biomarqueur à la bioindication opérationnelle

3.1 Des biomarqueurs applicables aux programmes de gestions des écosystèmes ?

Les biomarqueurs de dommages et de défense, nous l'avons vu, sont extrêmement utiles pour comprendre les mécanismes d'action de certains stress chimiques sur les organismes. Pour cette raison, certains biomarqueurs sont préconisés depuis plusieurs années dans le **suivi réglementaire des écosystèmes marins** dans le cadre, par exemple, de la

convention d'OSPAR¹⁷ et ses programmes de suivi (JAMP ou CEMP). Ces recommandations émanent de groupes d'experts, en particulier ceux formés par le CIEM (Conseil International pour l'Exploration de la Mer¹⁸). En 2012, un rapport coopératif a proposé la mise en place de biomarqueurs afin de suivre les effets des contaminants dans les écosystèmes marins au sein d'une démarche intégrative. Ce document mettait d'ailleurs en avant l'importance de mieux appréhender et définir la notion d'état de santé des écosystèmes, en insistant sur la nécessité de développer des indicateurs pour les composantes de ces écosystèmes (Davies and Vethaak, 2012). En parallèle du développement de ces biomarqueurs opérationnels, ces programmes ont également mis en avant la nécessité d'encadrer les programmes de biosurveillance par des programmes d'assurance qualité et par des exercices d'intercalibration permettant d'assurer la validité des résultats recueillis (Sanchez et al., 2014). L'implémentation du suivi des effets biologiques sur les organismes proposé dans ces grandes directives est récente et encore en développement (Brack et al., 2017; Davies and Vethaak, 2012; ICES, 2021), mais témoigne bien de la **prise en compte des réponses individuelles, notamment physiologiques, dans la caractérisation de l'état de santé des écosystèmes au sein de programmes de suivis**. A ce stade, et au vu des éléments discutés au cours de cette thèse, on comprend que l'un des problèmes majeurs de l'utilisation de ces biomarqueurs proviendra de **facteurs confondants**, notamment l'influence de facteurs biotiques (maturité sexuelle, statut alimentaire, traits d'histoire de vie...) et abiotiques (saison, température, pH...) sur les réponses des organismes au sein de programmes comparants des données sur les milieux aquatiques à large échelle.

Les biomarqueurs de défense et de dommage recommandés par le CIEM dans le cadre de la surveillance et de l'évaluation intégrée des contaminants sont des biomarqueurs utilisés de longue date en écotoxicologie et bien maîtrisés (synthétisés dans le **tableau 7**). On peut distinguer les "core biomarkers", œuvrant à des niveaux d'organisation relativement bas, des biomarqueurs écologiques (Amiard-Triquet and Berthet, 2015).

¹⁷ La Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est ou Convention OSPAR définit les modalités de la coopération internationale pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du nord-est. Elle est entrée en vigueur le 25 mars 1998, et remplace les Conventions d'Oslo et de Paris.

¹⁸ Ce conseil (ICES en anglais) a été formé en 1885 à Copenhague et représente l'un des premiers organismes scientifiques internationaux formellement constitué, au départ œuvrant sur des thématiques industrielles et halieutiques.

Tableau 7. Biomarqueurs de défense et de dommages recommandés dans les cadres d'étude du suivi et de l'évaluation des contaminants proposés par l'ICES. Modifié d'après Amiard-Triquet and Berthet (2015) ; Davies and Vethaak (2012).

Matrice		Assurance qualité
Biomarqueurs de défense		
Activité du Cytochrome P450 1A	Foie de poisson	BEQUALM, MEDPOL
Métallothionéine	Poisson	BEQUALM
	Moule	MEDPOL
Biomarqueurs de dommage		
Acétylcholinestérase	Poisson - Invertébrés	projet BEEP
Stabilité lysosomale	Moules	MEDPOL
Test des comètes	Poisson - Invertébrés	WGBEC
Formation de micronoyau	Poisson	MEDPOL
Adduits à l'ADN	Poisson - Invertébrés	BEQUALM
Vitellogénine (transcripteurs d'ARN messagers ou protéines)	Plasma poisson (mâles)	WGBEC
Maladies visibles de l'extérieur	Poisson	BEQUALM
Histopathologie du foie	Poisson	BEQUALM
Tumeurs macroscopiques du foie	Poisson	BEQUALM
Histopathologie (gamétohénes)	Moules	Indisponible
Intersexuation et Imposex	Gastéropodes	QUASIMEME
Stress on stress	Bivalves	Pas nécessaire
Taux de croissance	Bivalves	IOC
Succès reproducteur	Poisson (lycodes)	BEQUALM

La littérature scientifique a proposé de nombreux autres biomarqueurs pouvant être utilisés dans les programmes réglementaires de suivi des écosystèmes aquatiques, et l'on retrouve parmi eux certains ayant été développés au cours de la thèse : CAT, SOD, GST, autres marqueurs histopathologiques, métabolisme énergétique et réponses comportementales (voir Amiard-Triquet and Berthet (2015) pour une synthèse des marqueurs proposés et Bae and Park (2014) pour une synthèse du suivi des écosystèmes et organismes aquatiques à travers l'étude des réponses comportementales à différentes échelles).

Ces biomarqueurs sont appliqués à des espèces choisies, souvent regroupées sous les termes d'**espèces sentinelles**, afin de constituer des méthodes de suivi des écosystèmes permettant de détecter, nous l'avons vu, des changements précoces et/ou sur le long terme. Pour les scientifiques comme pour les gestionnaires, la raison principale de l'étude d'espèces sentinelles (et bioindicatrices) est la réduction du coût, du temps et de l'effort en comparaison à l'étude de l'ensemble des compartiments et du biote d'une région perturbée par des activités anthropiques (Carignan and Villard, 2002; Cortes et al., 2013; Gül and

Griffen, 2019; Spellerberg, 2005). D'après une étude concernant les justifications et les méthodologies utilisées par les scientifiques et les gestionnaires dans le choix des espèces bioindicatrices, les **invertébrés représentent le taxon le plus fréquent**, et les études mono-spécifiques sont les plus représentées depuis les 15 dernières années (Siddig et al., 2016). Si cette tendance est encore à la hausse, il a cependant été démontré que l'étude d'une seule espèce est insuffisante pour refléter la complexité d'un environnement total (Lindenmayer and Likens, 2011), et la grande diversité des espèces étudiées comme indicateurs dans la littérature confirme cette observation. En effet, 40 % des études passées en revue dans l'article de Siddig et al. (2016) justifient leur choix d'espèce en fonction du succès des études précédentes, le reste étant pour des raisons d'abondance, d'impact significatif sur l'écosystème, ou encore parce qu'il s'agit d'espèces menacées ou emblématiques, quand des justifications sont fournies (ce qui n'est pas le cas dans presque 20 % des cas).

Dans le cadre de cette thèse, qui est le prolongement de travaux de recherche en écophysiologie et en écotoxicologie sur les crabes de mangrove, nous pouvons nous demander si ces modèles biologiques pourraient être étudiés en tant qu'indicateurs de l'état de santé des mangroves (quelle(s) espèce(s) ?). Nous présentons dans la sous-partie suivante un cadre d'étude très concret, celui du déploiement de la **Directive Cadre sur l'Eau** dans les mangroves françaises.

3.2 Les crabes de mangroves : des espèces bioindicatrices ?

La mise en place d'indicateurs biologiques (et de biomarqueurs sur des espèces sentinelles) est de plus en plus préconisée dans le cadre du déploiement de la directive cadre sur l'eau (DCE) et de la directive cadre stratégie pour le milieu marin (DCSSM) afin de contribuer au suivi des écosystèmes aquatiques et à l'évaluation des pressions et des risques. La directive européenne dite directive cadre sur l'eau (DCE), adoptée en 2000 par le parlement européen (2000/60/CE), impose aux États membres de mesurer l'état écologique de leurs masses d'eau superficielles, dans une perspective de développement durable des activités anthropiques. La DCE s'assortit d'une obligation de moyens de préservation de ces écosystèmes, et d'une obligation de résultat, avec l'objectif initial d'atteindre un bon état écologique pour l'ensemble des masses d'eau en 2015¹⁹. La mesure de l'état écologique remplit donc un double objectif de diagnostic de l'état écologique et de suivi des moyens mis en œuvre pour son amélioration éventuelle. Cette mesure s'appuie sur des **indicateurs**

¹⁹ Cet état écologique est défini comme « l'expression de la qualité de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques associés aux eaux de surface » (Circulaire DCE 2005/12 n°14 du 28 juillet 2005), et couvre ainsi la globalité des milieux aquatiques, de chacun de leurs éléments, et des interactions entre eux. Ce bon état écologique est défini par rapport à un état de référence peu ou pas impacté par les activités anthropiques.

biologiques ou chimiques sensibles aux perturbations anthropiques. En France, la DCE a été transposée par la loi de 2004 (Loi n° 2004-338 du 21 avril 2004) qui oriente l'ensemble de la politique de gestion de l'eau, du niveau national au niveau local, vers un objectif de **préservation et de restauration des écosystèmes aquatiques et des services écosystémiques associés**, qualitativement et quantitativement.

Dans les **départements d'outremer**, l'application de la DCE doit prendre en compte une complexité supplémentaire, avec des milieux très spécifiques présentant une faune et une flore plus diversifiées, parfois endémiques, souvent encore peu étudiées, et des conditions climatiques, géologiques et sociétales particulières. De plus, des carences en spécialistes, en particulier en taxonomistes, et les difficultés matérielles dues à l'éloignement géographique contribuent à ralentir le déploiement de la DCE. Il est également plus **difficile de déterminer des états de référence** sur des territoires insulaires limités. Ainsi pour Mayotte, le déploiement de la DCE est débuté depuis peu, avec une première évaluation des masses d'eaux côtières en 2010 (Turquet *et al.*, 2010). Parmi les masses d'eau concernées spécifiques aux DOM, les mangroves constituent un élément particulièrement important. Un groupe de travail "mangrove" a été créé en 2015 sous l'impulsion de l'OFB²⁰, composé d'une équipe transdisciplinaire (MNHN, CNRS, IRD, Université d'Aix Marseille, Université de Toulouse, Conservatoire du littoral, Université de Nantes, BRGM et Université des Antilles) afin d'évaluer la faisabilité d'un indicateur « mangrove ». Dans les premiers rapports du projet, Dirberg, et al. (2015) évoquent qu'un indicateur écologique des mangroves devrait répondre à plusieurs conditions :

- Permettre de détecter tôt les perturbations ;
- Avoir une mise en œuvre relativement simple ;
- Être interprétable par rapport à des conditions de référence ;
- Être relié à une pression ou un stress particulier ;
- Réagir à une diminution des pressions ;
- Permettre de rendre compte de l'efficacité de mesures de gestion mises en place, le cas échéant, pour restaurer le bon état ;
- Permettre la prise en compte des différents niveaux de complexité biologique et d'échelle spatiale.

Ces conditions ont soulevé la nécessité de choisir non pas un mais plusieurs indicateurs et variables complémentaires (Grandcourt, 2018). Les personnes impliquées dans le groupe de travail ont également relevé le caractère ponctuel, limité dans le temps et l'espace, focalisé sur un seul polluant, une seule espèce ou un seul compartiment de la mangrove, ou des conditions très contrastées (pristine vs impacté) des études d'évaluation des impacts anthropiques sur les mangroves (Dirberg et al., 2020). On notera d'ailleurs la prise en

²⁰ Office Français pour la Biodiversité (ex ONEMA et ex AFB)

compte de paramètres physiologiques parmi les différents marqueurs et indicateurs évalués dans les rapports bibliographiques issus des réflexions du groupe de travail.

L'approche retenue se veut intégrative afin de prendre en compte de : 1) la variété des situations entre les territoires d'Outre-mer, des pressions anthropiques, des types de mangrove et de leur biote associé, 2) la complexité de l'appréhension du statut écologique des mangroves (et de n'importe quel autre écosystème comme cela a été présenté dans l'introduction de cette thèse), et 3) les enjeux en matière de gouvernance et d'obligation d'atteinte des objectifs fixés par le cadre réglementaire de la DCE. Des missions de terrain ont été organisées dans les territoires français concernées (Guyane, Mayotte, Martinique et Guadeloupe) afin de déterminer les différents types d'indicateurs qui seraient potentiellement retenus.

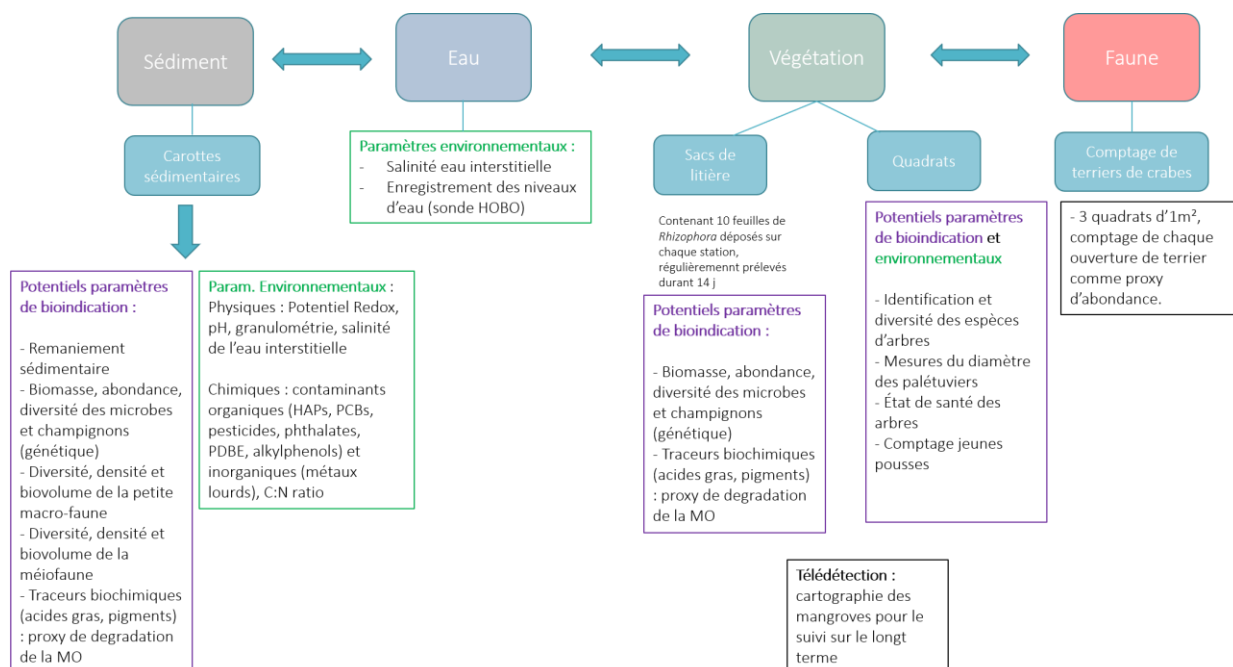


Figure 31 : Représentation schématique des paramètres proposés dans la définition des indicateurs mangrove du groupe de travail DCE (Dirberg et al., 2020).

Parmi les potentiels paramètres de bioindications pris en compte, on trouve le comptage de terriers de crabes (**Figure 31**), seul représentant d'un indicateur pour la faune (en dehors des invertébrés prélevés dans les carottes sédimentaires). Les crustacés décapodes ont souvent été utilisés comme espèces bioindicatrices dans le cas du suivi des écosystèmes côtiers connaissant des pressions de différents types. Les méthodes les plus communément et anciennement mises au point reposent sur des suivis présence/absence, abondance, structure d'âge/taille. Concernant les crabes, **l'abondance des populations est souvent utilisée comme un indicateur** face à des pressions anthropiques telles que l'activité minière, l'urbanisation ou encore la présence de contaminants (Cannicci et al.,

2009; Capdeville, 2018; Jonah et al., 2015; Schlacher et al., 2016; Wildsmith et al., 2009). Ces changements peuvent être mesurés à **travers des comptages *in situ***, souvent difficiles à mettre en œuvre à cause de certaines difficultés concernant les crabes creusant des terriers : biais d'effarouchement (sous-estimation), difficulté de la reconnaissance des espèces et des stades de vie, besoin d'opérateurs "experts" si l'on va au niveau de l'espèce, chronophage pour des comptages précis. D'autres techniques ont été mises en place, par exemple pour le suivi des crabes fantômes sur les plages fréquentées. Les réponses les plus répandues des crabes fantômes aux perturbations humaines sur les rivages sableux sont des **diminutions de l'abondance de la population et de la taille des individus** (Gül and Griffen, 2018; Schlacher et al., 2016). Ces changements sont souvent mesurés à l'aide de **comptages de terriers**, une technique considérée comme non destructive et efficace pour évaluer à la fois l'abondance et la distribution des tailles des crabes fantômes (Schlacher et al., 2016).

Au cours de la thèse, nous avons eu l'opportunité de travailler sur le volet indicateur « crabe » de ce projet, avec l'encadrement d'une stagiaire de Master 2 (Amélie Van Gemert) proposé et financé par le MNHN. Il était ainsi question d'étudier la pertinence et la faisabilité d'un tel indicateur sur des mangroves de Mayotte ciblées par le groupe d'expert DCE : Malamani, Dembeni et Zidakani. Les résultats à l'issue du stage d'Amélie Van Gemert sont en cours de traitement et donneront lieu à une publication scientifique. Les sites étudiés ont été définis par le MNHN selon une typologie *a priori* dans les mangroves de Dembeni (Impacté/Non impacté), Malamani (Impacté/non Impacté) et Zidanaki, considérée comme une mangrove de référence (bien qu'une mangrove non impactée par les activités anthropiques ne semble plus exister sur le territoire Mahorais). Le sujet du stage visait à **évaluer le potentiel de bioindication des crabes dans les mangroves de Mayotte, à travers la création d'un indicateur « terriers » comme proxy de l'abondance**. Nous avons, au cours du stage, essayé de discriminer les paramètres abiotiques pouvant avoir un effet sur la présence ou l'absence des crabes et ainsi mieux comprendre leur répartition et les effets d'une potentielle pollution à travers quatre objectifs :

- Caractérisation physico-chimique du milieu dans les sites étudiés (une mangrove, des mangroves ?)
- Evaluation de l'impact de la pollution sur les densités de crabes dans le faciès à *R. mucronata*
- Caractérisation des facteurs explicatifs de la variabilité des densités de terriers dans ce faciès
- La densité de terriers représente-t-elle un indicateur adéquat pour la DCE ?

Sur cinq stations (Malamani impactée/non impacté ; Dembeni impacté/non impacté ; Zidakani), des comptages de terriers ont été effectués en saison humide et en saison sèche à l'intérieur de quadrats de 10 m par 10 m puis sous-échantillonnés aléatoirement. Au sein de ces quadrats, des carottes sédimentaires ont été prélevées. Des piézomètres artisanaux d'un mètre (tubes en PVC percés de trous et entourés de géotextile) ont été installés dans les sédiments, et les paramètres physico-chimiques de l'eau interstitielle ont été relevés plusieurs fois par saison. Amélie Van Gemert a également réalisé des mesures de production primaire *in situ* (indice d'efficacité d'interception foliaire et estimation de la couverture végétale). Les indices de végétation par différence normalisée (NDVI) ont également été réalisés pour compléter ces données à l'aide d'images satellites Pléiades (2018). Les sédiments ont été analysés en laboratoire : mesure de la salinité et de la concentration en ammonium de l'eau interstitielle retrouvée dans les carottes et granulométrie, analyses granulométriques et teneur en matière organique. Les analyses statistiques ne seront pas détaillées ici puisque certaines sont encore en cours. Nous présentons quelques résultats préliminaires et synthétiques afin d'illustrer la complexité des paramètres pouvant potentiellement influencer la distribution des terriers de crabes (trois classes de taille) (**Figure 32**) : paramètres abiotiques, sites, état (pollué/non pollué), saison.

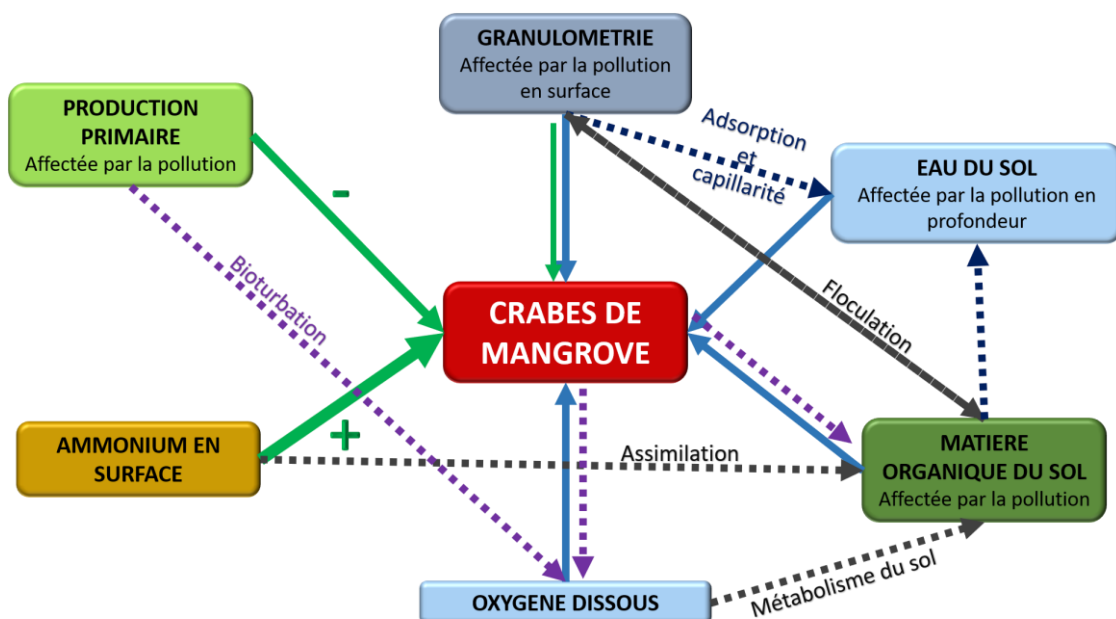


Figure 32. Représentation schématique des interactions entre les communautés de crabes de mangrove et les facteurs abiotiques de leur environnement. En traits pleins, les résultats des analyses : en bleu en saison humide, en vert en saison sèche. En saison sèche, la largeur des flèches est proportionnelle à l'intensité de l'influence de chaque facteur sur la densité moyenne de trous de terriers. Les signes (+/-) désignent le sens de variation de cette influence. Les flèches en pointillés représentent les interactions interprétées dans la première partie de la discussion. En violet la bioturbation (par les terriers et par les racines). En bleu foncé les facteurs qui influencent la rétention d'eau par les sédiments (Amélie Van Gemert, 2019).

En plus de la complexité des interactions intervenant entre les communautés de crabe et les facteurs abiotiques de leur environnement, il est important de noter que les comptages de terriers ont soulevé de nombreuses questions en matière d'extrapolation des informations collectées (**Figure 33**) : (i) les densités de terriers (ouvertures) reflètent-ils des changements dans l'abondance des crabes ? Une diminution de densité pourrait s'apparenter à la disparition de certaines espèces bioturbatrices avec un remplacement possible par certaines espèces ne creusant pas de terriers, avantagées par ce mode de vie (cas de *P. guttatum* à Malamani, voir 1.1 de la discussion) (ii) Si la taille des terriers varie, comment en vérifier la cause ? En effet la taille des terriers peut être liée à la présence de juvéniles et/ou la présence d'espèces de taille différentes. (iii) Si le nombre de terriers diminue, cela signifie-t-il que les communautés connaissent une hausse de leur mortalité ? Quelles espèces seraient concernées ? Cette diminution pourrait également provenir d'une diminution de l'activité bioturbatrice de certaines espèces, impliquant par là même des modifications au niveau du temps alloué aux activités énergétiques suite à des apports nutritifs liés à la pollution (Bartolini et al., 2009; Xiang et al., 2020) et potentiellement de la balance énergétique et d'autres paramètres physiologiques à des niveaux d'organisation différents.

On peut voir que ces différentes questions peuvent trouver des éléments de réponses grâce à des études d'écophysiologie et d'écophysiole telles que celles présentées dans cette thèse. Ceci souligne une fois encore la nécessité d'avoir une approche multi-échelles dès lors qu'on s'intéresse aux impacts des contaminants sur le fonctionnement et la santé des écosystèmes.

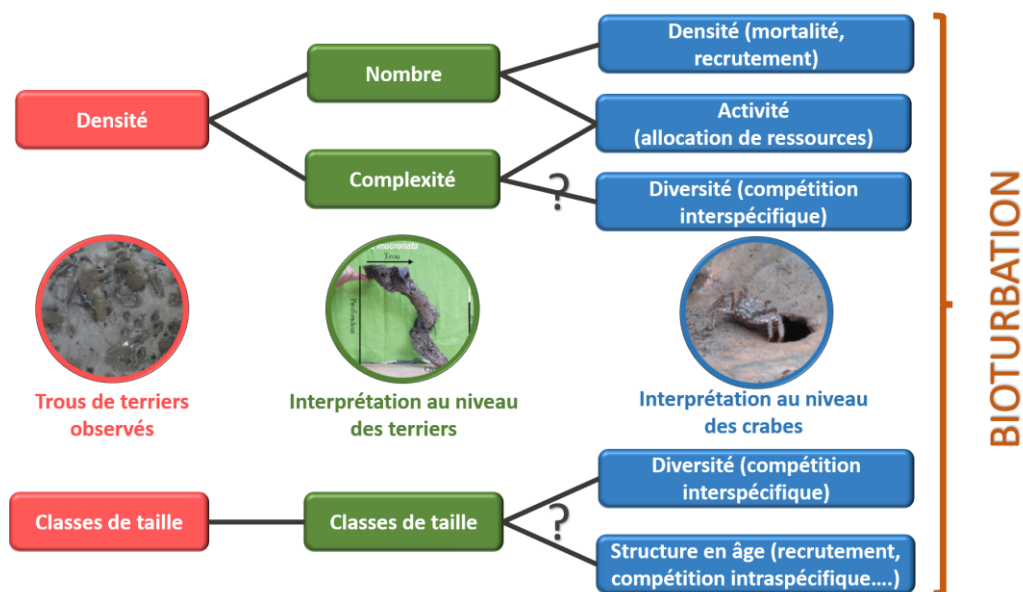


Figure 33. Représentation des problématiques liées à la mise en place d'un indicateur « terrier de crabe » et les différentes extrapolations donnant suite aux comptages et aux analyses. Amélie Van Gemert, 2019 (Mémoire de Master 2).

Les éléments exposés ci-dessus laissent penser que cet indicateur pourrait manquer de fiabilité s'il était mis en place seul. Il semblerait alors intéressant d'intégrer des traits écophysiologiques et/ou comportementaux aux protocoles de suivi des espèces bioindicatrices, comme vu au début de cette partie. Ainsi, certains traits pourraient par exemple permettre une interprétation plus fiable des changements observés *in situ* (approche « top-down »), à travers la mise en place de marqueurs ayant prouvé leur efficacité. Dans notre cas, il pourrait s'agir de marqueurs intégratifs à l'échelle individuelle en lien avec l'osmorégulation, le taux métabolique et le comportement, éventuellement enregistrés *in natura*. En effet, la prise de pression osmotique d'hémolymphe est réalisable sur des crabes dans le milieu naturel : Theuerkauff et al. (2020), ont « encagé » des *N. africanum* dans des terriers artificiels sur les parcelles impactées et non impactées de Malamani durant trois semaines. Au bout de trois semaines, des prélèvements d'hémolymphe ont été effectués et une diminution significative de la pression osmotique chez les crabes occupant les parcelles impactées a été mise en évidence. Des études sont évidemment nécessaires afin de confirmer la pertinence et la faisabilité d'intégrer des traits écophysiologiques et comportementaux à des programmes de recherche appliquée ou plus largement des programmes de suivis des écosystèmes de mangroves. Cependant de plus en plus d'études de bioindication ont commencé à prendre en compte des paramètres autres que l'abondance, la présence/absence ou la structure de taille, à savoir : le comportement et les modifications de temps alloué à chaque activité, ou encore des paramètres physiologiques notamment ceux concernant la balance énergétique (voir Gül and Griffen (2019) pour une review). Ainsi, l'intérêt croissant pour la prise en compte d'autres niveaux d'intégration dans les méthodes de suivi des écosystèmes aquatiques laisse penser à des perspectives telles que celles présentées ici, où les approches écophysiologiques pourraient jouer un rôle important dans la compréhension des liens entre les niveaux d'organisation biologiques étudiés.

Conclusions et perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont contribué à répondre à nos objectifs :

- 1) Nous avons complété les connaissances préexistantes sur les effets de l'exposition à l'eau usée ou à l'ammonium sur la physiologie de *N. africanum*, qui est l'espèce la plus étudiée par certains écophysiologistes du CUFR de Mayotte et de l'UMR MARBEC. Notre apport a permis de considérer un nouvel organe multifonctionnel, l'hépatopancréas, cible potentielle de contaminations issues des eaux usées domestiques mais également d'autres contaminants (métaux, pesticides, etc.) susceptibles d'être présents dans la mangrove. Ainsi, nous disposons d'un socle de **connaissances de la physiologie du stress de cette espèce à plusieurs niveaux d'intégration** : (i) sub-cellulaire et cellulaire au niveau de deux organes clés directement exposés aux contaminations extérieures et potentiellement impliqués dans les mécanismes de détoxification et/ou d'excrétion de contaminants (hépatopancréas et branchies), et (ii) à l'échelle de l'organisme : taux métabolique et capacité osmorégulatrice, révélateurs d'un état physiologique « global ». Ces connaissances nous ont permis de développer différents **biomarqueurs physiologiques** qu'il s'agira de calibrer pour l'étude éventuelle des impacts d'autres pollutions enregistrées dans les mangroves. *N. africanum* est une espèce bioturbatrice que l'on retrouve dans de nombreuses mangroves de Mayotte et plus généralement du canal du Mozambique, ce qui en fait une espèce intéressante à étudier. Les données acquises chez cette espèce de crabe (ou d'autres) pourront être utiles pour de futurs travaux de recherche concernant l'impact des pressions anthropiques sur les écosystèmes de mangroves. Elles pourraient également être utiles à certains gestionnaires visant à développer des outils standardisés de suivi des mangroves (ex : DCE). L'application des biomarqueurs issus de nos travaux pourrait compléter des indicateurs écologiques types « terriers de crabe » mentionnés dans ce manuscrit de thèse (Discussion : 3.2).

- 2) Nous avons développé une approche expérimentale visant à mieux **comprendre le lien existant entre des mécanismes écophysiologiques individuels et des phénomènes enregistrés à l'échelle des communautés**. Pour cela, nous avons développé des analyses sur les **traits métaboliques et comportementaux** d'une espèce de crabe violoniste (*P. chlorophthalmus*) fortement impactée par les apports chroniques d'eau usée dans une mangrove de Mayotte (projet « Malamani »). Ces travaux réalisés en conditions contrôlées en microcosmes n'ont pas la prétention de recréer les conditions du milieu naturel, il était davantage question d'identifier des processus physiologiques contribuant à expliquer une réponse comportementale, également mesurée en conditions contrôlées et pouvant illustrer les observations réalisées en milieu naturel. On sait qu'il existe des processus complexes pouvant expliquer les phénomènes écologiques observés dans les

écosystèmes (ex. : modification des communautés). Les contaminants agissent souvent de façon directe mais aussi indirecte sur les organismes qui seront impactés à terme. Ces effets indirects complexes s'entendent notamment au niveau du réseau trophique en lien avec des relations proie/prédateur et de compétition pour la ressource. Cependant, dans la mesure où nous avons bâti nos protocoles sur la base d'observations réalisées en milieu naturel, avec des marqueurs intégratifs pouvant illustrer des phénomènes enregistrés sur le terrain (choix d'émergence, fuite), nos résultats illustrent, au moins partiellement, les mécanismes qui se produisent *in natura*. Il convient de ne pas faire d'interprétation hâtive mais les résultats obtenus permettent néanmoins d'apporter des éléments de réponse quant à la compréhension globale des processus opérants en mangrove polluée. La littérature scientifique a montré qu'il était possible de se questionner au sujet de la capacité des crabes de mangroves à maintenir leur rôle d'ingénieur de l'écosystème en conditions polluées, et ces questions auraient intérêt à être investiguées sur un ensemble plus large de mangroves anthropisées à Mayotte et ailleurs dans le canal du Mozambique et dans l'Océan Indien.

- 3) Enfin, nous avons étudié la **vulnérabilité écophysio-logique des crabes de mangrove de deux îles connaissant des pressions anthropiques historiquement opposées**, face à une simulation d'anthropisation. Les deux espèces de crabes (Ocypodidae) dominantes dans les habitats de canopée semi-ouverte ont ainsi été étudiées dans les îles d'Europa (pristine) et de Mayotte (anthropisée) dans le Canal du Mozambique. Ainsi, nous avons exposés des crabes prélevés dans les mangroves de ces deux îles, à la fois, à un stress osmotique et à un apport d'ammonium qui simule des rejets hydrologiques issus d'une présence humaine. Ainsi, *Gelasimus tetragonon* (Europa) et *Paraleptuca chlorophthalmus* (Mayotte) ont montré des réponses différentes face à ce double stress et les résultats tendent à indiquer une vulnérabilité, ou en tout cas, une sensibilité à l'«anthropisation» (enrichissement du milieu) plus importante pour l'espèce de crabe dominante de l'habitat étudié sur Europa (*G. tetragonon*). Une fois encore, ces résultats sont à interpréter avec prudence dès lors qu'on tente de réaliser une extrapolation pour des scénarii en milieu naturel. Néanmoins, la comparaison de ces deux espèces dans des environnements éloignés connaissant des forçages anthropiques diamétralement opposés soulève des questions d'ordre évolutif qu'il serait intéressant d'aborder à l'avenir.

Au cours de cette thèse, nous avons donc mis en avant **l'importance de l'écophysio-logie** qui est une discipline permettant : (i) de comprendre les effets de contaminants sur la

physiologie des organismes selon des processus écotoxicologiques complexes, (ii) mieux appréhender des phénomènes enregistrés dans le milieu naturel à des niveaux d'intégration plus importants (population, communauté) en utilisant des marqueurs intégratifs individuels, (iii) contribuer à la prédiction des risques en termes de modification du fonctionnement des écosystèmes basés sur la modification d'activité des espèces ingénieurs selon leur tolérance aux variations de leur environnement.

Ainsi, l'écophysiologie est une discipline souvent basée sur une approche strictement mécanistique permettant de décrire des phénomènes naturels ou d'origines anthropiques exclusifs (ex. tolérance d'une espèce à un stress ou à un paramètre du milieu). Elle peut également être un allié nécessaire à la compréhension de processus écologiques dynamiques avec un caractère parfois prédictif. Cette vision « ambitieuse » de la discipline pourrait se réaliser efficacement à travers le développement de collaborations avec des acteurs de différentes disciplines choisies selon les problématiques investiguées : chimie des contaminants, écologie fonctionnelle et des communautés, écologie évolutive, écotoxicologie.

A l'issue de ce travail de thèse, il est également important de remettre en contexte les travaux réalisés et présenter les perspectives de l'équipe de recherche en écophysiologie et écotoxicologie des crabes de mangrove formée par les écophysiologistes du CUFR et de l'Université de Montpellier (**Figure 34**). Les premiers travaux sur les eaux usées en lien avec la mangrove (bioremédiation) datent de 2008 avec le projet « Malamani » (Introduction : 3.2) et la thèse de Mélanie Herteman sous la responsabilité de François Fromard (ECOLAB). C'est durant les premières années de ce projet que les premières observations de changement des communautés de crabes en réponse à la présence d'eaux usées ont été réalisées. Ainsi, un an après la création du CUFR de Mayotte (2012), les premières études sur l'écotoxicologie des crabes de mangrove ont été initiées dans le cadre du projet « Malamani » par Elliott Sucré (CUFR) et Jehan-Hervé Lignot (Université de Montpellier), tous les deux membres du laboratoire MARBEC. Deux thèses de doctorat ont ensuite débuté en 2015 sur ce même projet, celle de Cécile Capdeville (ECOLAB) et celle de Dimitri Theuerkauff (MARBEC). Les travaux de ce dernier (et des chercheurs, ingénieurs, techniciens et étudiants ayant soutenu ces recherches au fil des années) ont été à l'origine des bases conceptuelles et méthodologiques sur lesquelles nous nous sommes appuyés pour l'ensemble des travaux en écophysiologie qui ont suivi jusqu'alors sur la thématique. Ils sont mentionnés à de nombreuses reprises dans ce manuscrit de thèse et nous les avons complétés (chapitre 1). Cependant, notre travail, qui reprend en partie les outils (biomarqueurs) développés par ces travaux, se distingue par une approche davantage tournée vers la compréhension des processus observés dans le milieu naturel à l'aide de marqueurs nouvellement déployés tels que l'étude du comportement animal, et des comparaisons entre mangroves (projet MANMAC).

Les marqueurs développés chez plusieurs espèces sentinelles de crabes de mangrove depuis 2012 vont désormais être utilisés pour caractériser les impacts d'autres types de pollutions anthropiques, notamment celles engendrées par des pesticides (projet CRABMAYO, que j'intégrerai en tant que post-doctorante en mars 2022). Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons continuer à mobiliser des concepts d'écophysiologie pour contribuer à la compréhension de processus écologiques complexes, en intégrant plusieurs sites d'étude. Nous réalisons actuellement un screening des pesticides présents au sein de trois mangroves exutoires de trois bassins versants connaissant des pressions anthropiques différentes à Mayotte. Nous envisageons d'exposer les crabes de mangrove à des doses environnementales de certains contaminants identifiés et d'ammonium dans des eaux dessalées représentatives des conditions observées dans les mangroves étudiées. Les expositions se feront en microcosme pour le suivi de marqueurs physiologiques, et en mésocosmes pour mesurer des réponses comportementales à long terme (bioturbation). Parallèlement à ce projet, une étude d'impact sur le milieu intertidal de l'île Europa est prévue, concernant la dératisation des mangroves de l'île à l'aide de biocides anti-vitamine K et nous étudierons les crabes de mangrove (entre autres) en tant qu'espèces sentinelles et bioindicatrices.

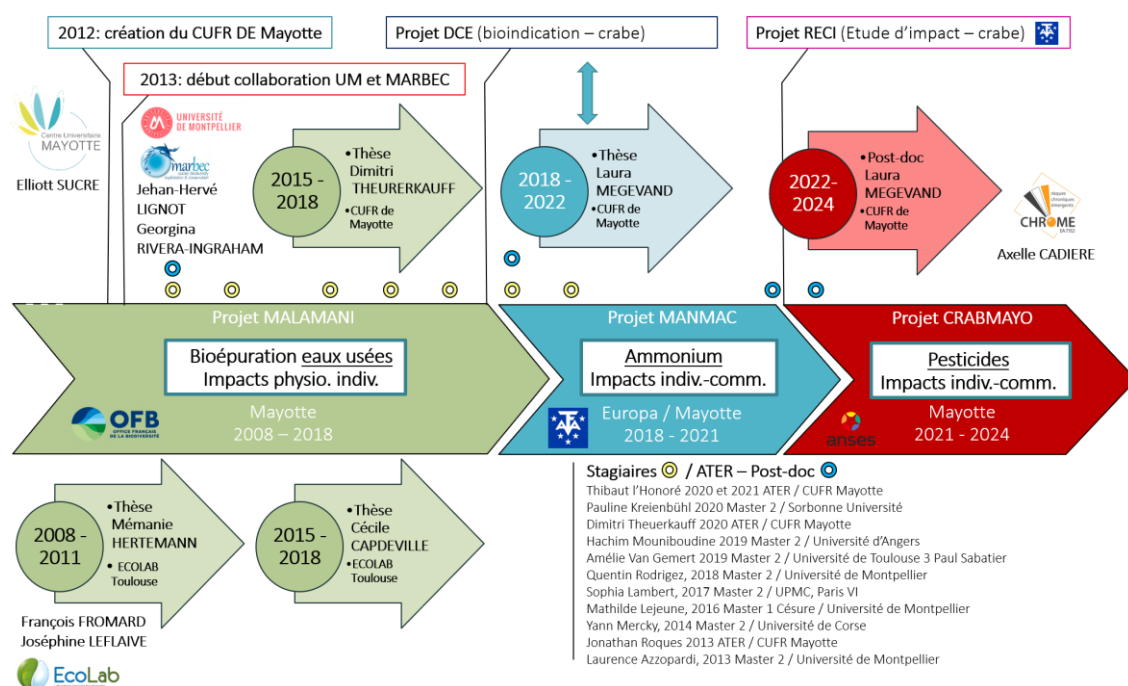


Figure 34. Historique et perspectives des recherches sur les mangroves initiées par ECO LAB, le CUFR de Mayotte et l'Université de Montpellier (MARBEC) depuis 2012, dans laquelle s'intègre la présente thèse. Présentation des étudiants, ATER, post-doctorants, chercheurs ayant participé à l'élaboration des connaissances depuis 2012.

De nombreuses perspectives seraient à évoquer à une échelle plus élargie. Si cette thèse s'est focalisée sur des points et des objectifs bien précis dans un contexte local, il nous apparaît que les thématiques abordées ainsi que les méthodologies utilisées sont liées à différentes questions de recherche qui peuvent s'inscrire dans des réflexions plus globales. Les problématiques de gestion et de conservation, de dynamiques des populations et des communautés ou encore des questions d'évolution potentielle de populations issues d'écosystèmes pristines et anthropisés représentent autant de questions de recherche ayant une importance majeure, où l'écophysiologie peut jouer un rôle à part entière.

Références bibliographiques de l'introduction et de la discussion

- Abuodha, P.A.W., Kairo, J.G., 2001. Human-induced stresses on mangrove swamps along the Kenyan coast. *Hydrobiologia* 458, 255–265. <https://doi.org/10.1023/A:1013130916811>
- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A., Lane, D.J.W., 1985. Mitotic e-and secretory f-cells in the hepatopancreas of the shrimp *penaeus semisulcatus* (crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 65, 901–910. <https://doi.org/10.1017/S0025315400019408>
- Alongi, D.M., 2008. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.024>
- Alongi, D.M., 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environ. Conserv.* 29, 331–349. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000231>
- Amiard-Triquet, C., Berthet, B., 2015. Individual Biomarkers, *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00007-3>
- Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Romeo, M., 2011. Tolerance to environmental contaminants. CRC press.
- Anger, K., Charmantier, G., 2000. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in a mangrove crab, *Sesarma curacaoense* (Decapoda: Grapsidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 251, 265–274. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00223-9)
- Bae, M.J., Park, Y.S., 2014. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review. *Sci. Total Environ.* 466–467, 635–649. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.075>
- Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R., Scott, G.I., 2007. In situ-based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 259–267. https://doi.org/10.1897/IEAM_2006-031.1
- Ball, M., 1998. Mangrove species richness in relation to salinity and waterlogging: a case study along the Adelaide River floodplain, northern Australia. *Glob. Ecol. \& Biogeogr. Lett.* 7, 73–82.
- Bandeira, S.O., Macamo, C.C.F., Kairo, J.G., Amade, F., Jiddawi, N., Paula, J., 2009. Evaluation of mangrove structure and condition in two trans-boundary areas in the Western Indian Ocean. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 19, S46–S55.
- Barata, C., Porte, C., Baird, D.J., 2004. Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates: A review. *Ecotoxicology* 13, 511–517. <https://doi.org/10.1023/B:ECTX.0000037188.09072.de>
- Barbosa, F.M.A., Cuambe, C.C., Bandeira, S.O., 2001. Status and distribution of mangroves in Mozambique. *South African J. Bot.* 67, 393–398.
- Bartholomew, G.A., 2005. Integrative biology, an organismic biologist's point of view, in: *Integrative and Comparative Biology*. pp. 330–332. <https://doi.org/10.1093/icb/45.2.330>
- Bartolini, F., Cimò, F., Fusi, M., Dahdouh-Guebas, F., Lopes, G.P., Cannicci, S., 2011. The effect of sewage discharge on the ecosystem engineering activities of two East African fiddler crab species: Consequences for mangrove ecosystem functioning. *Mar. Environ. Res.* 71, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.10.002>
- Bartolini, F., Penha-Lopes, G., Limbu, S., Paula, J., Cannicci, S., 2009. Behavioural responses of the mangrove fiddler crabs (*Uca annulipes* and *U. inversa*) to urban sewage loadings: Results of a mesocosm approach. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1860–1867. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.07.019>
- Bennett, A.F., 1997. Adaptation and the Evolution of Physiological Characters. *Compr. Physiol.* 3–16. <https://doi.org/10.1002/cphy.cp130101>

- Berti, R., Cannicci, S., Fabbroni, S., Innocenti, G., 2008. Notes on the structure and the use of *Neosarmatium meinerti* and *Cardisoma carnifex* burrows in a kenyan mangrove swamp (decapoda brachyura). *Ethol. Ecol. Evol.* 20, 101–113. <https://doi.org/10.1080/08927014.2008.9522531>
- Blasco, F., Saenger, P., Janodet, E., 1996. Mangroves as indicators of coastal change. *Catena* 27, 167–178. [https://doi.org/10.1016/0341-8162\(96\)00013-6](https://doi.org/10.1016/0341-8162(96)00013-6)
- Block, W., Vannier, G., 1994. What is ecophysiology? Two perspectives. *Acta oecologica* 15, 5–12.
- Borges, F.O., Sampaio, E., Figueiredo, C., Rosa, R., Grilo, T.F., 2018. Hypercapnia-induced disruption of long-distance mate-detection and reduction of energy expenditure in a coastal keystone crustacean. *Physiol. Behav.* 195, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.07.023>
- Bouchard, J.-M., Poupin, J., Cleva, R., Dumas, J., Dinhut, V., 2013. Land, mangrove and freshwater decapod crustaceans of Mayotte region (Crustacea, Decapoda). *Atoll Res. Bull.* 592, 1–69.
- Boudour, N., 2016. Mécanismes osmorégulateurs et adaptation évolutive des crevettes Palaemonidae aux milieux estuariens Nesrine Boudour To cite this version : HAL Id : tel-01361960 Spécialité : Biologie des Organismes.
- Boulet, V., 2014. The vegetation of the island of Europa (channel of Mozambique). 1- salt marshes and steppes. *Doc. phytosociologiques* 1, 501–535.
- Boulet, V., 2008. Typologie détaillée de la végétation et des habitats de l'île d'Europa. Extrait partiel : Systèmes de mangroves lagunaires coralliennes.
- Brack, W., Dulio, V., Ågerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M., Bunke, D., Burgess, R.M., Cousins, I., Escher, B.I., Hernández, F.J., Hewitt, L.M., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Kase, R., Klauer, B., Lindim, C., Herráez, D.L., Miège, C., Munthe, J., O'Toole, S., Posthuma, L., Rüdél, H., Schäfer, R.B., Sengl, M., Smedes, F., van de Meent, D., van den Brink, P.J., van Gils, J., van Wezel, A.P., Vethaak, A.D., Vermeirssen, E., von der Ohe, P.C., Vrana, B., 2017. Towards the review of the European Union Water Framework management of chemical contamination in European surface water resources. *Sci. Total Environ.* 576, 720–737. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.104>
- Bradshaw, D., 2003. Vertebrate ecophysiology: an introduction to its principles and applications. Cambridge University Press.
- Briscoe, N.J., Porter, W.P., Sunnucks, P., Kearney, M.R., 2012. Stage-dependent physiological responses in a butterfly cause non-additive effects on phenology. *Oikos* 121, 1464–1472. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.20049.x>
- Brodie, J.F., Redford, K.H., Doak, D.F., 2018. Ecological Function Analysis: Incorporating Species Roles into Conservation. *Trends Ecol. Evol.* 33, 840–850. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.08.013>
- Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M., West, G.B., 2004. Toward a metabolic theory of ecology, in: *Ecology*. pp. 1771–1789. <https://doi.org/10.1890/03-9000>
- Buckup, L., Dutra, B.K., Ribarcki, F.P., Fernandes, F.A., Noro, C.K., Oliveira, G.T., Vinagre, A.S., 2008. Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 149, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.10.008>
- Bunting, P., Rosenqvist, A., Lucas, R.M., Rebelo, L.M., Hilarides, L., Thomas, N., Hardy, A., Itoh, T., Shimada, M., Finlayson, C.M., 2018. The global mangrove watch - A new 2010 global baseline of mangrove extent. *Remote Sens.* 10, 1669. <https://doi.org/10.3390/rs10101669>

- Burger, J., 2006. Bioindicators: A Review of Their Use in the Environmental Literature 1970–2005. *Environ. Bioindic.* 1, 136–144. <https://doi.org/10.1080/15555270600701540>
- Burggren, W.W., McMahon, B.R., others, 1988. *Biology of the land crabs*. Cambridge University Press.
- Caceres, S., 2003. Etude préalable pour le classement en Réserve Naturelle des Iles Eparses 195.
- Cairns, J., 1992. The threshold problem in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 1, 3–16.
- Calow, P., 1992. Can ecosystems be healthy? Critical consideration of concepts. *J. Aquat. Ecosyst. Heal.* 1, 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF00044403>
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 100, 3–6. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90110-F](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90110-F)
- Cannicci, S., Bartolini, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., Litulo, C., Macia, A., Mrabu, E.J., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009. Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.021>
- Cannicci, S., Burrows, D., Fratini, S., Smith, T.J., Offenberg, J., Dahdouh-Guebas, F., 2008. Faunal impact on vegetation structure and ecosystem function in mangrove forests: A review. *Aquat. Bot.* 89, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.01.009>
- Cannicci, S., Fratini, S., Vannini, M., 1999. Short-range homing in fiddler crabs (*Ocypodidae*, genus *Uca*): A homing mechanism not based on local visual landmarks. *Ethology* 105, 867–880. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.1999.00453.x>
- Cannicci, S., Fusi, M., Cimó, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., 2018. Interference competition as a key determinant for spatial distribution of mangrove crabs. *BMC Ecol.* 18. <https://doi.org/10.1186/s12898-018-0164-1>
- Capdeville, C., 2018. Évaluation des capacités de résistance et de résilience de l'écosystème mangrove en réponse à des apports d'eaux usées domestiques prétraitées. Université de Toulouse.
- Capdeville, C., Abdallah, K., Buffan-Dubau, E., Lin, C., Azemar, F., Lambs, L., Fromard, F., Rols, J.L., Leflaive, J., 2018. Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. *Mar. Pollut. Bull.* 129, 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.035>
- Capdeville, C., Abdallah, K., Walcker, R., Rols, J.L., Fromard, F., Leflaive, J., 2019. Contrasted resistance and resilience of two mangrove forests after exposure to long-term and short-term anthropic disturbances. *Mar. Environ. Res.* 146, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.03.002>
- Carignan, V., Villard, M.A., 2002. Selecting indicator species to monitor ecological integrity: A review. *Environ. Monit. Assess.* 78, 45–61. <https://doi.org/10.1023/A:1016136723584>
- Caro, T., 2010. *Conservation by proxy: indicator, umbrella, keystone, flagship, and other surrogate species*. Island Press.
- Chabot, D., Steffensen, J.F., Farrell, A.P., 2016. The determination of standard metabolic rate in fishes. *J. Fish Biol.* 88, 81–121. <https://doi.org/10.1111/jfb.12845>
- Charmantier, G., 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: A review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 33, 177–190. <https://doi.org/10.1080/07924259.1998.9652630>
- Charmantier, G., Charmantier-daures, M., Towle, D.W., 2009. Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods, in: Evans, D.. (Ed.), *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*. CR.

- Charmantier, G., Haond, C., Lignot, J.H., Charmantier-Daures, M., 2001. Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: A review in homarid lobsters. *J. Exp. Biol.* 204, 967–977. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.5.967>
- Chen, J.M., Chen, J.C., 2000. Study on the free amino acid levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia. *Aquat. Toxicol.* 50, 27–37. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00095-8)
- Chuine, I., 2010. Why does phenology drive species distribution? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 3149–3160. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0142>
- Clark, T.D., Sandblom, E., Jutfelt, F., 2013. Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: Respirometry, relevance and recommendations. *J. Exp. Biol.* 216, 2771–2782. <https://doi.org/10.1242/jeb.084251>
- Claireaux, G., Lefrançois, C., 2007. Linking environmental variability and fish performance: Integration through the concept of scope for activity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 2031–2041. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2099>
- Clough, B.F., Boto, K.G., Attiwill, P.M., 1983. Mangroves and sewage: a re-evaluation. Springer, Dordrecht, pp. 151–161. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0914-9_17
- Coggan, N. V., Hayward, M.W., Gibb, H., 2018. A global database and “state of the field” review of research into ecosystem engineering by land animals. *J. Anim. Ecol.* 87, 974–994. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12819>
- Coles, S.L., Brown, B.E., 2003. Coral bleaching — capacity for acclimatization and adaptation. Elsevier, pp. 183–223. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(03\)46004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(03)46004-5)
- Colinet, H., Sinclair, B.J., Vernon, P., Renault, D., 2015. Insects in fluctuating thermal environments. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 123–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021017>
- Collier, R.J., Renquist, B.J., Xiao, Y., 2017. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. *J. Dairy Sci.* 100, 10367–10380.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 279, 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00329-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00329-5)
- Copeland, D.E., Fitzjarrell, A.T., 1968. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* rathbun) with notes on modified mitochondria. *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* 92, 1–22. <https://doi.org/10.1007/BF00339398>
- Cortes, R.M.V., Hughes, S.J., Pereira, V.R., Varandas, S.D.G.P., 2013. Tools for bioindicator assessment in rivers: The importance of spatial scale, land use patterns and biotic integration. *Ecol. Indic.* 34, 460–477. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.06.004>
- Cossu-Leguille, C., 1996. Activités de systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique. Université de Metz.
- Costanza, R., 1992. Ecological economics: the science and management of sustainability. Columbia University Press.
- Costanza, R., D’Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O’Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M., 1997. The value of the world’s ecosystem services and natural capital. *LK - https://royalroads.on.worldcat.org/oclc/4592801201. Nat. TA - TT - 387, 253–260.*
- Crane, J., 1975. Fiddler crabs of the world: Ocypididae: Genus *Uca*. Princeton University press, New Jersey. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(78\)90130-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(78)90130-6)
- Cuddington, K., 2001. The “balance of nature” metaphor and equilibrium in population

- ecology. Biol. Philos. 16, 463–479. <https://doi.org/10.1023/A:1011910014900>
- Das, S., Tseng, L.C., Chou, C., Wang, L., Souissi, S., Hwang, J.S., 2019. Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the mud shrimp *Austinoegbia edulis* (Crustacea: Decapoda). Environ. Sci. Pollut. Res. 26, 7752–7762. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-04113-x>
- Davies, I.M., Vethaak, D., 2012. ICES Cooperative research report, Cooperative Research Report.
- Davis, M.B., Shaw, R.G., Etterson, J.R., 2005. Evolutionary responses to changing climate. Ecology 86, 1704–1714. <https://doi.org/10.1890/03-0788>
- Dawson, T.L., Gores, G.J., Nieminen, A.L., Herman, B., Lemasters, J.J., 1993. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 264. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.4.c961>
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 2003. The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. Environ. Toxicol. Chem. 22, 1632–1641.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1998. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing - I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. Hydrobiologia 367, 199–209. <https://doi.org/10.1023/a:1003240502946>
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., Giesy, J.P., 2000. Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. New Microbiotests Routine Toxic. Screen. Biomonitoring 13–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4289-6_2
- de la Iglesia, H.O., Rodríguez, E.M., Dezi, R.E., 1994. Burrow plugging in the crab *Uca uruguayensis* and its synchronization with photoperiod and tides. Physiol. Behav. 55, 913–919. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90079-5)
- De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). Aquat. Toxicol. 50, 51–71. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00094-6)
- De Lange, H.J., Sala, S., Vighi, M., Faber, J.H., 2010. Ecological vulnerability in risk assessment - A review and perspectives. Sci. Total Environ. 408, 3871–3879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.009>
- De Vries, M.C., Wolcott, D.L., 1993. Gaseous ammonia evolution is coupled to reprocessing of urine at the gills of ghost crabs. J. Exp. Zool. 267, 97–103. <https://doi.org/10.1002/jez.1402670202>
- Dedourge, O., Geffard, A., Amiard-Triquet, C., 2008. Origine des perturbations du métabolisme énergétique, in: Lavoisier, T. (Ed.), Les Biomarqueurs Dans l'évaluation de l'état Écologique Des Milieux Aquatiques. Paris, pp. 241–271.
- deFur, P.L., 2004. Use and role of invertebrate models in endocrine disruptor research and testing. ILAR J. 45, 484–493. <https://doi.org/10.1093/ilar.45.4.484>
- deFur, P.L., McMahan, B.R., 1984. Physiological Compensation to Short-Term Air Exposure in Red Rock Crabs, *Cancer productus* Randall, from Littoral and Sublittoral Habitats. II. Acid-Base Balance. Physiol. Zool. 57, 151–160. <https://doi.org/10.1086/physzool.57.1.30155977>
- DeFur, P.L., Pease, A., Siebelink, A., Elfers, S., 1988. Respiratory responses of blue crabs, *Callinectes sapidus*, to emersion. Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol. 89, 97–101. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(88\)91145-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(88)91145-0)
- Degen, A.A., 2012. Ecophysiology of small desert mammals. Springer Science & Business Media.

- Dehnel, P., 1962. Aspects of Osmoregulation in Two Species of Intertidal Crabs. *Biol. Bull.* 122, 208–227. <https://doi.org/10.2307/1539589>
- Dejours, P., 1994. Environmental factors as determinants in bimodal breathing: An introductory overview. *Integr. Comp. Biol.* 34, 178–183. <https://doi.org/10.1093/icb/34.2.178>
- Délépine, R., Mauge, L.A., Padovani, A., Service Météorologique de La Réunion, 1977. Observations écologiques et climatologiques dans les îles d'Europa, Glorieuses, Tromelin. *Biologie marine et exploitation des ressources de l'océan Indien occidental*. Saint Denis, La Réunion, ORSTOM. 81–112.
- Depledge, M.H., 1994. The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological Tools, in: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. CRC Press, pp. 271–295. <https://doi.org/10.1201/9780367813703-20>
- Depledge, M.H., 1984. The influence of aerial exposure on gas exchange and cardiac activity in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 79, 339–344. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(84\)90523-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90523-1)
- Dinhut, V., Nicet, J.B., Quod, J.P., 2008. Suivi et état de santé 2007 des récifs coralliens de Mayotte. *Rev. d'Ecologie (La Terre la Vie)* 63, 103–114.
- Dirberg, G., 2015. Rapport bibliographique pour la mise en place d ' un indicateur mangrove dans le cadre de la DCE Eaux Littorales dans les DOM.
- Dirberg, G., Barnaud, G., Brivois, O., Caessteker, P., Cormier-Salem, M.-C., Cuny, P., Fiard, M., Fromard, F., Gilbert, F., Grouard, S., others, 2020. Towards the development of ecosystem-based indicators of mangroves functioning state in the context of the EU water framework directive. *Vie Milieu* 70, 303–310.
- Durollet, M., 2015. Régulation de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* : rôle de la température. Université de La Rochelle
- Emmerson, W.D., 1994. Seasonal breeding cycles and sex ratios of eight species of crabs from Mgazana, a mangrove estuary in Transkei, southern Africa. *J. Crustac. Biol.* 14, 568–578. <https://doi.org/10.2307/1549002>
- Emmerson, W.D., McGwynne, L.E., 1992. Feeding and assimilation of mangrove leaves by the crab *Sesarma meinerti* de Man in relation to leaf-litter production in Mgazana, a warm-temperate southern African mangrove swamp. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 157, 41–53. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90073-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90073-J)
- Eshky, A.A., Taylor, A.C., Atkinson, R.I.A., 1996. The Effects of Temperature on Aspects of Respiratory Physiology of the Semiterrestrial Crabs , *Uca inversa* (Hoffmann) and *Metopograpsus messor* (Forsksl) from the Red Sea 114, 297–304.
- Ewel, K.C., Twilley, R.R., Ong, J.E., 1998. Different kinds of mangrove forests provide different goods and services. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* 7, 83–94. <https://doi.org/10.2307/2997700>
- Farrelly, C.A., Greenaway, P., 2005. The morphology and vasculature of the respiratory organs of terrestrial hermit crabs (*Coenobita* and *Birgus*): gills , branchiostegal lungs and abdominal lungs 34, 63–87. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.11.002>
- Farrelly, C.A., Greenaway, P., 1994. Air-breathing crabs 130, 113–130.
- Farrelly, C.A., Greenaway, P., 1992. Morphology and ultrastructure of the gills of terrestrial crabs (Crustacea, Gecarcinidae and Grapsidae): Adaptations for air-breathing. *Zoomorphology* 112, 39–49. <https://doi.org/10.1007/BF01632993>
- Fatoyinbo, T., Feliciano, E.A., Lagomasino, D., Lee, S.K., Trettin, C., 2018. Estimating mangrove aboveground biomass from airborne LiDAR data: A case study from the Zambezi River delta. *Environ. Res. Lett.* 13. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa9f03>

- Feder, M.E., Feder, M.E., Bennett, A.F., Burggren, W.W., Huey, R.B., 1987. New directions in ecological physiology. Cambridge University Press.
- Ferry-Graham, L.A., Gibb, A.C., 2018. Ecophysiology, in: Encyclopedia of Ecology. Elsevier, pp. 346–349. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63768-0.00531-X>
- Flatt, T., Heyland, A., 2011. Mechanisms of life history evolution: the genetics and physiology of life history traits and trade-offs. OUP Oxford.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–280. <https://doi.org/10.1897/05-257R.1>
- Foucreau, N., 2015. Etude des réponses écophysiological et fonctionnelles de populations de l'organisme clé *Gammarus pulex* (crustacea , Amphipoda) dans un contexte de changement climatique , au sein de la vallée du Rhône. Université Claude Bernard Lyon 1
- Freire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C., 2008. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 151, 272–304. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.008>
- Friess, D.A., Rogers, K., Lovelock, C.E., Krauss, K.W., Hamilton, S.E., Lee, S.Y., Lucas, R., Primavera, J., Rajkaran, A., Shi, S., 2019. The State of the World's Mangrove Forests: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 44, 89–115. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-101718-033302>
- Friess, D.A., Yando, E.S., Abuchahla, G.M.O., Adams, J.B., Cannicci, S., Canty, S.W.J., Cavanaugh, K.C., Connolly, R.M., Cormier, N., Dahdouh-Guebas, F., Diele, K., Feller, I.C., Fratini, S., Jennerjahn, T.C., Lee, S.Y., Ogurcak, D.E., Ouyang, X., Rogers, K., Rowntree, J.K., Sharma, S., Sloey, T.M., Wee, A.K.S., 2020. Mangroves give cause for conservation optimism, for now. *Curr. Biol.* 30, R153–R154. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.054>
- Fromard, F., McKey, M.H., Michaud, E., HALLE, F., 2018. Mangrove, une forêt dans la mer. *Cherche midi*.
- Fry, F.E.J., 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish. *Fish Physiol.* 1–98.
- Furriel, R.P.M., Firmino, K.C.S., Masui, D.C., Faleiros, R.O., Torres, A.H., Mcnamara, J.C., 2010. Structural and biochemical correlates of Na⁺,K⁺-ATPase driven ion uptake across the posterior gill epithelium of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 313 A, 508–523. <https://doi.org/10.1002/jez.622>
- Fusi, M., Babbini, S., Giomi, F., Fratini, S., Daniele, F.D., Christopher, D., Mcquaid, D., Porri, F., Cannicci, S., 2017. Thermal sensitivity of the crab *Neosarmatium africanum* in tropical and temperate mangroves on the east coast of Africa. *Hydrobiologia* 803, 251–263. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3151-1>
- Fusi, M., Cannicci, S., Daffonchio, D., Mostert, B., Pörtner, H.O., Giomi, F., 2016. The trade-off between heat tolerance and metabolic cost drives the bimodal life strategy at the air-water interface. *Sci. Rep.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep19158>
- Fusi, M., Giomi, F., Babbini, S., Daffonchio, D., Mcquaid, C.D., Porri, F., Cannicci, S., 2015. Thermal specialization across large geographical scales predicts the resilience of mangrove crab populations to global warming. *Oikos* 124, 784–795. <https://doi.org/10.1111/oik.01757>
- Garland Jr, T., Carter, P.A., 1994. Evolutionary physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 579–621.
- Gibson, R., Barker, P.L., 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 17, 285–346.

- Giller, P.S., Hillebrand, H., Berninger, U.G., Gessner, M.O., Hawkins, S., Inchausti, P., Inglis, C., Leslie, H., Malmqvist, B., Monaghan, M.T., Morin, P.J., O'Mullan, G., 2004. Biodiversity effects on ecosystem functioning: Emerging issues and their experimental test in aquatic environments. *Oikos* 104, 423–436. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13253.x>
- Giraudoux, P., Lebreton, J.-D., 2018. La notion de santé des écosystèmes ou zombies écologiques: comment des idées mortes vivent encore parmi nous.
- Giri, C., Muhlhausen, J., 2008. Mangrove forest distributions and dynamics in Madagascar (1975-2005). *Sensors* 8, 2104–2117. <https://doi.org/10.3390/s8042104>
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., Duke, N., 2011. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20, 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x>
- Gonçalves, R.R., Masui, D.C., McNamara, J.C., Mantelatto, F.L.M., Garçon, D.P., Furriel, R.P.M., Leone, F.A., 2006. A kinetic study of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase, and its role in ammonia excretion in the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 145, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.007>
- Grandcourt, A. De, 2018. Les mangroves à Mayotte Etat des lieux et enjeux de gestion Rapport bibliographique.
- Gül, M.R., Griffen, B.D., 2019. Burrowing behavior and burrowing energetics of a bioindicator under human disturbance. *Ecol. Evol.* 9, 14205–14216. <https://doi.org/10.1002/ece3.5853>
- Gül, M.R., Griffen, B.D., 2018. Impacts of human disturbance on ghost crab burrow morphology and distribution on sandy shores. *PLoS One* 13, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209977>
- Harris, R.R., Aladin, N. V., 1997. The Ecophysiology of Osmoregulation in Crustacea. *Ion. Regul. Anim. A Tribut. to Profr. W.T.W.Potts* 1–25. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60415-7_1
- Hartnoll, R.G., 1975. The Grapsidae and Ocypodidae (Decapoda: Brachyura) of Tanzania. *J. Zool.* 177, 305–328. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1975.tb02235.x>
- Hartnoll, R.G., Cannici, S., Emmerson, W.D., Fratini, S., Macia, A., Mgaya, Y., Porri, F., Ruwa, R.K., Shunula, J.P., Skov, M.W., others, 2002. Geographic trends in mangrove crab abundance in East Africa. *Wetl. Ecol. Manag.* 10, 203–213.
- Hatton, I.A., Dobson, A.P., Storch, D., Galbraith, E.D., Loreau, M., 2019. Linking scaling laws across eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 21616–21622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900492116>
- Hawkins, A.J.S., Jones, M.B., 1982. Gill area and ventilation in two mud crabs, *Helice crassa* Dana (Grapsidae) and *Macrophthalmus hirtipes* (Jacquinot) (Ocypodidae), in relation to habitat. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 60, 103–118. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(82\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90153-8)
- Heink, U., Kowarik, I., 2010. What are indicators? On the definition of indicators in ecology and environmental planning 10, 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.09.009>
- Hemmi, J.M., 2005. Predator avoidance in fiddler crabs: 1. Escape decisions in relation to the risk of predation. *Anim. Behav.* 69, 603–614. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.06.018>
- Henry, R.P., 1994. Morphological, behavioral, and physiological characterization of bimodal breathing crustaceans. *Integr. Comp. Biol.* 34, 205–215. <https://doi.org/10.1093/icb/34.2.205>

- Herteman, M., 2010. Evaluation des capacités bioremédiatrices d'une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. Toulouse 3.
- Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L., 2011. Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol. Eng.* 37, 1283–1291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Freminet, A., 1996. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigeal isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery. *Physiol. Zool.* 69, 1277–1300. <https://doi.org/10.1086/physzool.69.6.30164261>
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Freminet, A., 1995. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigeal *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiol. Zool.* 68, 223–244. <https://doi.org/10.1086/physzool.68.2.30166501>
- Hogarth, P.J., 1999. *The Biology of Mangroves and Seagrasses, The Biology of Mangroves and Seagrasses.* Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198716549.001.0001>
- Holt, R.D., 1990. The microevolutionary consequences of climate change. *Trends Ecol. Evol.* 5, 311–315. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(90\)90088-U](https://doi.org/10.1016/0169-5347(90)90088-U)
- Hooper, D.U., Chapin Iii, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., others, 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol. Monogr.* 75, 3–35.
- Hooper, D.U., Vitousek, P.M., 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* (80-.). 277, 1302–1305. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1302>
- Hutchinson, T.H., 2007. Small is useful in endocrine disrupter assessment - Four key recommendations for aquatic invertebrate research. *Ecotoxicology* 16, 231–238. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0107-z>
- Hutton, J., 1788. X. Theory of the Earth; or an Investigation of the Laws observable in the Composition, Dissolution, and Restoration of Land upon the Globe. *Trans. R. Soc. Edinburgh* 1, 209–304. <https://doi.org/10.1017/S0080456800029227>
- ICES, 2021. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBC), ICES WGBC REPORT 2021.
- Igulu, M.M., Nagelkerken, I., Dorenbosch, M., Grol, M.G.G., Harborne, A.R., Kimirei, I.A., Mumby, P.J., Olds, A.D., Mgaya, Y.D., 2014. Mangrove Habitat Use by Juvenile Reef Fish: Meta-Analysis Reveals that Tidal Regime Matters More than Biogeographic Region. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114715>
- Ikeda, T., 2016. Routine metabolic rates of pelagic marine fishes and cephalopods as a function of body mass, habitat temperature and habitat depth. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 480, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.03.012>
- Innes, A.J., Taylor, E.W., 1986. The evolution of air-breathing in crustaceans: A functional analysis of branchial, cutaneous and pulmonary gas exchange. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 85, 621–637. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90271-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90271-9)
- INSEE Mayotte, 2020. Synthèse démographique, sociale et économique.
- Ippolito, A., Sala, S., Faber, J.H., Vighi, M., 2010. Ecological vulnerability analysis: A river basin case study. *Sci. Total Environ.* 408, 3880–3890. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.002>

- Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., others, 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154, 103–116.
- Jeanson, M., 2009. Morphodynamique du littoral de Mayotte des processus au réseau de surveillance. *Univ. du littoral côte d'opale* 353p.
- Jeanson, M., Dolique, F., Anthony, E.J., Aubry, A., 2019. Decadal-scale Dynamics and Morphological Evolution of Mangroves and Beaches in a Reef-lagoon Complex, Mayotte Island. *J. Coast. Res.* 88, 195–208. <https://doi.org/10.2112/SI88-015.1>
- Jimenez, A.G., Bennett, W.A., 2005. Respiratory physiology of three Indo-Pacific fiddler crabs : Metabolic responses to intertidal zonation patterns <https://doi.org/10.1163/156854005775197226>
- Jimenez, A.G., Kinsey, S.T., 2015. Energetics and Metabolic Regulation, in: Chang, E., Thiel, M. (Eds.), *The Natural History of Crustacea - Physiology*. Oxford Academic, p. 511.
- Jonah, F.E., Agbo, N.W., Agbeti, W., Adjei-boateng, D., Shimba, M.J., 2015. Ocean & Coastal Management The ecological effects of beach sand mining in Ghana using ghost crabs (Ocypode species) as biological indicators. *Ocean Coast. Manag.* 112, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2015.05.001>
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*.
- Jones, T.G., Glass, L., Gandhi, S., Ravaoarinorotsihoarana, L., Carro, A., 2016. Madagascar 's Mangroves : Quantifying Nation-Wide and Ecosystem Specific Dynamics , and Detailed. <https://doi.org/10.3390/rs8020106>
- Karasov, W.H., del Rio, C.M., 2020. *Physiological Ecology: How Animals Process Energy, Nutrients, and Toxins*. Princeton University Press. <https://doi.org/doi:10.1515/9780691213316>
- Kasumovic, M.M., 2013. The multidimensional consequences of the juvenile environment: Towards an integrative view of the adult phenotype. *Anim. Behav.* 85, 1049–1059. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.02.009>
- Kawecki, T.J., Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7, 1225–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>
- Kelly, S.A., Panhuis, T.M., Stoehr, A.M., 2012. Phenotypic plasticity: Molecular mechanisms and adaptive significance. *Compr. Physiol.* 2, 1417–1439. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110008>
- Kerr, S.R., 1976. Ecological Analysis and the Fry Paradigm. *J. Fish. Res. Board Canada* 33, 329–335. <https://doi.org/10.1139/f76-051>
- Killen, S.S., Christensen, E.A.F., Cortese, D., Závorka, L., Norin, T., Cotgrove, L., Crespel, A., Munson, A., Nati, J.J.H., Papatheodoulou, M., McKenzie, D.J., 2021. Guidelines for reporting methods to estimate metabolic rates by aquatic intermittent-flow respirometry. *J. Exp. Biol.* 224, 1–17. <https://doi.org/10.1242/jeb.242522>
- Kimberly, D.A., Salice, C.J., 2015. Evolutionary responses to climate change and contaminants: Evidence and experimental approaches. *Curr. Zool.* 61, 690–701. <https://doi.org/10.1093/czoolo/61.4.690>
- Kinzig, A.P., Pacala, S., Tilman, D., 2013. *The functional consequences of biodiversity: Empirical progress and theoretical extensions (mpb-33)*. Princeton University Press.
- Klerks, P.L., Levinton, J.S., 1989. Rapid Evolution of Metal Resistance in a Benthic Oligochaete Inhabiting a Metal-polluted Site. *Biol. Bull.* 176, 135–141. <https://doi.org/10.2307/1541580>
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environ. Pollut.* 45, 173–205. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(87\)90057-](https://doi.org/10.1016/0269-7491(87)90057-)

- Kohler, S.A., Parker, M.O., Ford, A.T., 2018. Species-specific behaviours in amphipods highlight the need for understanding baseline behaviours in ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 202, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.013>
- Koroleff, F., 1983. Determination of ammonia. *Methods seawater Anal.*
- Kramer, V.J., Etterson, M.A., Hecker, M., Murphy, C.A., Roesijadi, G., Spade, D.J., Spromberg, J.A., Wang, M., Ankley, G.T., 2011. Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: Bridging to population-level effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 64–76. <https://doi.org/10.1002/etc.375>
- Kristensen, E., 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J. Sea Res.* 59, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.05.004>
- Kristensen, E., Alongi, D.M., 2006. Control by fiddler crabs (*Uca vocans*) and plant roots (*Avicennia marina*) on carbon, iron, and sulfur biogeochemistry in mangrove sediment. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1557–1571. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.4.1557>
- Kristensen, E., Penha-Lopes, G., Delefosse, M., Valdemarsen, T., Quintana, C.O., Banta, G.T., 2012. What is bioturbation? the need for a precise definition for fauna in aquatic sciences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446, 285–302. <https://doi.org/10.3354/meps09506>
- L'honoré, T., 2019. Plasticité phénotypique et variabilité intraspécifique de la tolérance à la dessalure chez le loup méditerranéen *Dicentrarchus labrax*. Thèse. Université de Montpellier.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, Technique et Documentation.
- Lambert, S., 2017. Impact du rejet d'eaux usées domestiques sur la densité et physiologie des crabes de mangrove. Université de Montpellier. Mémoire de Master 2.
- Lapègue, J., 1999. Aspects quantitatifs et qualitatifs de la pluviométrie dans deux enjeux majeurs de la problématique de l'eau à Mayotte: la ressource hydrique, l'assainissement pluvial et l'érosion. Université de La Réunion.
- Lauer, M.M.H., De Oliveira, C.B., Yano, N.L.I., Bianchini, A., 2012. Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 156, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.08.001>
- Lee, S.Y., 1998. Ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: A review. *Mar. Freshw. Res.* 49, 335–343. <https://doi.org/10.1071/mf97179>
- Lee, S.Y., 1997. Potential trophic importance of the faecal material of the mangrove sesarminine crab *Sesarma masse*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 159, 275–284. <https://doi.org/10.3354/meps159275>
- Leopold, A., 1949. *Almanach d'un comté des sables*. Paris: Flammarion.
- Leopold, A., 1941. Wilderness as a Land Laboratory. *The Living Wilderness* 6, 3.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Lignot, J.-H., Charmantier, G., 2015. Osmoregulation and excretion. *Nat. Hist. Crustac.* 4, 249–285.
- Lignot, J.-H., Spanings-Pierrot, G., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209–245.

- Lin, H.C., Su, Y.C., Su, S.H., 2002. A comparative study of osmoregulation in four fiddler crabs (Ocypodidae: Uca). *Zoolog. Sci.* 19, 643–650. <https://doi.org/10.2108/zsj.19.643>
- Lin, Y., Huang, J. jia, Dahms, H.U., Zhen, J. jing, Ying, X. ping, 2017. Cell damage and apoptosis in the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* induced by cadmium. *Aquat. Toxicol.* 190, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.07.008>
- Lindenmayer, D.B., Likens, G.E., 2011. Direct measurement versus surrogate indicator species for evaluating environmental change and biodiversity loss. *Ecosystems* 14, 47–59.
- Little, C., others, 1990. *The terrestrial invasion: an ecophysiological approach to the origins of land animals.* CUP Archive.
- Longépée, E., Abdallah, A.A., Jeanson, M., Golléty, C., 2021. Local ecological knowledge on mangroves in mayotte island (Indian ocean) and influencing factors. *Forests* 12, 1–23. <https://doi.org/10.3390/f12010053>
- Lovelock, J., 1988. *Ages of Gaia.* Oxford: Oxford University Press.
- Lucu, Ć., Towle, D.W., 2003. Na⁺+K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 135, 195–214. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00064-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00064-3)
- Lugendo, B.R., Kimirei, I.A., 2021. Anthropogenic nitrogen pollution in mangrove ecosystems along Dar es Salaam and Bagamoyo coasts in Tanzania. *Mar. Pollut. Bull.* 168, 112415. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112415>
- Mabula, M.J., Mangora, M.M., Muhando, C.A., 2017. Peri-urban Mangroves of Dar es Salaam-Tanzania are Highly Vulnerable to Anthropogenic Pressures 141–172.
- Macamo, C., 2018. *The mangroves of Mozambique: pathways to conservation through integrated management.*
- Macamo, C., Siteo, A., 2017. *Relatório de Governação Ambiental 2016-Governação e gestão de mangais em Moçambique.* 63 pp. Maputo, Cent. Terra Viva.
- Macnae, W., 1969. A General Account of the Fauna and Flora of Mangrove Swamps and Forests in the Indo-West-Pacific Region. *Adv. Mar. Biol.* 6, 73–270. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60438-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60438-1)
- Maina, J.N., 1998. Bimodal Breathing: Compromise Respiration 217–262. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58843-3_5
- Mantel, L.H., Farmer, L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation. *Intern. Anat. Physiol. Regul.* 5, 53–161.
- McCarty, L.S., Power, M., Munkittrick, K.R., 2002. Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment, in: *Human and Ecological Risk Assessment.* pp. 159–164. <https://doi.org/10.1080/20028091056791>
- McGaw, I.J., Curtis, D.L., 2013. A review of gastric processing in decapod crustaceans. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 183, 443–465. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0730-3>
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood., C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50, 231–243. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00105-8)
- McNamara, J.C., Faria, S.C., 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: A review. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 997–1014. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0665-8>
- Medina, M.H., Correa, J.A., Barata, C., 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible

- consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67, 2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.024>
- Mégevand, L., Martínez-Alarcón, D., Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Lejeune, M., Lignot, J.-H., Sucré, E., 2021. The hepatopancreas of the mangrove crab *Neosarmatium africanum*: a possible key to understanding the effects of wastewater exposure (Mayotte Island, Indian Ocean). *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14892-5>
- Méral, P., 2011. Le concept de service écosystémique en économie: origine et tendances récentes. *Natures Sci. Soc.* 20, 3–15. <https://doi.org/10.1051/nss/2012002>
- Middleton, B., Grace, J., 2004. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives. *Restor. Ecol.* 12, 611–612. <https://doi.org/10.1111/j.1061-2971.2004.120401.x>
- Mikola, J., Setälä, H., Setälä, H., 1998. Relating Species Diversity to Ecosystem Functioning: Mechanistic Backgrounds and Experimental Approach with a Decomposer Food Web. *Oikos* 83, 180. <https://doi.org/10.2307/3546560>
- Minelli, A., Fusco, G., 2013. Arthropod Post-embryonic Development, *Arthropod Biology and Evolution.* https://doi.org/10.1007/978-3-662-45798-6_5
- Mohamed, M.O.S., Mangion, P., Mwangi, S., Kairo, J.G., Dahdouh-Guebas, F., Koedam, N., 2016. Are Peri-Urban Mangroves Vulnerable? An Assessment Through Litter Fall Studies 39–51. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25370-1_3
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R., 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>
- Monserrat, J.M., Martínez-Alarcón, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. & Pharmacol.* 146, 221–234.
- Morris, S., 2002. The ecophysiology of air-breathing in crabs with special reference to *Gecarcoidea natalis*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 131, 559–570. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00011-8)
- Morris, S., 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 204, 979–989. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.5.979>
- Morrison, M.L., 2009. Restoring wildlife: ecological concepts and practical applications. *Science and Practice of Ecolog.*
- Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., 2013. Biomarkers of ecotoxicological relevance, in: Blaise, C. (Ed.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology.* Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2>
- Mouniboudine, H., 2019. Impact de l' ammonium et de la variation de la salinité sur la physiologie des crabes de mangrove à Mayotte : le cas de *P. guttatum* et *N. africanum*. Le Mans Université.
- Nagelkerken, I., Blaber, S.J.M., Bouillon, S., Green, P., Haywood, M., Kirton, L.G., Meynecke, J.O., Pawlik, J., Penrose, H.M., Sasekumar, A., Somerfield, P.J., 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquat. Bot.* 89, 155–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.007>
- Nelson, J.A., 2016. Oxygen consumption rate v. rate of energy utilization of fishes: A comparison and brief history of the two measurements. *J. Fish Biol.* 88, 10–25. <https://doi.org/10.1111/jfb.12824>
- Neufeld, G.J., Holliday, C.W., Pritchard, J.B., 1980. Salinity adaption of gill Na, K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 211, 215–224.

<https://doi.org/10.1002/jez.1402110210>

- Nobbs, M., Blamires, S.J., 2017. Fiddler crab spatial distributions are influenced by physiological stressors independent of sympatric interactions. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 491, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.03.007>
- Nordhaus, I., Diele, K., Wolff, M., 2009. Activity patterns, feeding and burrowing behaviour of the crab *Ucides cordatus* (Ucididae) in a high intertidal mangrove forest in North Brazil. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 374, 104–112.
- Ikeda, T., 2016. Routine metabolic rates of pelagic marine fishes and cephalopods as a function of body mass, habitat temperature and habitat depth. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 480, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.03.012>
- O'Brien, A., Townsend, K., Hale, R., Sharley, D., Pettigrove, V., 2016. How is ecosystem health defined and measured? A critical review of freshwater and estuarine studies. *Ecol. Indic.* 69, 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.05.004>
- O'Connor, M.P., Kemp, S.J., Agosta, S.J., Hansen, F., Sieg, A.E., Wallace, B.P., McNair, J.N., Dunham, A.E., 2007. Reconsidering the mechanistic basis of the metabolic theory of ecology. *Oikos* 116, 1058–1072. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.15534.x>
- Oliveira, G.T., Fernandes, F.A., Bond-Buckup, G., Bueno, A.A., Silva, R.S.M., 2003. Circadian and seasonal variations of the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aegliidae). *Mem. Museum Victoria* 60, 59–62. <https://doi.org/10.24199/j.mmv.2003.60.8>
- Onken, H., Tresguerres, M., Luquet, C.M., 2003. Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chasmagnathus granulatus*. *J. Exp. Biol.* 206, 1017–1023. <https://doi.org/10.1242/jeb.00227>
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchon, M.R., 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
- Ouyang, X., Guo, F., 2016. Paradigms of mangroves in treatment of anthropogenic wastewater pollution. *Sci. Total Environ.* 544, 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.013>
- Papadopoulos, I., Wooldridge, T.H., Newman, B.K., 2002. Larval life history strategies of sub-tropical southern African estuarine brachyuran crabs and implications for tidal inlet management. *Wetl. Ecol. Manag.* 10, 249–256. <https://doi.org/10.1023/A:1020183931789>
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Kristensen, E., Paula, J., 2009. Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1694–1703. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.015>
- Pequeux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 15, 1–60.
- Pfennig, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D., Moczek, A.P., 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 25, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.05.006>
- Pigneret, M., 2018. Réponses écophysiologicals à une pollution d'origine anthropique chez un organisme sentinelle et conséquences sur le fonctionnement des bassins d'infiltration.
- Poisson, E., Fisson, C., Amiard-Triquet, C., Burgeot, T., Couteau, J., Dur, G., Durand, F., Forget-Leray, J., Letendre, J., Souissi, S., Xuereb, B., 2011. Effets de la contamination chimique : des organismes en danger ?
- Polain, S., 2017. Étude de la communauté bactérienne planctonique et suivi de deux bioindicateurs de l'état de santé du milieu dans la Baie de la Revellata (Corse).

Université de Liège.

- Price, C.A., Weitz, J.S., Savage, V.M., Stegen, J., Clarke, A., Coomes, D.A., Dodds, P.S., Etienne, R.S., Kerkhoff, A.J., McCulloh, K., Niklas, K.J., Olf, H., Swenson, N.G., 2012. Testing the metabolic theory of ecology. *Ecol. Lett.* 15, 1465–1474. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01860.x>
- Priede, I., 1985. Metabolic Scope in Fishes, in: Tyler, P., Calow, P. (Eds.), *Fish Energetics: New Perspectives*. Springer Netherlands, pp. 33–64.
- Prud'homme, S.M., Chaumot, A., Cassar, E., David, J.P., Reynaud, S., 2017. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. *Environ. Pollut.* 220, 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.056>
- Queiroga, H., Blanton, J., 2004. Interactions between behaviour and physical forcing in the control of horizontal transport of decapod crustacean larvae, *Advances in Marine Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(04\)47002-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(04)47002-3)
- Ragionieri, L., Fratini, S., Schubart, C.D., 2012. Revision of the *Neosarmatium meinerti* species complex (Decapoda: Brachyura: Sesarmidae), with descriptions of three pseudocryptic Indo–West Pacific species. *Raffles Bull. Zool.* 60, 71–87.
- Rahi, M.L., Moshtaghi, A., Mather, P.B., Hurwood, D.A., 2018. Osmoregulation in decapod crustaceans: physiological and genomic perspectives. *Hydrobiologia* 825, 177–188. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3690-0>
- Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Smith, B.D., Best, S.L., Nassiri, Y., Langston, W.J., 1999. Trace metal uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in NW Europe differentially enriched with trace metals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 183, 189–203. <https://doi.org/10.3354/meps183189>
- Rapport, D.J., 1995. Ecosystem health: more than a metaphor? *Environ. Values* 4, 287–309. <https://doi.org/10.3197/096327195776679439>
- Renault, D., Laparie, M., McCauley, S.J., Bonte, D., 2018. Environmental Adaptations, Ecological Filtering, and Dispersal Central to Insect Invasions. *Annu. Rev. Entomol.* 63, 345–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043315>
- Robertson, A.I., Alongi, D.M., 1992. Tropical mangrove ecosystems.
- Rolland, R., Boulet, V., 2005. Mayotte : Biodiversité et évaluation patrimoniale.
- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic Effects of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Decapod Crustaceans: A Review on Factors Influencing their Toxicity, Physiological Consequences, and Coping Mechanisms. *Rev. Fish. Sci.* 21, 1–21. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- Romano, N., Zeng, C., 2007. Acute toxicity of ammonia and its effects on the haemolymph osmolality, ammonia-N, pH and ionic composition of early juvenile mud crabs, *Scylla serrata* (Forskål). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.04.018>
- Rosenberg, M.S., 2020. A fresh look at the biodiversity lexicon for fiddler crabs (Decapoda: Brachyura: Ocypodidae). part 2: Biogeography. *J. Crustac. Biol.* 40, 365–383. <https://doi.org/10.1093/jcabi/ruaa029>
- Rosenberg, M.S., 2014. Contextual cross-referencing of species names for fiddler crabs (genus *Uca*): An experiment in cyber-taxonomy. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101704>
- Rosewarne, P.J., Wilson, J.M., Svendsen, J.C., 2016. Measuring maximum and standard metabolic rates using intermittent-flow respirometry: A student laboratory investigation of aerobic metabolic scope and environmental hypoxia in aquatic breathers. *J. Fish Biol.* <https://doi.org/10.1111/jfb.12795>

- Sanchez, W., Porcher, J., Sanchez, W., Utilisation, J.P., 2014. Utilisation des biomarqueurs pour la caractérisation de l'état écotoxicologique des masses d'eau To cite this version : HAL Id : ineris-00961937.
- Sanders, D., Jones, C.G., Thébault, E., Bouma, T.J., van der Heide, T., van Belzen, J., Barot, S., 2014. Integrating ecosystem engineering and food webs. *Oikos* 123, 513–524. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2013.01011.x>
- Santos, A., Baldisseroto, B., Bianchini, A., Colares, E.P., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C., 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 88, 21–25.
- Santos, E.A., Keller, R., 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 106, 343–347.
- Saravana Bhavan, P., Geraldine, P., 2009. Manifestation of carbaryl toxicity on soluble protein and histopathology in the hepatopancreas and gills of the prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *J. Environ. Biol.* 30, 533–538.
- Sasekumar, A., 1974. Distribution of Macrofauna on a Malayan Mangrove Shore. *J. Anim. Ecol.* 43, 51. <https://doi.org/10.2307/3157>
- Sayer, M.D.J., Davenport, J., 1991. Amphibious fish: why do they leave water? *Rev. Fish Biol. Fish.* 1, 159–181. <https://doi.org/10.1007/BF00157583>
- Scales, I.R., Friess, D.A., Glass, L., Ravaoarinorotsihoarana, L., 2018. Rural livelihoods and mangrove degradation in south-west Madagascar: Lime production as an emerging threat. *Oryx* 52, 641–645. <https://doi.org/10.1017/S0030605316001630>
- Schlacher, T.A., Lucrezi, S., Connolly, R.M., Peterson, C.H., Gilby, B.L., Maslo, B., Olds, A.D., Walker, S.J., Leon, J.X., Huijbers, C.M., Weston, M.A., Turra, A., Hyndes, G.A., Holt, R.A., Schoeman, D.S., 2016. Human threats to sandy beaches: A meta-analysis of ghost crabs illustrates global anthropogenic impacts. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 169, 56–73. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.11.025>
- Schlaepfer, M.A., Runge, M.C., Sherman, P.W., 2002. Ecological and evolutionary traps. *Trends Ecol. Evol.* 17, 474–480. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02580-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02580-6)
- Schram, F.R., Castro, P., 2015. Introduction to Brachyura, in: *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 Vols)*. Brill, pp. 3–9.
- Schramski, J.R., Dell, A.I., Grady, J.M., Sibly, R.M., Brown, J.H., 2015. Metabolic theory predicts whole-ecosystem properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2617–2622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423502112>
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>
- Seebaugh, D.R., L'Amoreaux, W.J., Wallace, W.G., 2011. Digestive toxicity in grass shrimp collected along an impact gradient. *Aquat. Toxicol.* 105, 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.015>
- Shih, H. Te, Ng, P.K.L., Davie, P.J.F., Schubart, C.D., Türkay, M., Naderloo, R., Jones, D., 2016. Systematics of the family Ocypodidae Rafinesque, 1815 (Crustacea: Brachyura), Based on phylogenetic relationships, with a reorganization of subfamily rankings and a review of the taxonomic status of *Uca* Leach, 1814, Sensu lato and its subgenera. *Raffles Bull. Zool.* 64, 139–175.
- Siddig, A.A.H., Ellison, A.M., Ochs, A., Villar-Leeman, C., Lau, M.K., 2016. How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights

- from 14 years of publication in Ecological Indicators. Ecol. Indic. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.036>
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Exp. Physiol. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Silverthorn, D.U., Martini, F.H., Nath, J.L., 2015. Human Physiology: An Integrated Approach.
- Simberloff, D., 1998. Flagships, umbrellas, and keystones : is single-species management passé in the landscape era ? 83, 247–257.
- Sloman, K.A., Mcneil, P.L., 2012. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. J. Fish Biol. 81, 2175–2198. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03435.x>
- Snedaker, S., Snedaker, J.G., 1984. The mangrove ecosystem: research methods.
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: Implications of global climate change. Clim. Res. 37, 181–201. <https://doi.org/10.3354/cr00764>
- Spalding, M., Kainuma, M., Collins, L., 2010. World atlas of mangroves. ITTO, ISME, FAO, UNEP-WCMC. UNESCOMAB UNUINWEH. London Earthscan Publ. Ltd. doi 10, 76608.
- Spellerberg, I.F., 2005. Monitoring ecological change. Cambridge University Press.
- Takeda, S., Matsumasa, M., Kikuchi, S., Poovachiranon, S., Murai, M., 1996. Variation in the branchial formula of semiterrestrial crabs (Decapoda : Brachyura : Grapsidae and Ocypodidae) in relation to physiological adaptations to the envi. J. Crustac. Biol. 16, 472–486. <https://doi.org/10.1163/193724096x00496>
- Tam, N.F.Y., 1998. Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils. Environ. Pollut. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(98\)00084-0](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(98)00084-0)
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1996. Retention of wastewater-borne nitrogen and phosphorus in mangrove soils. Environ. Technol. (United Kingdom) 17, 851–859. <https://doi.org/10.1080/09593331708616453>
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1995. Mangrove soils as sinks for wastewater-borne pollutants. Hydrobiologia 295, 231–241. <https://doi.org/10.1007/BF00029130>
- Taylor, E.W., Butler, P.J., 1978. Aquatic and aerial respiration in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), acclimated to 15°C. J. Comp. Physiol. -- B 127, 315–323. <https://doi.org/10.1007/BF00738415>
- Taylor, E.W., Butler, P.J., Sherlock, P.J., 1973. The respiratory and cardiovascular changes associated with the emersion response of *Carcinus maenas* (L.) during environmental hypoxia, at three different temperatures. J. Comp. Physiol. 86, 95–115. <https://doi.org/10.1007/BF00702531>
- Taylor, E.W., Wheatly, M.G., 1981. The Effect of Long-Term Aerial Exposure on Heart Rate, Ventilation, Respiratory Gas Exchange and Acid-Base Status in the Crayfish *Austropotamobius Pallipes*. J. Exp. Biol. 92, 109–124. <https://doi.org/10.1242/jeb.92.1.109>
- Taylor, H., Taylor, E., 1992. Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 10. Decapod Crustacea. Decapod Crustac. 10, 203–293.
- Taylor, M., Ravilious, C., Green, E.P., 2003. Mangroves of east Africa. UNEP World Conserv. Monit. Cent. 1–24.
- Teal, J.M., 1959. Respiration of Crabs in Georgia Salt Marshes and Its Relation to Their Ecology. Physiol. Zool. 32, 1–14. <https://doi.org/10.1086/physzool.32.1.30152287>

- Teets, N.M., Denlinger, D.L., 2013. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiol. Entomol.* 38, 105–116. <https://doi.org/10.1111/phen.12019>
- Teysse re, A., Regard, R., Mouquet, N., 2010. Les services écosystémiques , notion clé pour explorer et préserver le fonctionnement des (socio)  cosyst mes 1–6.
- Theodorakis, C.W., Gordon Blaylock, B., Shugart, L.R., 1997. Genetic ecotoxicology I: DNA integrity and reproduction in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology* 6, 205–218. <https://doi.org/10.1023/A:1018674727022>
- Theuerkauff, D., 2019. Effets des rejets d’eaux usées domestiques sur la physiologie et l’écologie des crabes de mangrove, Sesamidae et Ocypodidae, <http://www.theses.fr. Montpellier>.
- Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Lambert, S., Mercky, Y., Lejeune, M., Lignot, J.H., Sucré, E., 2020. Wastewater bioremediation by mangrove ecosystems impacts crab ecophysiology: In-situ caging experiment. *Aquat. Toxicol.* 218, 105358. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105358>
- Theuerkauff, D., Rivera-Ingraham, G.A., Mercky, Y., Lejeune, M., Lignot, J.H., Sucr , E., 2018a. Effects of domestic effluent discharges on mangrove crab physiology: Integrated energetic, osmoregulatory and redox balances of a key engineer species. *Aquat. Toxicol.* 196, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.003>
- Theuerkauff, D., Rivera-ingraham, G.A., Roques, J.A.C., Bertini, M., Lejeune, M., Farcy, E., Lignot, J., 2018b. Salinity Variation in a Mangrove Ecosystem : A Physiological Investigation to Assess Potential Consequences of Salinity Disturbances on Mangrove Crabs. *Zool. Stud.* 57, 1–16. <https://doi.org/10.6620/ZS.2018.57-36>
- Thomas, N., Lucas, R., Bunting, P., Hardy, A., Rosenqvist, A., Simard, M., 1996. Distribution and drivers of global mangrove forest change, 1996–2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179302>
- Thongo, A., 2016. Les mangroves   Mayotte. Etat des lieux et enjeux de gestion. 1–47.
- Tlili, S., Mouneyrac, C., 2021. New challenges of marine ecotoxicology in a global change context. *Mar. Pollut. Bull.* 166. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112242>
- Tomlinson, P.B., 1986. *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139946575>
- Towle, D.W., 1984. Regulatory Functions of Na⁺+K⁺-ATPase in Marine and Estuarine Animals. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 157–170. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45574-2_10
- Tracy, C.R., 1988. Some New Directions for Animal Ecological Physiology-Five Views: Wisdom and Ideas from Physiologists. *Ecology* 69, 1642–1643.
- Untersee, S., Pechenik, J.A., 2007. Local adaptation and maternal effects in two species of marine gastropod (genus *Crepidula*) that differ in dispersal potential. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 347, 79–85. <https://doi.org/10.3354/meps07063>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Vianna, B. da S., Miyai, C.A., Augusto, A., Costa, T.M., 2020. Effects of temperature increase on the physiology and behavior of fiddler crabs. *Physiol. Behav.* 215, 112765. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112765>
- Vinagre, S., Silva, S.M.D.A., 1992. Effets of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 102, 579–583.

- Vogt, G., 2019. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *J. Morphol.* 280, 1405–1444. <https://doi.org/10.1002/jmor.21040>
- Vogt, G., 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* 114, 83–101. <https://doi.org/10.1007/BF00396642>
- Vogt, G., 1993. Differentiation of B-cells in the Hepatopancreas of the Prawn *Penaeus monodon*. *Acta Zool.* 74, 51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1993.tb01220.x>
- von Raben, K., 1934. Veränderungen im Kiemendeckel und in den Kiemen einiger Brachyuren (Decapoden) im Verlauf der Anpassung an die Feuchtluftatmung. Verlag nicht ermittelbar.
- Waller, D.M., 2010. Retour à la vraie nature. *Ecol. Polit.* N°39, 147. <https://doi.org/10.3917/ecopo.039.0147>
- Wang, M., Zhang, J., Tu, Z., Gao, X., Wang, W., 2010. Maintenance of estuarine water quality by mangroves occurs during flood periods: A case study of a subtropical mangrove wetland. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 2154–2160. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.025>
- Wear, R.J., Tanner, J.E., 2007. Spatio-temporal variability in faunal assemblages surrounding the discharge of secondary treated sewage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.03.008>
- Weihrauch, D., Becker, W., Postel, U., Luck-Kopp, S., Siebers, D., 1999. Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. *J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 169, 25–37. <https://doi.org/10.1007/s003600050190>
- Weihrauch, D., Becker, W., Postel, U., Riestenpatt, S., Siebers, D., 1998. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 168, 364–376. <https://doi.org/10.1007/s003600050156>
- Weihrauch, D., Morris, S., Towle, D.W., 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491–4504. <https://doi.org/10.1242/jeb.01308>
- Weihrauch, D., O'Donnell, M., 2017. Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates, Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39617-0>
- Weihrauch, D., O'Donnell, M.J., 2015. Links between osmoregulation and nitrogen-excretion in insects and crustaceans. *Integr. Comp. Biol.* 55, 816–829. <https://doi.org/10.1093/icb/icv013>
- Weis, J.S., 2015. Some physiological responses of crustaceans to toxicants. *Nat. Hist. Crustac.* 4, 477–504.
- Weis, J.S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P., 2001. Effects of contaminants on behavior: Biochemical mechanisms and ecological consequences. *Bioscience* 51, 209–217. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0209:EOCOBB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0209:EOCOBB]2.0.CO;2)
- Weis, J.S., Weis, P., 2004. Behavior of four species of fiddler crabs, genus *Uca*, in southeast Sulawesi, Indonesia. *Hydrobiologia* 523, 47–58. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000033093.84155.1d>
- Whitfield, J., 2004. Ecology's big, hot idea. *PLoS Biol.* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020440>
- Wickel, J., Jamon, A., Pinault, M., Durville, P., Wickel, J., Jamon, A., Pinault, M., Durville, P., Chabanet, P., 2016. Composition et structure des peuplements ichthyologiques marins de l'île de Mayotte (sud-ouest de l'océan Indien)
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., Shipin, O. V.,

2009. Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol. Eng.* 35, 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.021>
- Wiegand, G., Remington, S.J., 1986. Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.15.060186.000525>
- Wildsmith, M.D., Rose, T.H., Potter, I.C., Warwick, R.M., Clarke, K.R., Valesini, F.J., 2009. Changes in the benthic macroinvertebrate fauna of a large microtidal estuary following extreme modifications aimed at reducing eutrophication. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1250–1262. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.008>
- Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., Lan, C.Y., 1997. Mangrove wetlands as wastewater treatment facility: A field trial. *Hydrobiologia* 352, 49–59. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5234-1_6
- Xiang, H., Li, K., Cao, L., Zhang, Z., Yang, H., 2020. Impacts of pollution, sex, and tide on the time allocations to behaviours of *Uca arcuata* in mangroves. *Sci. Total Environ.* 742, 140609. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140609>
- Yachi, S., Loreau, M., 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1463–1468. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1463>
- Zhang, K., Liu, H., Li, Y., Xu, H., Shen, J., Rhome, J., Smith, T.J., 2012. The role of mangroves in attenuating storm surges. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 102–103, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.021>
- Zimmerman, C., Cuddington, K., 2007. Ambiguous, circular and polysemous: Students' definitions of the “balance of nature” metaphor. *Public Underst. Sci.* 16, 393–406. <https://doi.org/10.1177/0963662505063022>
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* 94, 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

Résumé

Parmi les phénomènes d'origine anthropique impactant les écosystèmes de mangrove, l'apport d'éléments nutritifs issus des eaux usées domestiques est souvent associé à une meilleure productivité végétale. D'autres compartiments du système sont pourtant parfois négativement impactés, notamment la macrofaune benthique dont les représentants sont souvent considérés comme des espèces ingénieurs de l'écosystème. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à étudier les réponses écophysiologicals de trois espèces de crabes de mangroves présents dans le Canal du Mozambique, exposés aux apports d'eau usée domestique ou à de l'ammonium, étudié en tant que potentiel proxy d'enrichissement azoté. Différents marqueurs physiologiques et comportementaux ont été mis en place pour répondre à trois objectifs s'appuyant sur des niveaux intégratifs et des échelles spatiales différentes. Dans une première partie, nous avons cherché à compléter les connaissances sur les réponses physiologiques d'une espèce de crabe, *Neosarmatium africanum*, Sesamidae occupant la partie haute de la mangrove, parfois directement exposée aux apports d'effluents domestiques sur l'un site d'étude (mangrove de Malamani, Mayotte) en nous focalisant sur un organe métabolique majeur, l'hépatopancréas. Dans une deuxième partie, nous avons cherché à mieux comprendre quelles potentielles réponses physiologiques et comportementales à l'échelle individuelle pouvaient être impliquées dans la modification des communautés de crabes observées dans des zones régulièrement impactées par l'apport d'eau usée domestique. Nous avons pour cela étudié une espèce de crabe violoniste, *Paraleptuca chlorophthalmus*, Ocypodidae, dont l'abondance diminue drastiquement sur les zones impactées de la mangrove de Malamani. Nos résultats montrent des réponses à court terme (explosion de la consommation d'oxygène, comportement de fuite et d'émersion) qui pourraient devenir délétères lors d'expositions ponctuelles mais chroniques, comme c'est souvent le cas dans le milieu naturel. Enfin, nous avons cherché à comprendre s'il existait une vulnérabilité différentielle face à des variations de salinités et des apports d'éléments nutritifs (ammonium) sur deux espèces de crabes violonistes génétiquement proches mais vivant dans des conditions environnementales opposées : mangrove de Malamani à Mayotte considéré comme écosystème anthropisé et la mangrove d'Europa (îles Eparses, Sud du Canal du Mozambique) considérée comme écosystème pristine. Les résultats indiquent que les crabes de Mayotte, régulièrement exposés à l'eau douce et aux effluents domestiques, semblent plus tolérants aux variations de salinité et développent des acclimations physiologiques face à l'exposition à l'ammonium, ce que les crabes d'Europa ne développent pas. L'ensemble des résultats renforce d'une part les connaissances sur la physiologie de ces ingénieurs de l'écosystème, mais permettent également de mieux lier les réponses individuelles obtenues en laboratoire, à celles observées à l'échelle des populations ou des communautés en milieu naturel. Ils encouragent la mise en place d'études concernant le suivi des écosystèmes de mangroves du Canal du Mozambique à travers l'étude d'espèces potentiellement bioindicatrices et permettent de proposer une approche écophysiological dans le domaine du suivi et de la conservation des milieux naturels.

Mots-clés : Ecophysiology – Mangroves – Crabes – Eau usée – Ammonium – Biomarqueurs – Espèce ingénieur

Abstract

Among the anthropogenic pressures that impact mangrove ecosystems, nutrient inputs from domestic wastewater are often associated with increased plant productivity. However, other compartments of the ecosystem are sometimes negatively impacted, in particular the benthic macrofauna, whose representatives are often considered to be ecosystem engineers. The aim of this study is to analyse the ecophysiological responses of three mangrove crabs living in mangrove forests located in the Mozambique Channel that are typically exposed to domestic wastewater inputs or ammonia-N. These responses could represent potential proxies for nitrogen enrichment. Different physiological and behavioural markers were considered to meet three objectives based on different integrative levels and spatial scales. Firstly, we sought to improve our knowledge on the physiological responses of a crab species, *Neosarmatium africanum*, Sesamidae generally occupying the upper part of the mangrove that is directly exposed to domestic effluent inputs in one of our study sites (Malamani mangrove, Mayotte). The focus was mostly on a major metabolic organ, the hepatopancreas. Secondly, we sought to better understand what potential physiological and behavioural responses at the individual scale could be involved in crab community changes observed in areas regularly impacted by domestic wastewater. A fiddler crab species, *Paraleptuca chlorophthalmus*, Ocypodidae) was studied. For this species abundance is drastically decreased in the wastewater impacted areas of Malamani study site. Short-term responses were obtained: burst of oxygen consumption, escape and emersion behaviour). These effects could become deleterious during acute and/or chronic exposures, as it is often the case in the natural environment. Finally, we sought to understand whether differential vulnerability to salinity variations and increased nutrient inputs (ammonia-N) could occur for two fiddler crab species. These species are genetically related but live in opposite environmental conditions: in anthropized mangrove ecosystem in Mayotte and in a pristine ecosystem (Europa Island located in the southern part of the Mozambique Channel). Data obtained indicate that crabs regularly exposed to freshwater and domestic effluents in Mayotte are more tolerant to salinity variations and develop key physiological acclimatory processes to ammonia-N exposure compared to crabs from the pristine site (Europa). Altogether, this study strengthens our knowledge regarding the physiology of these ecosystem engineers, but also allows us to better link individual responses obtained in laboratory conditions to those observed at the population or community level in the natural environment. This study is paving the way for complementary studies concerning the monitoring of mangrove ecosystems in the Mozambique Channel using potential bioindicator species, and emphasizes the need to consider ecophysiological analyses in the field of monitoring and conservation of natural environments.

Keywords: Ecophysiology – Mangrove forests – Crabs – Wastewater – Ammonia-N – Biomarkers – Engineer species