



**HAL**  
open science

# Microbiote des Echinodermes : spécificité et plasticité des microbiotes chez *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea)

Hélène Laguerre

## ► To cite this version:

Hélène Laguerre. Microbiote des Echinodermes : spécificité et plasticité des microbiotes chez *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0111 . tel-03894365

**HAL Id: tel-03894365**

**<https://theses.hal.science/tel-03894365>**

Submitted on 12 Dec 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.

# THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 598

*Sciences de la Mer et du littoral*

Spécialité : « Microbiologie »

Par

**Hélène LAGUERRE**

**Microbiote des Echinodermes :  
Spécificité et plasticité des microbiotes chez *Holothuria forskali*  
(Echinodermata, Holothuroidea)**

Thèse présentée et soutenue à Quimper, le 17 décembre 2021

Unité de recherche : Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines EA 3884, Université de Bretagne Occidentale

## Rapporteurs avant soutenance :

Didier BOUCHON  
Professeur des Universités, Université de Poitiers

Christian JEANTHON  
Directeur de Recherche CNRS, CNRS – Station  
Biologique de Roscoff

## Composition du Jury :

Nadia AMEZIANE | Présidente du Jury, examinatrice  
Professeure, MNHN, Station Marine de Concarneau

Dominique HERVIO-HEATH | Examinatrice  
Chargée de Recherche, IFREMER Brest

Didier BOUCHON | Rapporteur  
Professeur des Universités, Université de Poitiers

Christian JEANTHON | Rapporteur  
Directeur de Recherche CNRS, CNRS Station Biologique de Roscoff

Yannick FLEURY | Directeur de thèse  
Maître de Conférences HDR, Université de Bretagne Occidentale

Patrick LE CHEVALIER | Co-directeur de thèse  
Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale





*« Plus vite, plus haut, plus fort »*

Pierre de Coubertin, 1894





## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mes travaux : Didier Bouchon (Professeur à l'Université de Poitiers et rapporteur), Christian Jeanthon (Directeur de Recherche CNRS et rapporteur), Nadia Améziane (Professeure au Muséum National d'Histoire Naturelle et examinatrice) et Dominique Hervio Heath (Chargée de Recherche Ifremer et examinatrice).

Je remercie ensuite mon directeur de thèse, Yannick Fleury, et mon co-directeur de thèse, Patrick Le Chevalier pour leur encadrement.

Merci aux financeurs de ce projet : Quimper Bretagne Occidentale, l'Université de Bretagne Occidentale et le Fond Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche.

Je remercie également les membres de mon Comité de Suivi Individuel de thèse, à savoir Stéphane Reynaud et Lois Maignien, pour leurs précieux conseils, leur écoute et leur bienveillance.



Et voici la fin du nouveau challenge, après 3 ans d'une vie palpitante d'apprentie chercheuse ! Et bien, ça passe beaucoup trop vite !!! Après 10 années passées en tant que responsable de projets R&D en aquaculture, me voilà donc, « fraîchement » débarquée au LBCM en décembre 2018, pour réaliser un nouveau challenge mais aussi, il faut bien se l'avouer, un rêve d'enfant. Des bassins d'eau de mer aux paillasses, toute une équipe m'a accueillie et accompagnée dans cette transition et ce changement de métier.

Tout d'abord, un binôme improbable, mon directeur de thèse Yannick Fleury, et mon co-directeur de thèse, Patrick Le Chevalier. Nous nous connaissions déjà, dans le cadre de projets communs lorsque j'étais en poste à Agrocampus Ouest. Le feeling était passé, enfin je crois, et cela m'a amené jusqu'ici !!! Merci à vous 2 de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné ma chance !

Yannick, chef, patron, merci à toi d'avoir supporté (ou subi...) mes délires, mes excentricités et ma fougue ! Merci pour tes conseils, le temps passé à relire les papiers, et les débriefs version pauses clopes sur la terrasse « on fume ? ». J'ai beaucoup appris à tes côtés, la rigueur, l'envie de bien faire, et c'est essentiel et palpitant !

Patrick, dit Jazon, dit PLC (etc...), je suis contente de t'avoir rencontré, car j'ai trouvé quelqu'un qui, comme moi, possède plusieurs personnes dans sa tête !!! Délires scientifiques, délires de jardiniers (séance de formation au bûcheronnage à l'IUT...), tu m'as laissé explorer des pistes de recherche en liberté, tu m'as tout appris de la microbiologie classique, donc le « mustang » (version P-51 D) te remercie !!!!

Ensuite, merci à Camille, mon binôme sur les références pourries des années 80, avec qui nous avons passé des moments épiques (salto arrière dans le bureau, batailles dans le bureau, paroles de chansons...) et Benj, merci pour ta bonne humeur, les gâteaux (surtout les financiers, je dis ça, je dis rien...) et les séances de charriage !!!

Maintenant, ma petite sœur de thèse, Héléna, tu vas vraiment me manquer !!! On s'est vu, on s'est plu ! Pourtant, ce n'était pas gagné d'avance !!! Avec toi, nous avons formé les « 2 H », les « 2 fléaux », les « 2 tornades », bref, le binôme de la mort !!! Je suis ravie de t'avoir rencontrée, tu es devenue une amie, et j'espère qu'on aura l'occasion de se revoir souvent !

Ensuite, Clément, vieille histoire, je t'ai connu tout jeune, et maintenant, tu regardes Arte... Comme on se retrouve ! Merci pour les chamailleries, les crasses mutuelles qu'on s'est faites, que de fous rires !!! J'avais l'impression d'avoir eu un cousin au labo !!! Je sais qu'on va continuer de se voir, alors je suis moins triste.

Leïla, princesse du LBCM, merci pour nos bons moments passés ensemble, autour des discussions sur l'amour est dans le pré et des fringues !!! Et désolé pour les blagues avec le serpent et le rat, qui ont provoqué des surdités chez les collègues avec les « Hiiiiiiiiiiiiii », j'en rigole encore !

Et sans oublier, Claire (je ne donne pas son nom, c'est confidentiel), Baptiste (uiiiiiii), Garance (du Marais), Fanny (team concombre), avec qui j'ai partagé de grands moments : parties de pétanque tout terrain, batailles de nerf et de pistolet à eau, lancer de châtaignes (avec les bogues, si si, ça fait mal, mais comme on dit : « no pain, no game » !) et j'en oublie sûrement... Bref, un sacré comité des fêtes !

Merci aussi aux stagiaires qui m'ont accompagnée durant ma thèse: Marion, Pauline, Rachel et Kirian.

Et les dernier membres du LBCM (et non pas des moindres) : le bananier (adjoint du chef), Michel le concombre de mer, Momo le homard et les crevettes de l'aquarium, autres eucaryotes importants du labo.



Et sur le site de l'IUT de Quimper, on croise plein de collègues très sympathiques, avec qui j'ai partagé de bons moments de convivialité.

Les LUBEMiens, mes voisins du bâtiment G, à l'aile opposée mais bien sympathiques, et plus spécialement, Yvan, merci pour nos discussions passionnées autour du kayak. J'ai hâte de reprendre les longues heures de défoulage à la rame et pagaie après la soutenance !!!

Les LAB-STICCIens, mes collègues de la rive gauche du bâtiment G, Roua, El Houssaïn et Pierre avec qui nous avons beaucoup échangé : Roua, et nos missions « anti-effraction », El Houssaïn, la gentillesse même, et Pierre, l'amoureux de Concarneau comme moi !

Et aussi les collègues de l'IUT, merci pour leur bonne humeur : Estelle & Denis, Mehdi, Stéphane & Philippe, Brigitte et Gaëtan.

Merci à Christian Miquel et Cyril Noël pour les conseils en bioinformatique.

Et dans ma vie professionnelle antérieure, je tiens à remercier mes 2 anciennes directrices, Christine et Catherine, qui m'ont toujours accompagnée et soutenue dans mes choix professionnels.



Pour finir, je voudrais remercier ma famille, tout d'abord Mike, mon compagnon, Anaïs, ma fille (ti poussin d'amour, qui a fait le beau dessin de concombre de mer) et mon chien Milou, qui m'ont supportée (oh que oui) pendant la rédaction de la thèse. Je vous aime.

Merci à mes parents qui ont toujours cru en moi et ont fait de moi ce que je suis, et à toute ma famille. Une pensée particulière pour ma mamie qui aurait été fière et qui aurait sûrement écoulé tout un stock de kleenex.

Et ma deuxième famille, mes copines de l'aviron, tout spécialement ma « grande sœur de cœur » Sylvie, Fanfan, Valérie, Gene et Catherine. Après le 17 décembre, c'est reparti à fond et on donne tout !!!



Et maintenant, un nouveau challenge ?

Comme disait Freddy Mercury : *" You can be anything you want to be, just turn yourself into anything you think that you could ever be "*. The show must go on....



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
1. INTRODUCTION GENERALE	21
1.1 DES CONCEPTS CLES POUR LA COMPREHENSION DES RELATIONS HOTE – MICROBIOTE - ENVIRONNEMENT	21
1.1.1 HOLOBIONTE ET THÉORIE DE L’HOLOGÉNOME	21
1.1.2 LE MICROBIOME	22
1.1.3 MICROBIOTE : UN OU DES MICROBIOTES	23
DEFINITIONS ET GENERALITES	23
TRANSMISSIONS	24
DE L’EQUILIBRE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DU MICROBIOTE A LA DYSBIOSE	24
DEFINIR UN « CORE MICROBIOTE »	25
LES TECHNIQUES D’ANALYSE DU MICROBIOTE : AVANCEES ET LIMITES	28
1.2 LE MICROBIOTE DES « INVERTEBRES MARINS »	31
1.2.1 DIVERSITÉ DES MODÈLES D’ÉTUDE CHEZ LES INVERTÉBRÉS MARINS	31
1.2.2 FACTEURS INFLUENÇANT LES MICROBIOTES DES INVERTÉBRÉS MARINS	32
1.2.3 EXPLORATION DU MICROBIOTE DES INVERTÉBRÉS MARINS AU REGARD DES NGS	33
UN MICROBIOTE SPECIFIQUE DE L’HOTE	33
UNE COMPARTIMENTATION DES MICROBIOTES	35
CONTRIBUTION DE L’HABITAT A LA SELECTION DU MICROBIOTE DE L’HOTE	36
DYNAMIQUE TEMPORELLE DES MICROBIOTES	37
EVOLUTION ET TRANSMISSION DU MICROBIOTE AU COURS DU CYCLE DE VIE	38
EFFET DU REGIME ALIMENTAIRE SUR LE MICROBIOTE GASTRO-INTESTINAL	39
PATHOLOGIE ET CONSEQUENCES SUR LE MICROBIOTE	39
IMPACT DES PRESSIONS ANTHROPIQUES SUR LES MICROBIOTES	41
DES ASSOCIATIONS FONCTIONNELLES CHEZ LES INVERTEBRES MARINS	42
1.3 DU MICROBIOTE A L’HOTE HOLOTHURIE	43
1.3.1 LE PHYLUM DES ÉCHINODERMES	43
CLASSIFICATION	43
BIOLOGIE ET MORPHOLOGIE DES ECHINODERMES	44
LES HOLOTHURIES : DES ANIMAUX TRES CONVOITES	45
L’HOLOTHURICULTURE	46
1.3.2 HOLOTHURIA FORSKALI, UNE NOUVELLE ESPÈCE D’INTÉRÊT POUR L’AQUACULTURE ET LES BIOTECHNOLOGIES	48
1.3.3 LES MICROBIOTES DES HOLOTHURIES	49
GENERALITES	49
MICROBIOTE GASTRO-INTESTINAL	49
MICROBIOTE CÉLOMIQUE	51
UN MICROBIOTE SOURCE DE SOUCHES PROBIOTIQUES	51
1.4. OBJECTIFS DE LA THESE	52
1.4.1 OBJECTIFS	52

<b>1.4.2 MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE.....</b>	<b>53</b>
<b>1.4.3 LE PROJET HOLOFARM .....</b>	<b>53</b>
<b>2. CHAPITRE 1 : SPECIFICITE DU MICROBIOTE CŒLOMIQUE DE TROIS ECHINODERMES : LE CONCOMBRE DE MER <i>HOLOTHURIA FORSKALI</i>, L'ÉTOILE DE MER <i>MARTHASTERIAS GLACIALIS</i>, ET L'OURSIN <i>SPHAERECHINUS GRANULARIS</i></b>	<b>57</b>
<hr/>	
<b>2.1 PREAMBULE</b>	<b>57</b>
<b>2.1.1 LE LIQUIDE CŒLOMIQUE, UN COMPARTIMENT CLÉ POUR L'IMMUNITÉ DE L'HÔTE .....</b>	<b>57</b>
<b>2.2 PUBLICATION 1 (SOUmise AEM): PLASTICITY AND SPECIFICITY OF THE CŒLOMIC MICROBIOTA AMONG THREE ECHINODERMS: THE SEA CUCUMBER <i>HOLOTHURIA FORSKALI</i>, THE SEA STAR <i>MARTHASTERIAS GLACIALIS</i>, AND THE SEA URCHIN <i>SPHAERECHINUS GRANULARIS</i></b>	<b>59</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>59</b>
<b>IMPORTANCE.....</b>	<b>60</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>60</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>62</b>
SEQUENCING INFORMATION AND QUALITY CONTROL .....	62
COMMUNITY COMPOSITION OF THE CŒLOMIC MICROBIOTA .....	62
ALPHA-DIVERSITY.....	64
BETA DIVERSITY ANALYSIS .....	66
SPECIFIC OTUS .....	67
FROM SPECIFICITY TO A COMMON CORE MICROBIOTA AMONG ECHINODERMS .....	68
ENUMERATION OF CULTURABLE MICROBIOTA.....	69
SCREENING FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY IN CULTURABLE STRAINS.....	69
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>73</b>
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>73</b>
SAMPLE COLLECTION.....	73
ANALYSIS OF CŒLOMIC MICROBIOTA USING 16S METABARCODING.....	74
ANALYSIS OF CŒLOMIC MICROBIOTA WITH CULTURABLE APPROACHES.....	75
<b>REFERENCES .....</b>	<b>77</b>
<b>SUPPLEMENTARY MATERIALS.....</b>	<b>84</b>
<b>2.3 CONCLUSION DU CHAPITRE ET PERSPECTIVES</b>	<b>86</b>
<b>3. CHAPITRE 2 : ETUDE DES MICROBIOTES ANATOMIQUES DE <i>H. FORSKALI</i></b>	<b>89</b>
<hr/>	
<b>3.1 PREAMBULE</b>	<b>89</b>
<b>3.2 PUBLICATION 2 (DRAFT): MULTISCALE ANALYSIS OF THE SEA-CUCUMBER <i>H. FORSKALI</i> MICROBIOTA EXHIBITED AN ANATOMICAL-SPECIFIC MICROBIOTA AND SPATIOTEMPORAL VARIATIONS</b>	<b>90</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>90</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>91</b>
<b>MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>92</b>

ANIMAL COLLECTION.....	92
RECOVERY OF BIOLOGICAL FRACTIONS.....	93
MICROBIOTA ANALYSES WITH METABARCODING 16S.....	93
<b>RESULTS.....</b>	<b>94</b>
DATA DESCRIPTION AND PREPROCESS ON SEQUENCING DATA.....	94
ALPHA-DIVERSITY.....	95
BETA-DIVERSITY.....	96
COMPOSITION OF BACTERIAL COMMUNITIES OF THE THREE ANATOMICAL MICROBIOTA OF <i>H. FORSKALI</i> AND THE ENVIRONMENT.....	97
ANATOMICAL-ASSOCIATED CORE MICROBIOTA.....	98
ANATOMICAL-SPECIFIC MICROBIOTA.....	99
DIFFERENTIAL ABUNDANCE ANALYSIS.....	100
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>101</b>
BACTERIAL ASSEMBLAGES LINKED TO ANATOMICAL MICROBIOTA AND TEMPORALLY-VARIABLE.....	101
A GASTRO-INTESTINAL MICROBIOTA HIGHLY DIVERSE, REVEALING THE FEEDING BEHAVIOUR OF THE HOST.....	101
A SKIN MICROBIOTA MIRROR OF ITS ENVIRONMENT.....	102
THE COELOMIC FLUID, THE KEY COMPARTMENT IN ECHINODERMS.....	102
FROM BACTERIAL COMPOSITION TO CORE SPECIFIC MICROBIOTA, ASSOCIATED TO ANATOMICAL COMPARTMENT. ...	103
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>104</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>105</b>
<b>SUPPLEMENTARY MATERIALS.....</b>	<b>112</b>
<b>3.3 CONCLUSION DU CHAPITRE ET PERSPECTIVES</b>	<b>118</b>
<b>4. CHAPITRE 3 : EVOLUTION DU MICROBIOTE DE <i>H. FORSKALI</i> AU COURS DE SON CYCLE DE VIE</b>	<b>121</b>
<hr/>	
<b>4.1 PREAMBULE</b>	<b>121</b>
<b>4.2 PUBLICATION 3 (DRAFT): MICROBIOTA IN AQUACULTURE: DIVERSITY, TRANSMISSION AND PLASTICITY OF THE MICROBIOTA AMONG THE LIFE CYCLE OF THE SEA CUCUMBER <i>H. FORSKALI</i> (ECHINODERMATA, HOLOTHUROIDEA)</b>	<b>122</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>122</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>123</b>
<b>MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>124</b>
SAMPLING COLLECTION AND PREPARATION.....	124
DNA EXTRACTION AND SEQUENCING.....	125
PRE-PROCESSING ON MICROBIOTA DATA.....	125
STATISTICAL ANALYSIS.....	125
<b>RESULTS.....</b>	<b>127</b>
SEQUENCING RESULTS.....	127
ALPHA-DIVERSITY ANALYSIS.....	127
BETA-DIVERSITY.....	128
COMPOSITION OF BACTERIAL COMMUNITIES.....	129
DIFFERENTIAL ABUNDANCE ANALYSIS ON FIRST STAGES.....	131
A TEMPORAL CORE MICROBIOTA ASSOCIATED WITH A LIFE STAGE.....	132
HORIZONTAL AND VERTICAL TRANSMISSION: SHARED OTUS.....	132



EFFECT OF CAPTIVITY IN THE COMPOSITION OF BROODSTOCK MICROBIOTA .....	133
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>135</b>
A DIVERSE AND DISTINCT MICROBIOTA, FROM THE EMBRYOS TO THE BROODSTOCK .....	135
HORIZONTAL AND VERTICAL TRANSFER .....	135
SPECIALIZATION OF THE MICROBIOTA CORRELATED WITH THE LIFE CYCLE .....	136
THE CAPTIVITY INFLUENCED THE COELOMIC MICROBIOTA OF <i>H. FORSKALI</i> .....	136
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>137</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>138</b>
<b>SUPPLEMENTARY MATERIALS.....</b>	<b>144</b>
4.3 CONCLUSION DU CHAPITRE ET PERSPECTIVES .....	149
5. CHAPITRE 4 : IMPACT DU REGIME ALIMENTAIRE SUR LES PERFORMANCES DE CROISSANCE ET LE MICROBIOTE GASTRO-INTESTINAL DE JUVENILES DE <i>H. FORSKALI</i> EN MILIEU CONTROLE .....	153
<hr/>	
5.1 PREAMBULE .....	153
5.2 PUBLICATION 4 (DRAFT): IMPACT OF DETRITAL FEEDING REGIMES WITH GREEN ALGAE ON GROWTH PERFORMANCE AND MICROBIOTA DIVERSITY IN JUVENILES OF <i>H. FORSKALI</i> (ECHINODERMATA, HOLOTHUROIDEA) .....	154
<b>SUMMARY .....</b>	<b>154</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>155</b>
<b>MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>156</b>
JUVENILES EXPERIMENTS.....	156
MICROBIOTA ANALYSIS.....	157
<b>RESULTS.....</b>	<b>159</b>
FEEDING BEHAVIOUR AND GROWTH PERFORMANCE .....	159
DIVERSITY ANALYSIS OF THE WHOLE-BODY MICROBIOTA OF THE JUVENILES.....	160
COMPOSITION OF THE MICROBIAL COMMUNITIES OF THE SAMPLES .....	163
CORRELATION ANALYSIS.....	164
ENRICHMENT ANALYSIS OF GENUS ACCORDING TO THE FEEDING REGIME.....	165
SPECIFICITIES OF THE MICROBIOTA LINKED TO THEIR FEEDING REGIME.....	166
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>167</b>
A DETRITIVOROUS-BASED FEEDING REGIME FOR THE JUVENILES OF <i>H. FORSKALI</i> .....	167
DISTINCT MICROBIAL COMPOSITIONS .....	167
A MICROBIOTA DIVERSITY LINKED WITH THE FEEDING REGIME .....	167
HORIZONTAL TRANSFER OF MICROBIOTA FROM FOOD .....	168
<b>REFERENCES .....</b>	<b>169</b>
<b>SUPPLEMENTARY MATERIALS.....</b>	<b>174</b>
5.3 CONCLUSION DU CHAPITRE ET PERSPECTIVES .....	178
6. CHAPITRE 5 : COMPOSITION DU MICROBIOTE DE <i>H. FORSKALI</i> PRESENTANT DES SYMPTOMES APPARENTES AU SKUD (SKIN ULCERATION DISEASE) .....	181
<hr/>	

6.1 PREAMBULE	181
6.2 PUBLICATION 5 (DRAFT): MICROBIOTA COMPOSITION OF <i>HOLUTHURIA FORSKALI</i> (ECHINODERMATA: HOLOTHUROIDEA) EXHIBITING SIGNS OF SKIN ULCERATION	182
<b>SUMMARY</b> .....	<b>182</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>183</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>184</b>
SAMPLES COLLECTION .....	184
GENOMIC DNA EXTRACTION AND SEQUENCING.....	185
PRE-PROCESSING ON SEQUENCING DATA .....	185
STATISTICAL ANALYSIS .....	186
<b>RESULTS</b> .....	<b>187</b>
SEQUENCING RESULTS .....	187
DIVERSITY ANALYSIS.....	187
MICROBIAL COMPOSITION OF HEALTHY AND SICK MICROBIOTA IN <i>H. FORSKALI</i> .....	189
BIOMARKER ANALYSIS .....	190
SHARED OTUS BETWEEN MICROBIOTA OF SICK ANIMALS.....	191
PRESENCE AND ABUNDANCE OF POTENTIAL PATHOGENIC BACTERIA.....	192
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>194</b>
THE SKIN ULCERATION SYNDROME DISEASE (SKUD) COULD AFFECT <i>H. FORSKALI</i> .....	194
THE DISEASE INFLUENCED THE COELOMIC AND SKIN MICROBIOTA OF SICK SEA-CUCUMBER .....	194
MICROBIOTA DYSBIOSIS AND DEVELOPMENT OF OVER-ABUNDANT OPPORTUNISTIC TAXA.....	195
<i>TENACIBACULUM SP.</i> AS POTENTIAL MAIN CAUSING AGENT OF THE SKUD IN <i>H. FORSKALI</i> .....	195
THE 16S METABARCODING AS TOOL FOR EMERGENT PATHOGEN DETECTION .....	196
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>196</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>197</b>
<b>SUPPLEMENTARY MATERIALS</b> .....	<b>204</b>
6.3 CONCLUSION DU CHAPITRE ET PERSPECTIVES	209
7. CHAPITRE 6 : ETUDE DU MICROBIOTE CULTIVABLE	213
7.1 PARTIE 1 : SUIVI DES CONCENTRATIONS EN MICROBIOTE CULTIVABLE CHEZ L'HOTE <i>H. FORSKALI</i> DANS LE MILIEU NATUREL	213
7.1.1 INTRODUCTION .....	213
7.1.2 MATERIEL ET METHODES.....	214
SITE DE PRELEVEMENT ET COLLECTE DES ANIMAUX EN MILIEU NATUREL .....	214
PRELEVEMENT DES FRACTIONS BIOLOGIQUES .....	216
MISE EN CULTURE ET DENOMBREMENT DU MICROBIOTE CULTIVABLE .....	217
ANALYSES STATISTIQUES .....	217
7.1.3 RESULTATS.....	219
COMPARAISONS INTRA-ANATOMIQUES DES MICROBIOTES CULTIVABLES DE <i>H. FORSKALI</i> .....	219
ETUDE DES VARIATIONS SPATIO-TEMPORELLES DES MICROBIOTES CULTIVABLES .....	220
COMPARTIMENT ENVIRONNEMENTAL : SUIVI DES CONCENTRATIONS EN BACTERIES CULTIVABLES DE L'EAU DE MER	225

<b>7.2 PARTIE 2 : DU MICROBIOTE CULTIVABLE A LA SOUCHE, SELECTION DE SOUCHES D'INTERET BIOTECHNOLOGIQUE</b>	<b>227</b>
<b>7.2.1 INTRODUCTION</b>	<b>227</b>
<b>7.2.2 MATERIEL ET METHODES</b>	<b>228</b>
CREATION D'UNE SOUCHOTHEQUE A VOCATION AQUACOLE	228
CRIBLAGE D'ACTIVITES	228
ACTIVITE AGAROLYTIQUE	228
ACTIVITE PROTEOLYTIQUE	229
ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	229
DETECTION DE LA FLORE <i>VIBRIONACEAE</i>	230
IDENTIFICATION GENETIQUE DES SOUCHES PRESENTANT UNE ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	231
<b>7.2.3 RESULTATS</b>	<b>232</b>
COMPOSITION ET CRYOCONSERVATION DE LA SOUCHOTHEQUE	232
ACTIVITES D'INTERET BIOTECHNOLOGIQUE	232
IDENTIFICATION DE LA FLORE <i>VIBRIONACEAE</i>	235
IDENTIFICATION GENETIQUE DES SOUCHES ANTIBACTERIENNES	236
ACTIVITES GLOBALES DES SOUCHES ANTIBACTERIENNES SELECTIONNEES	238
<b>7.3 DISCUSSION</b>	<b>239</b>
DES CONCENTRATIONS VARIABLES EN MICROBIOTE CULTIVABLE	239
MICROBIOTE CUTANE CULTIVABLE	239
UN MICROBIOTE GASTRO-INTESTINAL CULTIVABLE VARIABLE ET RENFERMANT DES SOUCHES AGAROLYTIQUES	239
LE LIQUIDE CŒLOMIQUE CULTIVABLE	240
UN MICROBIOTE CULTIVABLE SOURCE DE CANDIDATS PROBIOTIQUES	241
<b>8. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>247</b>
EXISTENCE D'UN MICROBIOTE SPECIFIQUE CHEZ LES ECHINODERMES	247
UN MICROBIOTE COMPARTIMENTE ET SPECIALISE CHEZ LES ADULTES REPRODUCTEURS	248
ACQUISITION ET SPECIALISATION DU MICROBIOTE DES LES PREMIERS STADES DE VIE	251
PREVENIR L'EMERGENCE DE MALADIE CHEZ <i>H. FORSKALI</i>	251
DE LA PLASTICITE A LA RESILIENCE DES MICROBIOTES	251
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>253</b>
<b>VALORISATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>273</b>
<b>PUBLICATIONS</b>	<b>273</b>
<b>PRÉSENTATION ORALE</b>	<b>274</b>
<b>POSTERS</b>	<b>275</b>

## Liste des figures

Fig. 1 : Théorie de l'holobionte et l'hologénome (source : Theis et al. 2016) .....	22
Fig. 2 : Illustration du concept de Microbiome et de ses composantes (source : Berg et al. 2020).....	22
Fig. 3 : Nombre de séquences différentes observées chez les vertébrés et les invertébrés dans la littérature (Source : Petersen and Osvatic, 2018).....	23
Fig. 4 : Modification du microbiote humain en cas de maladie. A : principaux phyla constitutifs des microbiotes anatomiques. B : Dysbiose : effet de maladies sur le microbiote humain (source : Appanna 2018).....	25
Fig. 5 : Comparaison des technologies de séquençage de type Sanger (à gauche) et metabarcoding (à droite) (source : Corell et al. 2014) .....	28
Fig. 6 : Régions hypervariables (en rouge) et conservées (en bleu) de l'ADNr 16S et zones ciblées par les amorces et les différentes technologies de séquençage (Falentin et al., 2019). .....	30
Fig. 7 : Evolution du nombre d'études conduites sur le microbiote fécal par metabarcoding en fonction des hôtes animaux (source : Ando et al. 2020).....	31
Fig. 8 : Proportions d'études réalisées sur le microbiote des invertébrés marins avec les NGS, en fonction du phylum concerné. ....	32
Fig. 9 : Les facteurs influençant le microbiote des invertébrés marins, illustrés chez les bivalves. (Source : Paillard et al 2022) .....	33
Fig. 10 : Positionnement phylogénétique des Echinodermata dans le clade des Bilateria (Hirth, 2010).....	43
Fig. 11 : Classification phylogénétique la plus probable des 5 classes du phylum des Echinodermata (Vaughn et al., 2012).....	44
Fig. 12 : Anatomie générale interne d'une étoile de mer (Asteroidea). Légende traduite d'après Jackson et al. 2018. Code couleur : le système digestif est en vert et les organes reproducteurs en jaune et le système aquifère en gris. ....	44
Fig. 13 : Production mondiale d'holothuries, issues de la pêche et de l'aquaculture (d'après Purcell et al. 2013).....	46
Fig. 14 : Cycle de production des holothuries tropicales (modifié d'après FAO, 2009) .....	47
Fig. 15 : <i>Holothuria forskali</i> dans son habitat (photos : C. Jegou, LBCM) .....	48
Fig. 16 : Composition du microbiote gastro-intestinal antérieur (GCA) et postérieur (GCP) (source : Gao et al. 2014).....	50
Fig. 17 : Principe général du protocole d'échantillonnage et de traitement des données .....	53
Fig. 18 : Les 3 échinodermes de l'étude. A : l'holothurie <i>Holothuria forskali</i> . B : l'étoile de mer <i>Marthasterias glacialis</i> . C : l'oursin <i>Sphaerechinus granularis</i> . ....	57
Fig. 19 : Photos de coelomocytes. A : Amœbocyte sous forme pétaoloïde. B : Amœbocytes filopodial. C : Cellule vibratile et son flagelle (fl). D : Spherulocytes. ....	58
Fig. 20 : Morphologie générale interne de <i>H. forskali</i> . Les compartiments anatomiques étudiés dans la thèse sont signalisés par un astérisque. ....	89
Fig. 21 : Cycle de vie de <i>Holothuria forskali</i> (modifié d'après : Laguerre et al., 2020). ....	121
Fig. 22 : Définition des zones de collecte de <i>H. forskali</i> . A : 2 spécimens de <i>H. forskali</i> dans leur habitat à Brezellec ; B : carte des zones de collecte en Finistère (Bretagne, France) ; C : vue détaillée du site Archipel des Glénan et D : photo de la zone de plongée ; E : vue détaillée du site de la Pointe de Brezellec	

et F : photo de la zone de collecte. Les points jaunes localisent les zones de plongées. Barre d'échelle : 1 km. Carte : geoportail.fr (fonds de carte SHOM). .....	215
Fig. 23 : Récupération des fractions biologiques. A : Ecouvillonnage de l'épiderme (zone matérialisée par un carré blanc) ; B : Ponction du liquide cœlomique ; C : aperçu de l'ensemble du système digestif avant ligature.....	217
Fig. 24 : Valeurs des concentrations moyennes en microbiote cultivable dans les 3 compartiments anatomiques de <i>H. forskali</i> . Code : CF= microbiote cœlomique, GI = microbiote gastro-intestinal, SK = microbiote cutané (en UFC/cm <sup>2</sup> ) ; SW = bactéries cultivables de l'eau de mer.....	219
Fig. 25 : Suivi spatio-temporel des concentrations en microbiote cultivable dans les 3 compartiments anatomiques de <i>H. forskali</i> sur les sites Glénan et Brezellec. ....	224
Fig. 26 : Suivi des concentrations en bactéries cultivables dans l'eau de mer aux Glénan (A) et à Brezellec (B). ....	226
Fig. 27 : Concentrations moyennes en colonies agarolytiques dans les dénombrements du microbiote cultivable. Code : CF = liquide cœlomique ; G = contenu gastro-intestinal ; S = épiderme.....	233
Fig. 28 : Photos de souches présentant une activité agarolytique. A : colonie agarolytique formant une dépression sur le milieu de culture. B et C : souches agarolytiques provoquant des perforations du MA ; D : souches agarolytiques après isolement et repiquage. ....	233
Fig. 29 : Résultat d'un test d'activités protéolytique sur des souches issues de microbiotes gastro-intestinaux. Les halos transparents reflètent une activité protéolytique. ....	234
Fig. 30 : Nombre d'isolats de la souchothèque présentant une activité protéolytique et pourcentage de souches actives du compartiment anatomique concerné .....	234
Fig. 31 : Résultat d'un test d'activité antibactérien contre <i>L. anguillarum</i> , à partir de souches isolées de contenus gastro-intestinaux. Les halos d'inhibition, témoins d'une activité antibactérienne, sont pointés avec une flèche.....	235
Fig. 32 : Nombre d'isolats de la souchothèque présentant une activité antibactérienne et pourcentage de souches actives du compartiment anatomique concerné. ....	235
Fig. 33 : Résultat d'un test de pousse sur gélose TCBS. Les colonies jaunes révèlent une activité saccharose +. ....	236
Fig. 34 : Nombre d'isolats de la flore <i>Vibrionaceae</i> de la souchothèque et pourcentage de souches <i>Vibrionaceae</i> du compartiment anatomique concerné. ....	236
Fig. 35 : Identification des souches antibactériennes. A-C : Abondance relative des taxons bactériens dans l'ensemble des compartiments anatomiques et nombre de souches, par phylum (A), ordre (B) et genre (C). B : Distribution des abondances relatives des genres bactériens par compartiment anatomique d'origine. ....	237
Fig. 36 : Plasticité et évolution des microbiotes de <i>H. forskali</i> au cours de sa vie .....	248
Fig. 37 : Existence de microbiotes anatomiques différenciés chez <i>H. forskali</i> .....	249

## Liste des tableaux

Tab. 1 : Définition des différents types de core microbiote (traduit et modifié d'après Risely, 2020) ..	27
Tab. 2 : Résumé des prélèvements : dates de collecte, échantillons prélevés et températures de l'eau de mer. ....	216
Tab. 3 : Statistiques associées à la comparaison des microbiotes cultivables des 3 compartiments anatomiques de <i>H. forskali</i> . ....	220
Tab. 4: Valeurs moyennes des concentrations en microbiote cutané cultivable.....	221
Tab. 5 : Valeurs statistiques associées au microbiote cultivable cutané.....	221
Tab. 6 : Valeurs moyennes des concentrations en microbiote gastro-intestinal cultivable).....	222
Tab. 7 : Valeurs statistiques associées au microbiote gastro-intestinal cultivable.....	222
Tab. 8 : Valeurs moyennes des concentrations en microbiote cœlomique cultivable.....	223
Tab. 9 : Valeurs statistiques associées au microbiote cœlomique cultivable.....	223
Tab. 10 : Valeurs moyennes des concentrations en bactéries cultivables dans l'eau de mer.....	225
Tab. 11 : Valeurs statistiques associées aux bactéries cultivables de l'eau de mer .....	225
Tab. 12 : Liste des bactéries pathogènes utilisées pour le criblage antibactérien .....	230
Tab. 13 : Résumé du nombre d'isolats réalisés.....	232
Tab. 14: Synthèse de l'ensemble des activités des 142 souches antimicrobiennes.....	238





# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**





# 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1.1 Des concepts clés pour la compréhension des relations hôte – microbiote - environnement

### 1.1.1 Holobionte et théorie de l'hologénome

La première description de l'holobionte est réalisée par Lynn Margulis en 1981. L'auteure émet l'hypothèse d'un monde microbien omniprésent et obligatoire à chaque organisme vivant, jouant un rôle majeur dans sa santé, et, expliquant en partie leur évolution. Sa théorie est reprise successivement par plusieurs auteurs (Theis et al., 2016; Bordenstein and Theis, 2015; Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008), qui l'enrichissent de définitions et d'un cadre méthodologique. L'holobionte est donc constitué d'un hôte et de l'ensemble des microorganismes qui le colonise.

En 2007, Ilana Zilber-Rosenberg et Eugene Rosenberg définissent le terme d'hologénome, comme étant l'ensemble des informations génétiques de l'holobionte, et exposent leur théorie de l'évolution selon l'hologénome (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008; Margulis, 1993), à partir de leurs travaux réalisés sur les coraux (Rosenberg et al., 2007). Ainsi, leur théorie renvoie à quatre principes :

- il existe des relations symbiotiques entre les hôtes et leurs microorganismes ;
- une partie de ces symbiotes sont transmis aux générations suivantes ;
- ces associations symbiotiques contribuent à la santé et l'homéostasie de l'hôte ;
- face à des stress environnementaux, des variations de l'hôte et/ou de ses microorganismes confèrent une grande « souplesse » adaptative à l'holobionte.

Dans la théorie de l'hologénome reprise par Bordenstein et Theis en 2015 et Theis et al. en 2016, holobiontes et hologénomes constituent des unités biologiques fonctionnelles (fig. 1), qui co-évoluent (O'Brien et al., 2019; Theis, 2018; Theis et al., 2016; Bordenstein and Theis, 2015). Il est précisé que les gènes de l'hôte et /ou de son microbiote associé, peuvent affecter le phénotype de l'holobionte. Ceci confère à l'holobionte une plasticité génétique et une capacité d'adaptation plus importante face à des changements environnementaux (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2016; Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008 ; Rosenberg et al., 2007).

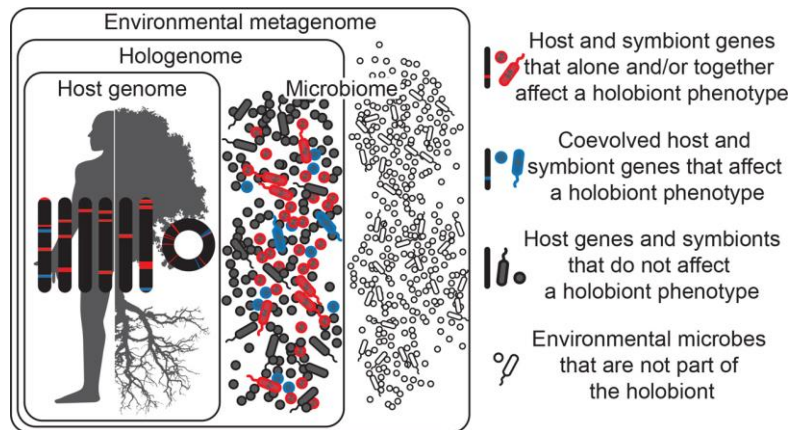


Fig. 1 : Théorie de l'holobionte et de l'hologénome (source : Theis et al. 2016)

### 1.1.2 Le microbiome

Le microbiome désigne « l'ensemble des microorganismes caractéristiques d'un habitat, qui a des propriétés physico-chimiques distinctes, ainsi que son théâtre d'activité » (Berg et al., 2020; Marchesi and Ravel, 2015; Whipps, 2001) (fig. 2).

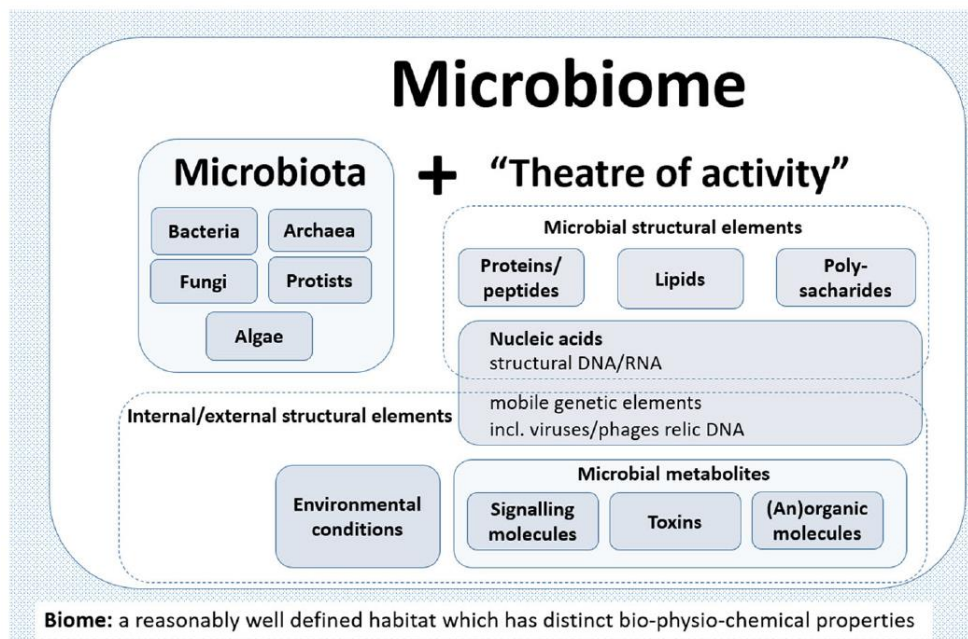


Fig. 2 : Illustration du concept de microbiome et de ses composantes (source : Berg et al. 2020)

La définition de ce microbiome met en avant le recours aux approches multi-omics. En effet, le microbiome est donc composé de la somme des communautés bactériennes appartenant à un même « habitat », mais également de leurs informations génétiques, de leurs produits de synthèse, et des facteurs de l'environnement (Berg et al., 2020; Aprill, 2017) (fig. 2). Dans ce microbiome, les

microbiotes sont étudiés par des techniques de métagénomique voire des techniques culture-dépendantes, et le théâtre d'activités par différentes approches telles que la protéomique, la métabolomique ou encore la transcriptomique (Limborg et al., 2018).

### 1.1.3 Microbiote : un ou des microbiotes

#### Définitions et généralités

Le microbiote est défini comme l'ensemble des microorganismes associés à un hôte eucaryote. La présence de ce microbiote contribue à l'homéostasie de l'animal (Bordenstein and Theis, 2015; Moran and Sloan, 2015; Moran, 2007).

La composition du microbiote peut varier, en terme de diversité et d'abondance, en fonction de différents facteurs, de l'environnement, de l'hôte, ou du microbiote lui-même. Il peut être étudié à différentes échelles, depuis le microbiote « total » d'un organisme entier, souvent déterminé lorsqu'il est impossible de différencier les structures anatomiques (embryons, larves, corps mou...), ou bien à une échelle anatomique donnée de l'hôte (organe, système) (Ling et al., 2013). Ainsi, les microbiotes cutanés et gastro-intestinaux sont les plus communément étudiés, quelle que soit l'espèce (Petersen and Osvatic, 2018) (fig. 3).

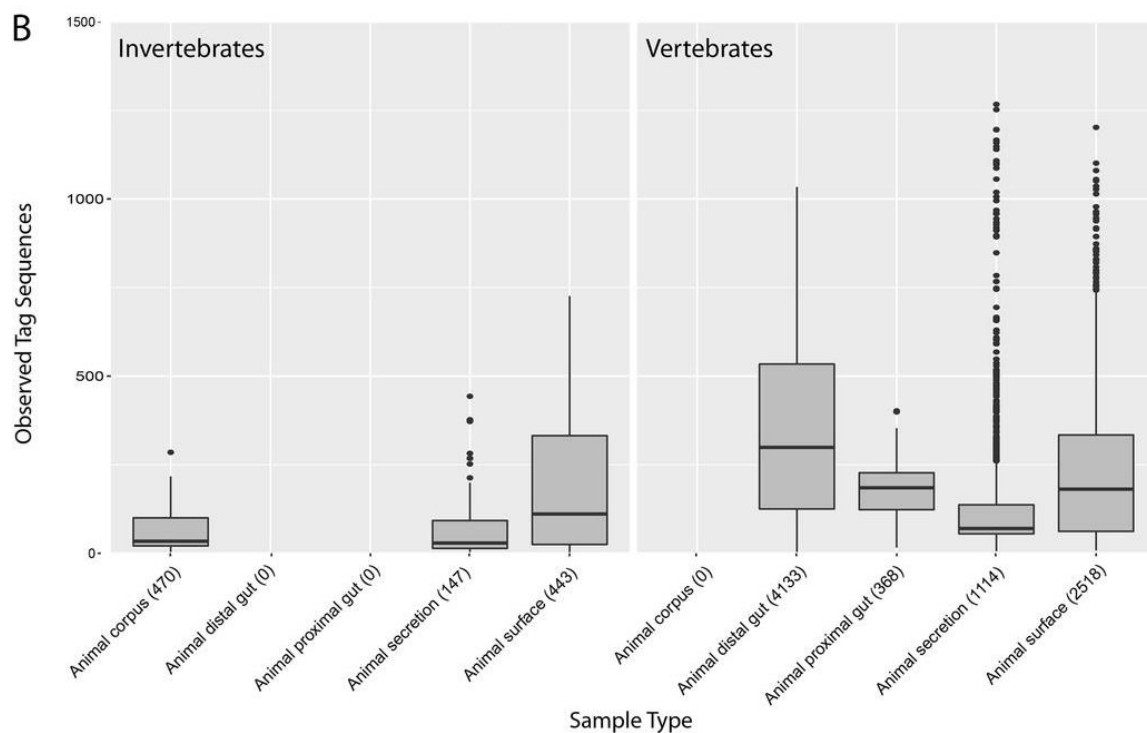


Fig. 3 : Nombre de séquences différentes observées chez les vertébrés et les invertébrés dans la littérature (Source : Petersen and Osvatic, 2018).

Ainsi, chez l'homme, et plus globalement chez les vertébrés, il existe de nombreux microbiotes différenciés tels que :

- le microbiote cutané (Boxberger et al., 2021; Byrd et al., 2018),
- les microbiotes associés au système respiratoire (Santacroce et al., 2020) :
  - pulmonaire (Man et al., 2017; O'Dwyer et al., 2016),
  - nasal (Lemon, 2020),
  - buccal (Gao et al. 2014),
- les microbiotes liés au système digestif :
  - gastrique (Thursby and Juge, 2017)
  - intestinal (Doré and Corthier, 2010)
- le microbiote génital (Diop et al., 2019).

### Transmissions

Il existe différents modes de transmission du microbiote, par transmission verticale, c'est-à-dire d'une génération à l'autre, et/ou par transmission horizontale, par imprégnation avec l'environnement (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018; Theis et al., 2016; Bordenstein and Theis, 2015).

La transmission verticale est bien décrite chez les mammifères, notamment pour le microbiote gastro-intestinal (Sarkar et al., 2020; Moeller et al., 2018). Les vecteurs – ou moments clés – de transmission verticale peuvent être : l'allaitement (Wang et al., 2020) et plus globalement l'alimentation de la progéniture (Ding et al., 2020), l'accouchement ou la mise bas (Reyman et al., 2019), ou le contact pendant les soins apportés à la progéniture. Chez les organismes aquatiques, la transmission verticale est plus controversée mais démontrée chez certains poissons, par l'alimentation des juvéniles avec le mucus des parents (Sylvain and Derome, 2017).

Ensuite, la transmission horizontale est réalisée par imprégnation avec l'environnement, tout au long de la vie des hôtes. La transmission peut être effectuée selon différentes voies : par contact (avec les substrats, le sol, eau de mer...), par voie aérienne (aérosols), et par alimentation. Chez les organismes aquatiques, l'imprégnation dans l'environnement est omniprésente, avec l'eau de mer comme vecteur privilégié de transmission horizontale.

### De l'équilibre des communautés bactériennes du microbiote à la dysbiose

Certains microorganismes présents dans le microbiote vont avoir un effet positif, négatif ou neutre sur l'hôte. Ainsi, il a été défini trois types de microbiote : le microbiote dit « bénéfique », le microbiote « neutre » et le microbiote « opportuniste et/ou pathogène » (Berg et al., 2020; Rosenberg et al., 2007).

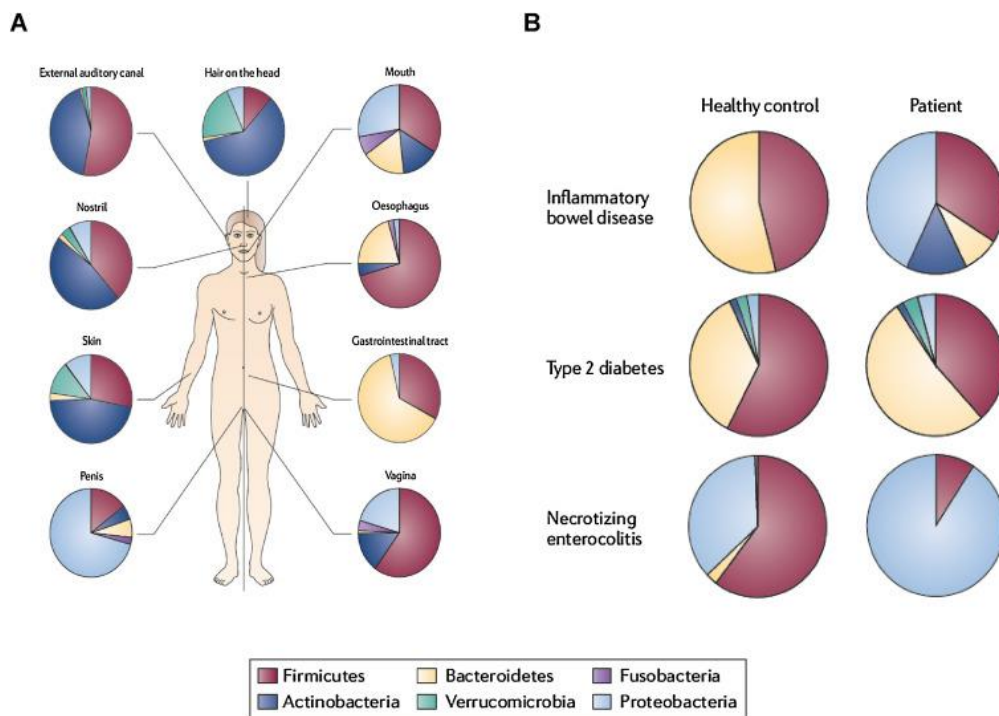


Fig. 4 : Modification du microbiote humain en cas de maladie. A : principaux phyla constitutifs des microbiotes anatomiques. B : Dysbiose : effet de maladies sur le microbiote humain (source : Appanna 2018).

Le microbiote bénéfique est décrit le plus souvent comme commensal et/ ou symbiotique, il interagit de façon positive avec l'hôte en contribuant à sa santé (Butt and Volkoff, 2019). Ce microbiote « positif » est associé à l'évolution de l'hôte. A l'opposé, il existe des microorganismes opportunistes voire pathogènes, constituant le « pathobiome », qui vont entraîner des perturbations du microbiote, et entraîner une dysbiose (Berg et al., 2020; Hedayat et al., 2020; Appanna, 2018) (fig. 4). Une dysbiose peut être définie comme un déséquilibre du microbiote, caractérisé par une modification des compositions des communautés bactériennes du microbiote, entraînant par la même des modifications métaboliques et fonctionnelles, et pouvant conduire à une pathologie (Hedayat et al., 2020).

Les microorganismes des microbiotes de l'hôte interagissent entre eux, qu'ils soient positifs, neutres ou pathogènes, et l'équilibre ou la balance entre ces populations microbiennes et leur diversité contribuent à la santé de l'hôte.

### Définir un « core microbiote »

Le microbiote varie en fonction de nombreux paramètres de l'environnement, mais aussi en fonction de l'hôte lui-même. Cependant, il existe une part des microorganismes du microbiote qui reste stable et/ou prévalente. A partir de ces constats, certains auteurs ont émis l'hypothèse de l'existence d'un ou de plusieurs « core(s) microbiote(s) » et ont tenté de les définir (Shade and Handelsman, 2012).

Ainsi, le core microbiote a été défini comme un groupe de micro-organismes, d'un compartiment anatomique donné, qui est commun à plusieurs individus d'une même espèce en bonne santé. Le core microbiote ainsi que les autres membres du microbiote sont influencés par le régime alimentaire, le génotype et le stade de développement de l'hôte (Aguirre de Cárcer, 2018; Björk et al., 2017; Hernandez-Agreda et al., 2017; Shade and Handelsman, 2012; Hamady and Knight, 2009; Turnbaugh and Gordon, 2009).

Chez l'homme, les travaux conduits dans le cadre du « Human Microbiome Project » ont permis de démontrer l'existence d'un « core microbiote » associé au système digestif, composé en grande partie d'unités discrètes, très éloignées taxonomiquement les unes des autres (Aguirre de Cárcer, 2018; Turnbaugh et al., 2007). De surcroît, il a été prouvé que des variations mineures de ce core microbiote permettent d'expliquer certaines prédispositions à des pathologies comme l'obésité (Lloyd-Price et al., 2016; Turnbaugh and Gordon, 2009).

Le microbiote amygdalien de plusieurs cohortes de porcs a été étudié et a démontré l'existence d'un core microbiote commun à toutes les cohortes, au sein duquel des populations minoritaires et spécifiques, sont caractéristiques d'une population (Lowe et al., 2012).

Le core microbiote a été exploré également chez les coraux (Hernandez-Agreda et al., 2017, 2016; Ainsworth et al., 2015; Schmitt et al., 2012), et chez les spongiaires (Astudillo-García et al., 2017; Björk et al., 2017) pour tenter de comprendre les interactions hôte – microbiote, et les fonctions exercées par ce dernier.

Cependant, selon les auteurs, la discrimination entre taxons constitutifs du core microbiote ou non est réalisée sur différents critères, comme la prévalence (avec des valeurs seuil de 30 à 100%) et/ou l'abondance, avec des efforts d'échantillonnage variables (nombre d'individus, de collectes, de sites).

Face à la multitude des études sur le core microbiote et la diversité des techniques choisies pour le définir, de nouvelles définitions, ainsi qu'un cadre méthodologique ont été proposés. Elles mettent en avant la complexité de l'analyse du core microbiote, et aussi l'existence de différents types de core microbiote (Berg et al., 2020; Risely, 2020; Lemanceau et al., 2017) (tab. 1).

Tab. 1 : Définition des différents types de core microbiote (traduit et modifié d'après Risely, 2020)

Type	Définition	Critères	Intérêt/objectif	Références
<b>Core commun</b>	Microorganismes retrouvés chez beaucoup d'individus d'une même population ou d'une même espèce	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte prévalence au sein de la population / de l'espèce</li> <li>- Taxons abondants, non rares</li> </ul>	<p>Déterminer un core sain vs. un core malade</p> <p>Définir une population</p>	(Aguirre de Cárcer, 2018; Ainsworth et al., 2015; Dishaw et al., 2014; Lowe et al., 2012; Salonen et al., 2012; Schmitt et al., 2012; Turnbaugh and Gordon, 2009)
<b>Core temporaire</b>	Microorganismes stables ou prédictibles en fonction du temps	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence dans le temps ou dynamique prédictible au cours du temps au sein d'une population / d'une espèce</li> <li>- Pas de critère d'abondance</li> </ul>	<p>Déterminer un core saisonnier</p> <p>Identifier un core lié à un stade de vie</p>	(Björk et al., 2017; Gobet et al., 2018)
<b>Core écologique</b>	Microorganismes importants dans l'organisation et la diversité des communautés	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Leur introduction ou disparition engendrerait des effets en cascade sur la diversité et la structure des communautés</li> <li>- Ils peuvent former des réseaux écologiques</li> <li>- Ils peuvent améliorer la stabilité des communautés</li> <li>- Pas de critère d'abondance</li> </ul>	Déterminer un core spatial : spécifique d'une niche écologique ou d'un compartiment anatomique	(Astudillo-García et al., 2017; Hernandez-Agreda et al., 2017)
<b>Core fonctionnel</b>	Microorganismes jouant un rôle biologique important chez l'hôte (biochimique, physiologique, écologique)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Groupe de gènes ou taxons qui sont mesurables et reflètent les fonctions de l'hôte</li> <li>- Une variation naturelle chez la fonction de l'hôte ne doit pas affecter la santé de l'hôte</li> <li>- Peuvent être des symbiotes facultatifs</li> <li>- Peuvent être transmis horizontalement ou verticalement</li> <li>- Pas de critère d'abondance</li> </ul>	<p>Déterminer le core nécessaire à la bonne santé d'un hôte</p> <p>Proposer des compléments probiotiques</p> <p>Déterminer un état basal et détecter des écosystèmes dégradés</p>	(Jacquiod et al., 2019; Lemanceau et al., 2017)
<b>Core adapté à un hôte spécifique</b>	Microorganismes ayant co-évolué avec l'hôte et qui améliorent la santé de l'hôte	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taxons qui sont mesurables et reflètent les fonctions de l'hôte</li> <li>- Une variation naturelle de la fonction affecte la santé de l'hôte</li> <li>- Présentent une fonction spécifique</li> <li>- Sont supposés transmis verticalement</li> <li>- Pas de taxons rares ou non prévalents</li> </ul>	<p>Déterminer le core nécessaire à la bonne santé d'un hôte</p> <p>Proposer des compléments probiotiques</p>	(Pédron et al., 2012)



## Les techniques d'analyse du microbiote : avancées et limites

L'étude du microbiome a littéralement explosé dans les années 2000, du fait des avancées réalisées en biologie moléculaire, et notamment avec l'arrivée des séquenceurs haut débit de nouvelle génération (NGS) et des techniques de metabarcoding et pyroséquençage associées (Bush et al., 2019; Ruppert et al., 2019; Baird and Hajibabaei, 2012).

Initialement, le séquençage de type Sanger était réalisé à partir d'une seule souche, cultivable, isolée et pure, mais depuis, les NGS ont permis d'analyser des échantillons complexes d'ADN et ainsi, d'avoir une vision quasi-totale d'un compartiment de l'environnement ou du microbiote d'un organisme (Taberlet et al., 2018; Corell and Rodriguez-Ezpeleta, 2014; Ji et al., 2013) (fig. 5).

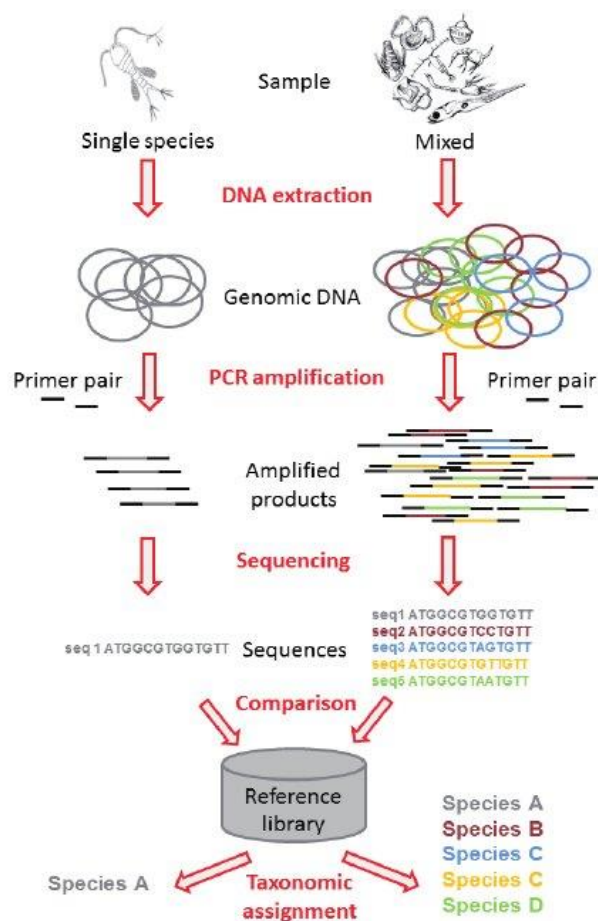


Fig. 5 : comparaison des technologies de séquençage de type Sanger (à gauche) et metabarcoding (à droite) (source : Corell et al. 2014)

De grands projets naissent tels que le « human microbiome project » (Turnbaugh et al., 2007) et une nouvelle voie s'est ouverte, celle de l'étude des bactéries présentes dans les environnements marins (Sogin et al., 2006).

Grâce aux NGS, mais également aux outils bioinformatiques de traitement et d'analyse des données développés en parallèle, les microbiotes peuvent être caractérisées par différents indicateurs, tels que la composition, la richesse et la diversité, les abondances relatives, les assemblages bactériens spécifiques, ou encore la présence et la proportion de taxa spécifiques ou partagés.

Plus récemment, le développement d'outils bio-informatiques de prédiction des fonctions du microbiote apporte de nouvelles informations quant à la contribution fonctionnelle du microbiote pour l'hôte, renforcé par l'utilisation combinée des différentes approches multi-omics.

Cependant, la diversité des techniques associées aux NGS rend parfois difficile la comparaison des résultats entre études en fonction des choix opérés tout au long du process (Bush et al., 2019; Calle, 2019; Pollock et al., 2018; Haegeman and Etienne, 2017; Goodrich et al., 2014), et notamment :

- Les choix en amont du séquençage :
  - stratégies d'échantillonnage (compartiments analysés, nombre de répliques par condition, nombre de conditions, suivi temporel...),
  - conservation des échantillons
  - kit d'extraction d'ADN (Loos and Nijland, 2021; Ando et al., 2020),
  - technologie de séquençage (Illumina MiSeq et HiSeq, PacBio, Roche 454, Ion Torrent...) (Anslan et al., 2021; Onywera and Meiring, 2020; Dopheide et al., 2018; Liu et al., 2012; Luo et al., 2012)
  - choix des amorces et zone ciblée par le séquençage (fig. 6) (Bukin et al., 2019; Falentin et al., 2019; Günther et al., 2018),
  - ajout de répliques PCR et de contrôles (contrôles négatifs de PCR, de puits ou du kit d'extraction et des fluides de laboratoire...),
  - run de séquençage
- Les choix en aval du séquençage :
  - outils bioinformatiques de nettoyage des données (Frogs, Mothur, Qiime, Obitools, Dada2...)
  - clustering en unités de base taxonomiques : OTUs (Operational Taxonomic Units) ou ASVs (Amplicon Sequence Variants),
  - filtres d'abondance,
  - banques de données choisies pour l'affiliation taxonomique (Silva, Greengenes, RDP...),
  - outils bioinformatiques d'analyses et tests statistiques.

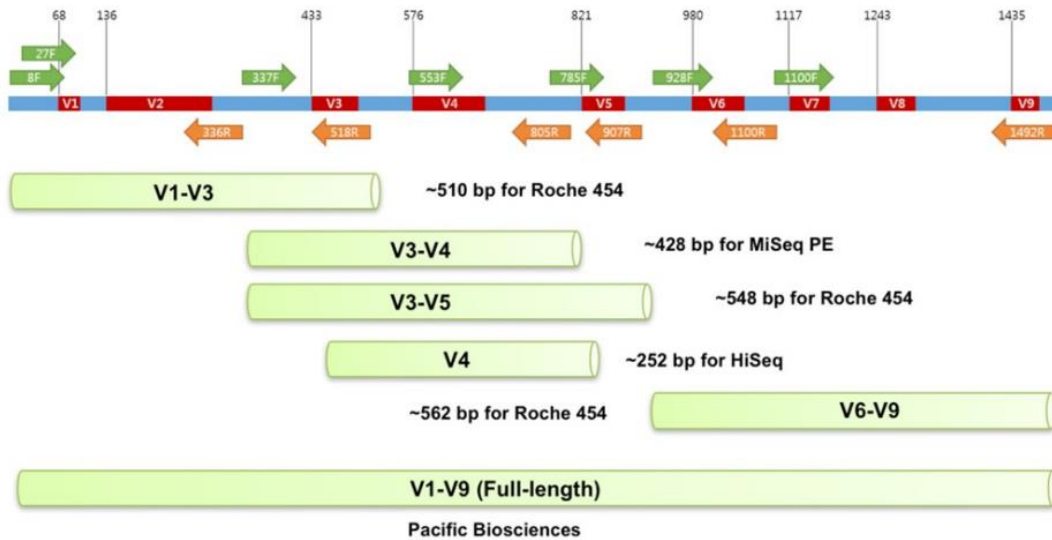


Fig. 6 : Régions hypervariables (en rouge) et conservées (en bleu) de l'ADNr 16S et zones ciblées par les amorces et les différentes technologies de séquençage (Falentin et al., 2019).

Ainsi, le metabarcoding 16S constitue une avancée technologique majeure, et une méthode rapide, efficace, accessible et fiable, à condition que l'ensemble de l'étude soit bien réfléchi et conçu en amont, afin que les résultats soient les plus reproductibles possibles (Loos and Nijland, 2021; Sepulveda et al., 2020; Ruppert et al., 2019; Pollock et al., 2018). Le choix des traitements statistiques doit également faire l'objet d'une réflexion globale, comparée, et raisonnée.

## 1.2 Le microbiote des « invertébrés marins »

Les “invertébrés marins” représentent un groupe d’usage commun, polyphylétique, composés de :

- de métazoaires non bilatériens : les Cnidaires, les Cténophores et les Spongiaires ;
- des protostomiens, notamment : les mollusques, les annélides, les nématodes, les arthropodes... ;
- d’une partie des deutérostomiens : les échinodermes, les hémichordés, les céphalochordés et des tuniciers.

Bien que n’ayant aucune justification phylogénétique, ce groupe d’usage des « invertébrés marins » est très communément utilisé en écologie marine et microbienne, aussi bien que le groupe des « algues » par exemple. C’est pourquoi il a été choisi d’utiliser ce terme dans cette thèse.

### 1.2.1 Diversité des modèles d’étude chez les invertébrés marins

Les études sur le microbiote ont explosé dans les années 2000, principalement chez les mammifères, les études sur les organismes marins restant largement minoritaires (fig. 7) (Ando et al., 2020).

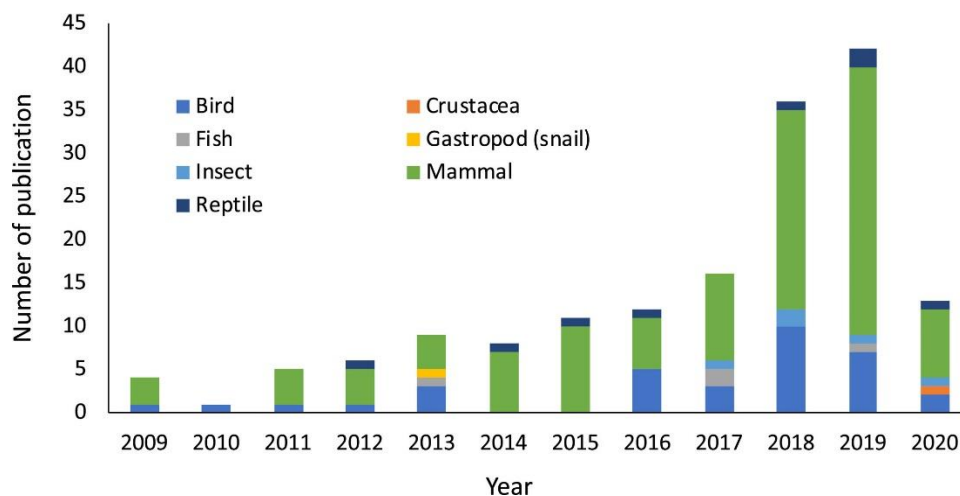


Fig. 7 : Evolution du nombre d’études conduites sur le microbiote fécal par metabarcoding en fonction des hôtes animaux (source : Ando et al. 2020).

Le microbiote des « invertébrés marins » est étudié depuis les années 1990, d’abord au travers de l’étude du microbiote des coraux, et ce, pour plusieurs raisons. En effet, les coraux sont des organismes symbiotiques qui composent des écosystèmes riches mais très fragiles, ils sont parmi les premières victimes du réchauffement climatique, et, de ce fait, deviennent un enjeu de conservation important (Apprill, 2017; Rosenberg et al., 2007). Il en ressort toutefois que les coraux sont capables de développer

des stratégies adaptatives, et notamment des résistances à des organismes pathogènes et des adaptations face aux stress environnementaux.

Différents phyla du groupe des « invertébrés marins » sont étudiés et permettent d'appréhender la complexité des relations entre les invertébrés marins, leur microbiote et leur environnement. Les phylas les plus étudiés sont les échinodermes, les mollusques, les éponges et les cnidaires (fig. 8).

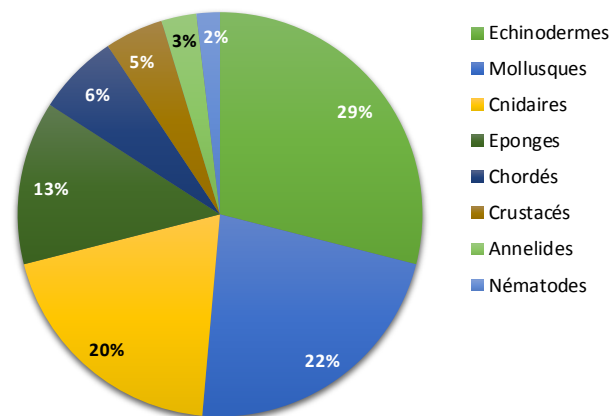


Fig. 8 : Proportions d'études réalisées sur le microbiote des invertébrés marins avec les NGS, en fonction du phylum concerné.

Les études réalisées mettent en avant la variabilité des microbiotes en fonction de l'espace, du temps, ou encore de la santé de l'hôte.

### 1.2.2 Facteurs influençant les microbiotes des invertébrés marins

Le microbiote des invertébrés marins est soumis à des pressions de différentes natures, qu'elles soient liées à l'hôte, à l'environnement, aux communautés bactériennes du microbiote lui-même, ou à l'ensemble de ces facteurs, qui interagissent entre eux (fig. 9).

Le microbiote est influencé par son hôte, en fonction : de l'espèce, de la population concernée et de ses spécificités phénotypiques, du stade de vie, de l'organe, du génotype, et de son régime alimentaire (Paillard et al., 2022). L'holobionte est également soumis aux nombreux facteurs composant son environnement :

- les facteurs abiotiques tels que : la température, la photopériode, les phénomènes naturels (tempêtes, canicules...), la profondeur d'eau...
- les facteurs biotiques tels que la présence des communautés bactériennes des compartiments de l'habitat de l'hôte et la présence d'espèces proches contribuant à la transmission horizontale

et/ou verticale, la présence d'espèces concurrentes et/ou prédatrices, la nature de la source alimentaire, la présence d'organismes pathogènes...

- les activités anthropiques : perturbations et/ou modifications des habitats (chalutage, tourisme, nautisme, agriculture, énergies marines renouvelables...), apports de polluants (inorganiques et organiques) impactant l'holobionte directement ou indirectement via la perturbation de son environnement.

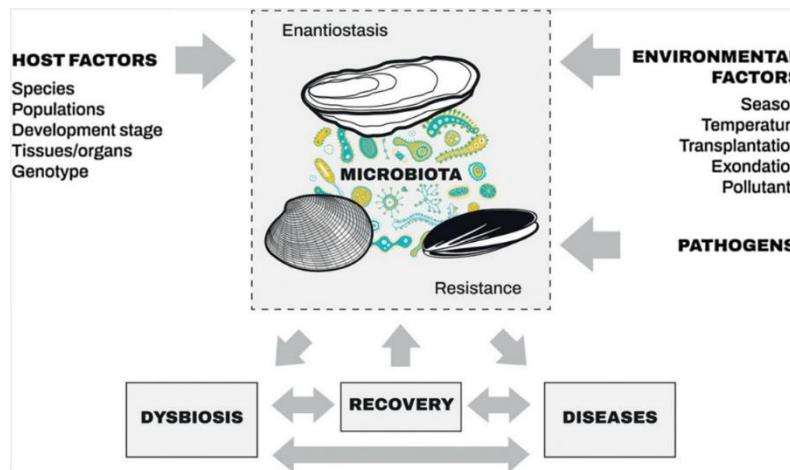


Fig. 9 : Les facteurs influençant le microbiote des invertébrés marins, illustrés chez les bivalves. (Source : Paillard et al 2022)

Selon la position taxonomique de l'hôte, la nature des échanges et donc des interactions avec l'environnement seront plus ou moins fortes. L'ensemble de ces interactions hôte – microbiote – environnement va contribuer à la plasticité et la résilience du microbiote.

### 1.2.3 Exploration du microbiote des invertébrés marins au regard des NGS

Les études conduites chez les invertébrés marins ont pour objectifs la description et la compréhension des interactions entre l'hôte, le microbiote et l'environnement. L'ensemble de ces études fait part de la dominance des Proteobacteria dans les microbiotes des invertébrés marins, et d'une composition qui dépend de différents facteurs, parmi lesquels l'affiliation taxonomique de l'hôte, le compartiment anatomique ciblé et l'environnement.

#### Un microbiote spécifique de l'hôte

La spécificité du microbiote pour un hôte est répertoriée chez la plupart des invertébrés marins, et ce, à différentes échelles taxonomiques : entre microbiotes d'hôtes appartenant à des embranchements différents (León-Palmero et al. 2018), au sein d'une même famille (Bellec et al., 2019) ou encore d'un même genre (Cicala et al. 2018; León-Palmero et al. 2018).

Chez les nématodes, il a été démontré l'existence de microbiotes spécifiques chez différentes espèces des eaux peu profondes (Bellec et al., 2019), mais partageant entre eux des ectosymbiotes (symbiotes vivant à la surface des hôtes) communs associés à des fonctions de chimiosynthèse, fréquemment retrouvés chez les invertébrés des sources hydrothermales profondes.

Chez les tuniciers, les microbiotes présentent des associations spécifiques de taxons selon les espèces d'ascidies concernées (Tianero et al., 2015). Les taxons associés à cette spécificité sont généralement des taxons abondants, et notamment des bactéries productrices de métabolites secondaires. Ainsi, des métabolites assimilés aux ecteinascidines (alcaloïde complexe) ont été identifiés spécifiquement chez l'ascidie *Ecteinascidia turbinata*, et des cyanobactines (peptides cycliques cytotoxiques) produites par le symbiote *Prochloron spp.* chez *Lissoclinum patella* (Tianero et al., 2015).

Chez les cnidaires, les études sont majoritairement focalisées sur l'identification des symbiotes communs et partagés entre les différentes espèces et sites. Toutefois, il existe des ectosymbiotes hautement spécifiques à un hôte, chez les coraux notamment (Osman et al., 2020), où des individus de la même espèce, récoltés dans des zones géographiquement très éloignées, présentent des ectosymbiotes spécifiques. La spécificité des microbiotes d'anémones de mer (León-Palmero et al., 2018) et de méduses (Cleary et al., 2016) a aussi été étudiée, avec des compositions spécifiques en comparaison avec d'autres groupes d'invertébrés marins ou bien en comparaison avec les communautés bactériennes de l'eau de mer.

Chez les éponges, de nombreuses études se sont focalisées sur l'identification des microbiotes spécifiques des éponges à différentes échelles taxonomiques (Reveillaud et al. 2014) : des microbiotes spécifiques du phylum (Hentschel et al., 2002) et des microbiotes spécifiques à une espèce donnée (Freeman et al., 2020 ; Schmitt et al. 2012). Ces microbiotes spécifiques sont notamment composés d'ectosymbiotes à très faibles abondances. La présence de ces taxons sous-abondants, prévalents un même hôte et sur plusieurs aires géographiques, explique en grande partie la spécificité des microbiotes entre les espèces d'éponges et démontre de la co-évolution entre un hôte et son microbiote (Reveillaud et al., 2014; Freeman and Thacker, 2011).

Chez les mollusques, l'étude des compositions des microbiotes gastro-intestinaux entre différents bivalves filtreurs (Pierce and Ward, 2019) a montré l'existence de microbiotes spécifiques distincts, résultat aussi observé chez 2 espèces d'ormeaux du genre *Haliotis* (Cicala et al., 2018). Ces résultats suggèrent que la présence de ces OTUs spécifiques à un hôte est corrélée à l'environnement de l'hôte et notamment à la compétition entre espèces proches, vivant dans une même niche écologique.

Chez les échinodermes, les auteurs confirment la spécificité des microbiotes chez les oursins (Miller et al., 2021; Rodriguez Barreras et al., 2021) et chez les holothuries (León-Palmero et al., 2018). Chez les étoiles de mer, Jackson (Jackson et al., 2018) étudie le microbiote coelomique de 12 espèces présentes dans des habitats divers, et montre que ces microbiotes coelomiques diffèrent des communautés bactériennes de l'eau de mer, en termes de composition taxonomique et de concentration. La flore bactérienne de l'eau de mer est deux fois plus concentrée, suggérant une sélection du microbiote par les coelomocytes de l'holobionte (Jackson et al., 2018). Néanmoins, dans l'étude de Nakagawa (Nakagawa et al., 2017), deux étoiles de mer appartenant à 2 familles différentes, *Patiria pectinifera* et *Asterias amurensis*, sont étudiées et les résultats montrent que de grandes variabilités interindividuelles entre les microbiotes coelomiques existent et que peu de taxons sont communs aux deux familles.

Ces études mettent en avant une spécificité des microbiotes vis-à-vis d'une espèce hôte, ou d'un phylum, tel que le symbiote algal *Symbiodinium sp.* chez les coraux. Par ailleurs, la forte variabilité inter-individuelle du microbiote chez certains hôtes met en exergue l'importance d'un échantillonnage suffisant.

### Une compartimentation des microbiotes

Le groupe d'usage des « invertébrés marins » est constitué d'organismes phylogénétiquement et morphologiquement très différents, présentant une anatomie plus ou moins complexe : présence de compartiments anatomiques distincts (organes, tissus...), et nature des échanges avec l'environnement (organes externes ou en relation avec l'environnement). Ainsi, l'existence de microbiotes anatomiques chez les invertébrés marins est validée par de nombreuses études, focalisant sur l'aspect « tissu-spécifique » du microbiote.

Chez les bivalves, les compartiments anatomiques explorés sont le manteau, l'hémolymphe, la glande digestive, les branchies, les gonades, la glande byssale, le muscle adducteur ou encore le mucus. Ces compartiments abritent des microbiotes distincts et composés de communautés bactériennes spécialisées dans des fonctions métaboliques en lien avec le compartiment d'origine (King et al., 2021; Dubé et al., 2019; Meisterhans et al., 2016). Chez le clam géant *Tridacna maxima*, cette compartimentation des microbiotes est montrée, et met en avant la présence d'une famille bactérienne, les *Endozoicomonadaceae*, dont les abondances et les espèces varient en fonction du compartiment anatomique, associée en partie à des fonctions du cycle de l'azote (Rossbach et al., 2019). En outre, l'existence d'un core microbiote intestinal a été montré chez le clam *T. maxima* et chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Rossbach et al., 2019; Meisterhans et al., 2016).



Chez les échinodermes, l'existence de microbiotes anatomiques distincts est également décrit, chez les holothuries (Enomoto et al., 2012), les oursins et les étoiles de mer (Jackson et al., 2018). Les différentes parties du système digestif (antérieure, médiane et postérieure) sont composées chacune d'un microbiote distinct, chez l'oursin (Schwob et al., 2020; Hakim et al., 2019, 2016) et l'holothurie (Pagán-Jiménez et al., 2019; Enomoto et al., 2012).

D'autre part, les compartiments externes des invertébrés marins, et l'épiderme en premier lieu, sont en contact direct avec l'environnement et/ou le substrat (sédiment, rocher...). Cependant, le microbiote cutané est bien différencié par rapport aux communautés bactériennes de l'eau de mer ou du sédiment, chez les nématodes (Bellec et al., 2019), les annélides (Medina-Silva et al., 2018), les tuniciers (López-Legentil, 2015; Blasiak et al., 2013; Erwin et al., 2013), les mollusques (Clerissi et al., 2020; Barros et al., 2018; Vezzulli et al., 2018; Asmani et al., 2016), les échinodermes (Jackson et al., 2018), les éponges (Astudillo-García et al., 2017) et les cnidaires (Cleary et al., 2016).

Il en est de même pour les microbiotes gastro-intestinaux des animaux dépositivores et filtreurs, la composition de leurs microbiotes diffère des communautés bactériennes du sédiment ou de l'eau de mer, chez les échinodermes (Schwob et al., 2020; Wang et al., 2018; Plotieau et al., 2013) et chez les mollusques filtreurs (Offret et al., 2020).

### Contribution de l'habitat à la sélection du microbiote de l'hôte

Même si la plupart des auteurs valide l'existence de variations spatiales sur le microbiote des invertébrés marins, les résultats d'études sont contrastés, selon les espèces et selon les compartiments anatomiques.

Chez les larves d'invertébrés marins, des différences de richesse et de diversité ont été montrées dans les microbiotes issus de larves se développant en zones côtières, en comparaison avec les microbiotes issus des larves évoluant en eaux profondes (Carrier et al., 2021).

Chez les coraux, l'existence de variations spatiales du microbiote a été mise en évidence (Osman et al., 2020; van Oppen and Blackall, 2019; Hernandez-Agreda et al., 2016; Ainsworth et al., 2015). Néanmoins, une part de ces microbiotes coralliens reste commune à plusieurs espèces présentes dans des zones géographiquement très éloignées et constituerait un core microbiote corallien (Ainsworth et al., 2015).

Chez les bivalves, des variations des microbiotes sont observées en fonction des sites de production, notamment dans les microbiotes de l'huître perlière *Pinctada maxima* (King et al., 2021), dans le microbiote cœlomique de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Lokmer et al., 2016a), ou encore dans les microbiotes branchiaux et digestifs de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Meisterhans et

al., 2016). Le microbiote peut aussi varier durant les transferts aquacoles, de l'écloserie vers le site de nurserie, puis vers le site de grossissement (Trabal et al., 2012). De plus, le positionnement des coquillages sur l'estran (hauteur, localisation) impacte le microbiote digestif de ceux-ci (Offret et al., 2020).

Chez les crustacés (Fan et al., 2019; Abdelrhman et al., 2017; Durand et al., 2010), les ascidies (Dishaw et al., 2014) et les échinodermes (Miller et al., 2021; Rodriguez Barreras et al., 2021; Becker et al., 2008), la composition du microbiote gastro-intestinal est le reflet de la niche écologique occupée par l'animal, elle rend compte des variations de l'habitat dans l'ensemble de ses composantes, parmi lesquelles la source alimentaire, qui peut varier à une micro-échelle et en fonction du temps. Malgré ces variations spatiales du microbiote digestif, il existe une flore digestive commune et abondante, qui peut être considérée comme une niche écologique à elle seule, contribuant aux fonctions digestives, chez l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Gobet et al., 2018), chez l'holothurie *Apostichopus japonicus* (Bogatyrenko and Buzoleva, 2016) et chez l'annélide *Urechis unicinctus* (Tang et al., 2021).

Le changement d'habitat, et notamment le passage du milieu naturel à la captivité, impacte les microbiotes, et entraînent des modifications de la composition des microbiotes et une diminution de la diversité. Chez le mollusque bivalve des grandes profondeurs *Bathymodiolus azoricus*, l'acclimatation dans des aquariums à pression atmosphérique engendre une perte graduelle des endosymbiontes dans le microbiote des branchies, appartenant principalement aux ordres des Oceanospirillales, Methylococcales et Thiotrichales, et une modification du métabolisme (stress, énergie) en réponse à l'acclimatation (Barros et al., 2018). Chez les échinodermes, la captivité engendre des modifications des compositions des communautés bactériennes des microbiotes gastro-intestinaux. L'impact de la captivité se traduit par une diminution des Proteobacteria au profit des Firmicutes chez l'holothurie *Holothuria glaberrima* et une perte de la différenciation en terme de microbiote pour les segments du système digestif (Pagán-Jiménez et al., 2019). Chez l'oursin *Lytechinus variegatus*, la captivité engendre un développement du genre *Vibrio* et des *Arcobacteraceae* dans le contenu gastro-intestinal (Green et al., 2021).

Par ailleurs, l'étude du microbiote par metabarcoding 16S peut mettre en évidence la présence d'espèces invasives et permettre de caractériser les populations natives des populations invasives, notamment dans des populations d'huîtres du genre *Spondylus* (Roterman et al., 2015).

### Dynamique temporelle des microbiotes

Des variations temporelles du microbiote des invertébrés marins sont décrites chez de nombreuses espèces. Chez les éponges, une dynamique du microbiote est observée, en lien avec l'environnement

et les saisons, et peut être modélisée (Björk et al., 2017). Ces variations du microbiote des éponges sont davantage décrites comme étant liées à la « densité » en communautés bactériennes constituant le core microbiote.

Chez les mollusques bivalves (Pierce and Ward, 2019; Pierce et al., 2016) et gastéropodes (Gobet et al., 2018), des variations saisonnières de la composition du microbiote digestif sont répertoriées.

### Evolution et transmission du microbiote au cours du cycle de vie

La composition et la transmission du microbiote au cours du cycle de vie des invertébrés marins restent des sujets peu explorés et très controversés (Björk et al., 2019).

Chez les éponges, une transmission verticale précoce dans le cycle de vie permet l'implantation des symbiotes chez la descendance, mais que ceux-ci restent sous-abondants durant tous les premiers stades de vie, jusqu'à l'âge adulte, où le core microbiote et les symbiotes sont stables (Fieth et al., 2016; Schmitt et al., 2007). En parallèle, les communautés bactériennes de l'environnement contribuent à l'implantation et l'enrichissement du microbiote durant les premières phases larvaires par transfert horizontal (Fieth et al., 2016).

Chez les cnidaires, des tests d'inoculation de symbiotes ont été réalisés en laboratoire, afin de simuler une transmission verticale. Ces inoculations ont un effet sur les compositions des microbiotes des stades larvaires et juvéniles (Damjanovic et al., 2019). Le suivi du microbiote des plus jeunes stades de vie démontre d'un enrichissement progressif du microbiote jusqu'au stade adulte (Franzenburg et al., 2013). Ces études mettent en exergue les transmissions horizontale et verticale sur le microbiote des larves et des juvéniles de cnidaires.

Chez les larves de bivalves (Asmani et al., 2016; Trabal et al., 2012) et d'échinodermes (Carrier and Reitzel, 2020; Carrier et al., 2017), les études valident une imprégnation des larves par les communautés bactériennes de l'environnement (transmission horizontale), par l'épiderme dès les premiers stades embryonnaires, puis par le système digestif pour les stades larvaires qui s'alimentent. Outre cet enrichissement temporel quantitatif, le microbiote évolue en fonction du stade larvaire, en qualité (Carrier and Reitzel, 2020). Par ailleurs, la présence de nombreux taxons communs entre l'eau de mer et les microbiotes coelomiques des échinodermes, et notamment celui de l'étoile de mer *Patiria pectinifera* pose l'hypothèse d'une transmission horizontale avec l'environnement (Nakagawa et al., 2017). Par ailleurs, la présence de taxons spécifiques dès les premiers stades de vie pose l'hypothèse d'une sélection précoce par l'holobionte (Asmani et al., 2016).

Chez les crustacés, les modes reproductifs diffèrent entre les groupes, toutefois, une incubation des œufs est opérée par la femelle, jusqu'à l'éclosion à un stade zoé ou mysis selon l'espèce. Cette incubation rend possible les échanges vers la descendance. Chez les pénéidés, le microbiote gastro-intestinal s'implante progressivement et varie avec l'âge (Huang et al., 2018), il s'agit donc d'un microbiote dynamique au cours de la vie des crustacés.

En fonction du type de reproduction, de fécondation et de l'ontogénèse des espèces, les transmissions verticales et/ou horizontales sont plus ou moins facilitées. Ainsi, une transmission verticale sera difficilement réalisable chez des espèces à fécondation externe, ce qui est le cas de la plupart des invertébrés marins et sera fonction de caractéristiques hydrologiques locales (courant, densité des œufs, dispersion larvaire...). Ces transmissions peuvent être réalisées artificiellement en milieu contrôlé, par des fécondations artificielles ou des inoculations volontaires.

### Effet du régime alimentaire sur le microbiote gastro-intestinal

Chez les crustacés amphipodes présents dans la zone supralittorale, des microbiotes distincts ont été identifiés à l'échelle de micro-habitats (Abdelrhman et al., 2017), et révèle le rôle de la source alimentaire sur la composition du microbiote gastro-intestinal. Chez la crevette des sources hydrothermales *Rimicaris exoculata*, le microbiote gastro-intestinal est composé principalement de Deferribacteres, Mollicutes, Epsilonproteobacteria et Gammaproteobacteria, constituant un microbiote résidentiel stable, miroir de l'environnement de l'hôte (Durand et al., 2010). En cas de long jeun en captivité, une modification des compositions des communautés bactériennes est observée chez cette espèce, les abondances en Deferribacteres diminuent au profit de Gammaproteobacteria, mettant en exergue l'impact de l'alimentation et inversement, du jeun, sur le microbiote gastro-intestinal.

Chez les holothuries (échinodermes), le changement de régime alimentaire, et notamment l'ajout de compléments alimentaires en aquaculture, modifie la composition du microbiote gastro-intestinal (Yang et al., 2015). Chez les larves d'échinodermes, en éclosure, un mauvais rationnement alimentaire ou une mauvaise qualité nutritionnelle conduisent à des malformations et des mortalités massives chez les larves d'oursins. Une mauvaise alimentation se traduit *in fine* par des dysbioses chez les larves et une diminution des performances zootechniques (Carrier and Reitzel, 2018). Ces observations sont valables pour l'ensemble des élevages larvaires en aquaculture.

### Pathologie et conséquences sur le microbiote

Chez de nombreux invertébrés marins, l'évolution d'une pathologie a pour conséquence une modification des microbiotes des compartiments anatomiques affectés. Ces modifications du

microbiote s'accompagne d'une diminution de la richesse et la diversité, traduisant le développement des microorganismes pathogènes et/ou opportunistes, et conduisent, inexorablement, à une dysbiose.

Chez les échinodermes, l'impact de la maladie sur le microbiote a été décrit chez les étoiles de mer et les oursins, et notamment la cinétique des modifications du microbiote. C'est notamment le cas chez l'étoile de mer *Pisaster ochraceus* confrontée à la maladie « Sea Star Wasting Disease » (Lloyd and Pespeni, 2018), où la richesse et la diversité du microbiote diminuent avec l'évolution de la maladie. L'abondance des OTUs affiliés au genre *Pseudoalteromonas*, corrélée avec des animaux sains, diminue au profit de taxons opportunistes tels que *Phaeobacter*, *Tenacibaculum* et *Polaribacter*. Ces trois genres sont décrits comme associés à des pathologies chez les animaux marins (Makridis et al., 2021; Avendaño-Herrera et al., 2006; Bowman, 2006).

Chez le pectinidé *Patinopecten yessoensis*, des mortalités estivales massives sont enregistrées en Chine depuis quelques années et provoquent des pertes importantes (Yu et al. 2019). La comparaison des microbiotes de différents tissus entre individus sains et malades fait ressortir des différences de composition, à savoir une diminution des *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Deinococcus-Thermus* et *Cyanobacteria*, au profit du développement des genres *Vibrio* dans le manteau, *Francisella* dans le muscle adducteur et de *Photobacterium* dans l'intestin (Yu et al. 2019).

En outre, chez les mollusques bivalves, le POMPS (Pacific Oyster Mortality Syndrome) affecte le microbiote de l'huître creuse *C. gigas* et engendre des mortalités massives sur le littoral. De récentes études, conduites sur des familles de *C. gigas* sélectionnées comme étant « sensibles » ou « résistantes », ont démontré le lien entre la composition du microbiote et la résistance à la maladie, et notamment la présence et stabilité de taxa spécifiques responsables de la santé ou « fitness » de l'hôte, parmi lesquels les *Cyanobacteria* (Subsection III, family I), les *Mycoplasmataceae*, les *Rhodobacteraceae*, and les *Rhodospirillaceae* (Clerissi et al., 2020, 2018). A l'inverse, les genres opportunistes *Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Psychrobium* et *Vibrio* sont plus abondants dans les huîtres sensibles.

Ces résultats montrent l'impact du développement d'une maladie chez les invertébrés marins, provoquant des modifications dans les communautés bactériennes des microbiotes et un développement des bactéries opportunistes, conduisant à une dysbiose et un aggravement de la maladie (septicémie). Par ailleurs, il ressort que certaines souches bactériennes des microbiotes sont associées à la santé de l'hôte, par des mécanismes qui restent encore inconnus.

## Impact des pressions anthropiques sur les microbiotes

Les activités anthropiques impactent les écosystèmes marins et, *in fine*, impactent les invertébrés marins qui les colonisent. Parmi les pressions les plus largement connues, le réchauffement climatique et l'acidification des océans sont les conséquences de l'industrialisation et la production de gaz à effet de serre. Les coraux sont des organismes sensibles à d'infimes variations de pH ou de température. Des modifications de leur écosystème peuvent engendrer le phénomène de « blanchiment des coraux », qui se traduit par la perte de leurs symbiotes et donc de la mort de l'holobionte corallien (Rosenberg et al., 2007). Cependant, des études sur les coraux mettent en avant l'adaptation des holobiontes face à ces stress environnementaux. Des travaux ont été conduits afin de sélectionner des souches du corail *Pocillopora damicornis* thermo-tolérantes, dotées d'un microbiote présentant une plus grande plasticité (Brener-Raffalli, 2017).

De la même façon, des études sur les éponges *Stylissa flabelliformis* et *Coelocarteria singaporensis* ont montré que des spécimens vivant à proximité de volcans sous-marins produisent de grande quantité de CO<sub>2</sub> et sont plus tolérants à l'acidification que des individus de la même espèce vivant dans un récif éloigné des volcans. Ces adaptations sont liées à la composition des microbiotes et la présence de symbiotes spécialisés qui contribuent à la plasticité et la souplesse adaptative de l'holobionte (Botté et al., 2019).

Outre ces modifications physiques de l'environnement, les contaminations chimiques et organiques provoquent des effets irréversibles chez les holobiontes marins. Ainsi, la présence de pesticides, et notamment l'atrazine, herbicide très largement employé dans le monde (interdit en Europe depuis 2003 mais encore couramment utilisé aux Etats-Unis) impactent les écosystèmes terrestres et aquatiques (de Albuquerque et al., 2020). Chez *Crassostrea virginica*, l'exposition chronique à l'atrazine entraîne une modification du microbiote des stocks de reproducteurs dans le milieu naturel, et se traduit par une perte des espèces mutualistes au profit de souches pathogènes, conduisant à un affaiblissement des populations naturelles et une baisse du recrutement (Britt et al., 2020).

Les métaux lourds tels que le cuivre ou le nickel, fréquemment retrouvés dans les sédiments estuariens, constituent également une source de pollution rémanente dans les écosystèmes. Des tests en mésocosmes ont démontré l'impact du nickel et du cuivre dissous sur les communautés bactériennes des microbiotes des coraux. De fortes concentrations en cuivre et nickel provoquent une diminution des *Endozoicomonadaceae* à l'inverse une augmentation des *Flavobacteriaceae* et *Rhodobacteraceae* dans le microbiote corallien, traduisant un stress qui conduit à la perte de leur symbiote *Symbiodinium* sp. et, *in fine*, le blanchiment des coraux (Gissi et al., 2019).

D'autres pollutions et sources de nuisances, telles que les engrais agricoles provoquant l'eutrophisation des estuaires, la construction de structures offshore d'énergie marine renouvelable, ou les activités maritimes, vont provoquer des modifications des conditions biotiques et abiotiques dans les habitats, et donc, constituer des sources de perturbation possibles des microbiotes des invertébrés marins.

Par ailleurs, l'impact de l'aquaculture marine sur le microbiote d'invertébrés vivant à proximité a été caractérisé. Ainsi, le microbiote intestinal d'individus de *Patella caerulea*, trouvés à proximité de cages de bars, est moins riche et diversifié que celui d'individus de la même espèce en zone non cultivée. De plus, le microbiote des patelles proches des cages acquiert de nouvelles communautés bactériennes telles que des souches pathogènes de poissons, pouvant ainsi constituer un potentiel réservoir biologique de pathogènes pour les élevages (Palladino et al., 2021).

### Des associations fonctionnelles chez les invertébrés marins

De nombreuses études exposent les services rendus par le microbiote à l'hôte, notamment le core microbiote (Lemanceau et al., 2017).

Chez les coraux, près de 17 % des symbiotes composent le core microbiote (van Oppen and Blackall, 2019; Hernandez-Agreda et al., 2017, 2016; Ainsworth et al., 2015; Rosenberg et al., 2007), parmi lesquels des symbiotes obligatoires tels que *Symbiodinium*, dinoflagellé photosynthétique impliqué notamment dans les transferts de molécules carbonées et d'oxygène vers l'hôte corail (Rosenberg et al., 2007). En fonction des tissus colonisés, les symbiotes sont possiblement impliqués dans différentes fonctions de l'hôte, parmi lesquelles : la sécrétion de protéines associées à l'absorption de nutriments, le métabolisme énergétique ou le transport de métabolites (Ainsworth et al., 2015).

Un exemple original dans les associations symbiotiques fonctionnelles est la présence de *Vibrio fischeri* dans les cellules épithéliales du calmar *Euprymna scolopes*, avec une implantation précoce au stade juvénile. *V. fischeri* est une bactérie bioluminescente qui assure un rôle de camouflage, un système antiprédation et un réglage du rythme circadien chez l'hôte *E. scolopes* (Thompson et al., 2017; Visick and McFall-Ngai, 2000; McFall-Ngai, 1994). Cette association spécifique avec *V. fischeri* est également retrouvée d'autres espèces de céphalopodes.

La famille des *Endozoicomonadaceae* est souvent associée aux microbiotes des invertébrés marins, notamment des bivalves *Acesta sp.* et *Tridacna maxima* et différentes espèces méditerranéennes de gorgones, où elle joue probablement un rôle dans le cycle des nutriments (Jensen et al., 2021; Rossbach et al., 2019; Van de Water et al., 2017).

## 1.3 Du microbiote à l'hôte holothurie

### 1.3.1 Le phylum des échinodermes

#### Classification

L'apparition des premiers échinodermes date du Cambrien (Ere Paléozoïque, -550 à -500 MA), période durant laquelle la vie marine foisonne dans les océans et les invertébrés prolifèrent, avec une variété des formes et des plans d'organisation. Le « groupe taxonomique des échinodermes » est décrit au 18ème siècle par le taxonomiste allemand Jacob Theodor Klein, puis enrichi par Mortensen de descriptions anatomiques basées sur le squelette permettant la création du phylum au début du 20ème siècle (Lawrence, 2020). Au sein du clade Bilateria, les échinodermes (Echinodermata) appartiennent aux deutérostomiens, avec les chordés et les hémichordés (fig. 10) (Hirth, 2010).

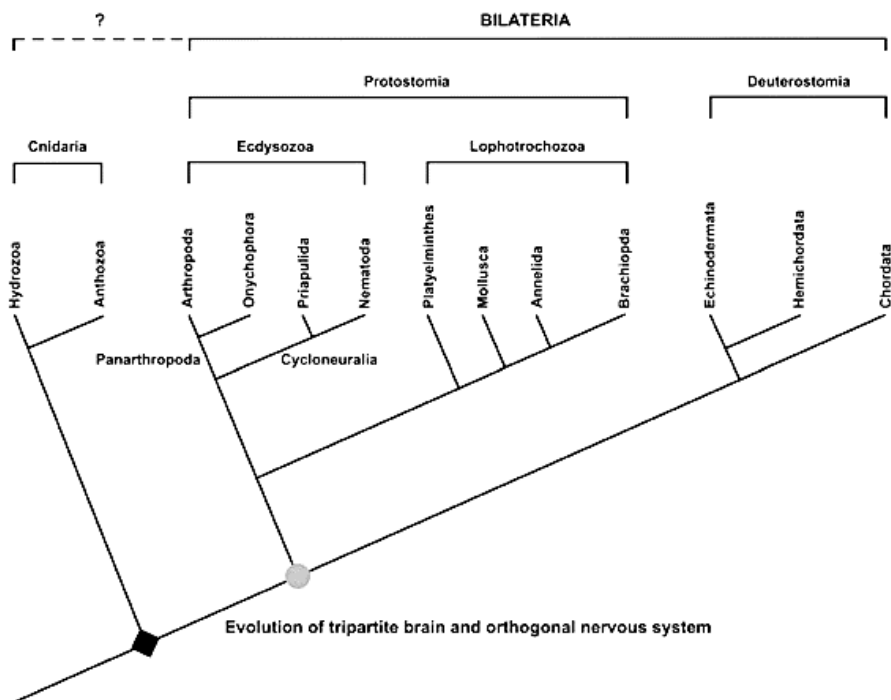


Fig. 10 : Positionnement phylogénétique des Echinodermata dans le clade des Bilateria (Hirth, 2010)

Le phylum des échinodermes est subdivisé en 5 classes : les Asteroidea (étoiles de mer), les Echinoidea (oursins), les Crinoidea (crinoïdes), les Ophiuroidea (ophiures) et les Holothuroidea (concombres de mer) (Reich et al., 2015 ; Littlewood et al., 1997) (fig. 11).



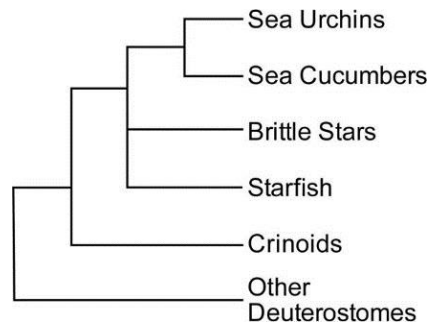


Fig. 11 : Classification phylogénétique la plus probable des 5 classes du phylum des Echinodermata (Vaughn et al., 2012)

Du fait de l'arrivée des techniques moléculaires, la classification du phylum des échinodermes a été revue mais reste encore discutée. Seule la position de la classe des Crinoidea est partagée entre les auteurs, à la fois selon des critères morphologiques (stades larvaires et adultes) et génétiques (Arnone et al., 2015; Vaughn et al., 2012; Littlewood et al., 1997) (fig. 11).

### Biologie et morphologie des échinodermes

Le phylum des échinodermes est composé d'animaux exclusivement marins et la plupart d'entre eux sont benthiques. Ce sont des métazoaires triploblastiques disposant de caractéristiques morphologiques propres au phylum, notamment une symétrie généralement pentaradiée, un endosquelette appelé stéréome constitué de plaques de calcite ( $\text{CaCO}_3$ ), un tissu conjonctif mutable et un système aquifère. Leurs organes internes sont situés dans la cavité coelomique, remplie de liquide coelomique (fig. 12).

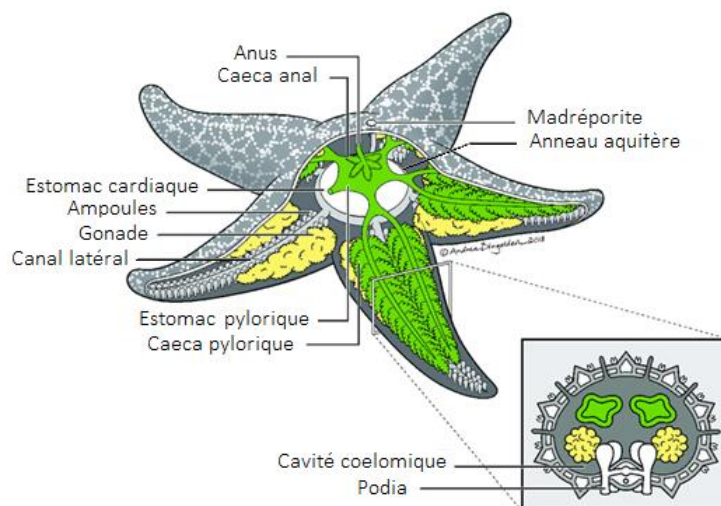


Fig. 12 : Anatomie générale interne d'une étoile de mer (Asteroidea). Légende traduite d'après Jackson et al. 2018. Code couleur : le système digestif est en vert et les organes reproducteurs en jaune et le système aquifère en gris.

Parmi les spécificités anatomiques des échinodermes, la présence du système aquifère, qui constitue un véritable système circulatoire composé de canaux dans lesquels circule l'eau aspirée par la plaque madréporaire. Ce système assure diverses fonctions physiologiques depuis les échanges gazeux, la motricité ou encore la défense (Binyon, 1972; Boolootian, 1966). Grâce aux variations de pressions dans le système, les podia vont se développer, se contracter ou se gonfler, et permettre la nutrition, la respiration, la locomotion et l'adhérence de l'animal.

Ce sont des animaux gonochoriques, à fécondation externe, présentant des stades larvaires pélagiques caractéristiques.

Actuellement, les échinodermes sont très étudiés par les scientifiques, et de nombreuses molécules d'intérêt ont été isolées à partir de ces animaux marins (Kelly, 2005) et notamment des molécules à pouvoir anti-tumoral (Wijesinghe et al., 2013), à propriétés antibactériennes (León-Palmero et al., 2018; Kiew and Don, 2012; Haug et al., 2002), ou encore antifongiques (Kumar et al., 2007). Certaines espèces sont plus simplement pêchées pour l'alimentation humaine (oursins et holothuries).

### Les holothuries : des animaux très convoités

La classe des Holothuroidea compte historiquement trois sous-classes, basées sur des critères morphologiques : les Apistochirotacea, les Apodacea et les Dendrochirotacea, eux-mêmes subdivisés en six ordres (Smirnov, 2019; O'Hara and Byrne, 2017; Smirnov, 2016; Samyn, 2003). Cette classification est actuellement remise en cause en raison du développement des outils de biologie moléculaire (Miller et al., 2017; Kamarudin et al., 2010).

Les holothuries, aussi appelées concombre de mer ou encore bêche-de-mer, sont des animaux d'aspect vermiforme, à symétrie pentaradiée et bilatérale secondaire (Koehler, 1921). L'animal est orienté selon un axe bucco anal, et peut mesurer jusqu'à trois mètres chez certaines espèces. Les holothuries possèdent des tentacules buccaux sur leur extrémité orale, organes servant à l'alimentation. L'alimentation des holothuries diffère d'une espèce à l'autre, la plupart étant des détritivores, d'autres sont des brouteurs ou filtreurs. Elles sont majoritairement benthiques et vagiles, plus rarement sessiles.

Certaines espèces d'holothuries sont très recherchées, elles constituent un met de luxe traditionnel en Asie, commercialisées sous le nom de « trévang », avec des prix de vente pouvant atteindre 600\$/kg poids sec. De fait, elles représentent un marché important et un produit à très forte valeur ajoutée (Purcell et al., 2013, 2012; Battaglione et al., 1999; Conand and Byrne, 1993). Par ailleurs, les holothuries sont également utilisées en médecine traditionnelle en Asie pour leurs qualités nutritionnelles (Vergara and Rodríguez, 2016), mais aussi en biotechnologie (Janakiram et al., 2015; Kiew and Don, 2012; Kumar et al., 2007).

Du fait de la forte demande, la production mondiale (pêche et aquaculture) est en constante évolution (fig. 13). L'augmentation de la demande sur les espèces commercialisées et l'exploitation anarchique des ressources naturelles ces dernières décennies ont conduit à un effondrement des stocks sauvages dans le Pacifique, et certaines espèces sont à présent classées comme espèces menacées par la CITES (Rawson and Hoagland, 2019; Shedrawi et al., 2019; Devanadera et al., 2015; Hamel et al., 2013; Purcell et al., 2013; Anderson et al., 2011; Otero-Villanueva and vu, 2007; Ramofafia et al., 2003). Plus récemment, les surpêches de *Cucumaria frondosa*, nouvelle espèce d'intérêt, dans la zone Atlantique Nord-Ouest relance le débat sur la gestion des stocks et la protection des espèces sauvages (Gianasi et al., 2020; Nelson et al., 2012).

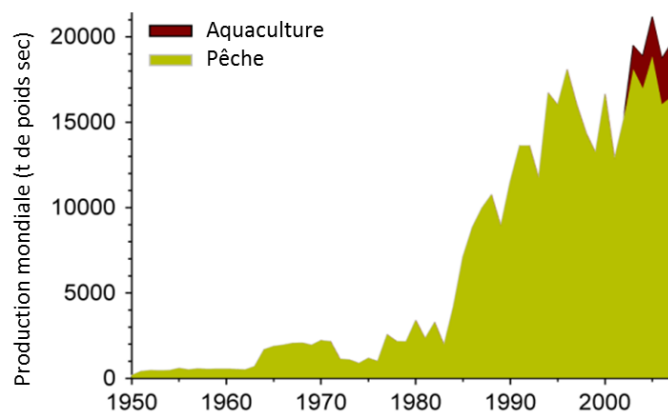


Fig. 13 : Production mondiale d'holothuries, issues de la pêche et de l'aquaculture (d'après Purcell et al. 2013).

### L'holothuriculture

Face à la diminution des stocks naturels dans les principales régions consommatrices, l'holothuriculture s'est développée dans les années 1980 pour les espèces indo-pacifiques. Des fermes et écloséries aquacoles produisent en routine des juvéniles d'holothurie, comme l'espèce japonaise *Apostichopus japonicus* en Chine et au Japon (Soliman et al., 2013; Akamine, 2004; Ito and Kitamura, 1997), ou encore *Holothuria scabra* dans la région indo-pacifique (Medagedara et al., 2019; Mazlan and Hashim, 2015; Knauer, 2011; Hamel et al., 2001; Battaglione et al., 1999). Le cycle de production des holothuries est constitué de trois phases principales (fig. 14) :

- la phase éclosion : sélection des géniteurs, reproduction artificielle contrôlée, incubation embryonnaire (des premières divisions au stade gastrula), élevage larvaire (gastrula, auricularia, doliolaria et pentactula), métamorphose et fixation des larves sur des supports ;
- la phase micronurserie : élevage des juvéniles sur leurs supports de fixation, en système inland ;

- la phase de prégrossissement et grossissement : passage en mer dans des cages lorsque les juvéniles ont atteint une taille suffisante.

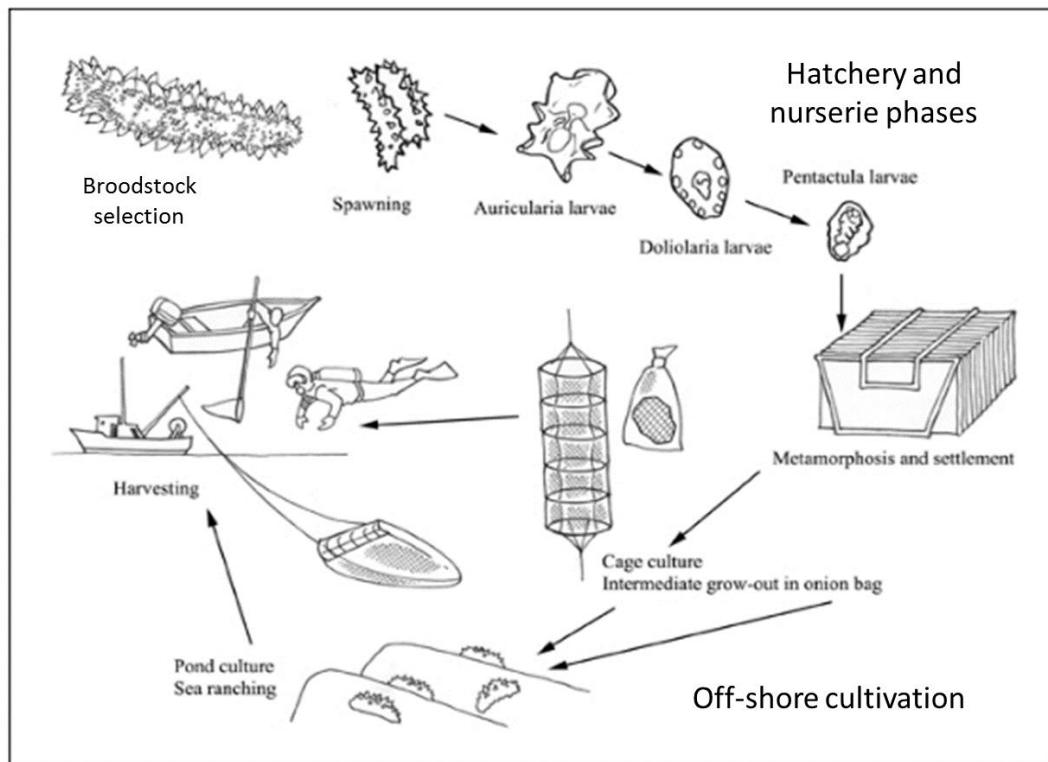


Fig. 14 : cycle de production des holothuries tropicales (modifié d'après FAO, 2009)

Du fait de la surexploitation des espèces tropicales, les espèces européennes sont actuellement ciblées par le marché asiatique (González-Wangüemert, 2018), et certaines espèces méditerranéennes font à présent l'objet de surpêche.

Dans ce contexte, le développement de l'holothuriculture en Europe apparaît comme une voie d'avenir permettant, d'une part, d'approvisionner le marché asiatique dont la demande est en constante progression, et, d'autre part, de créer de nouvelles activités sur le littoral, et, de fait, préserver et/ou restaurer les gisements naturels. Seules quelques espèces européennes ont été décrites et ont fait l'objet de premiers essais de domestication, telles que *H. arguinensis* (Marquet et al., 2017; Domínguez-Godino et al., 2015), *H. tubulosa* (Rakaj et al., 2018), *H. mammata* (Domínguez-Godino and González-Wangüemert, 2018; Marquet et al., 2017), *H. polii* (Rakaj et al., 2019) et *H. forskali* (Laguerre et al., 2020). Cependant, leur production aquacole reste à une échelle pilote.

En outre, de part leur comportement alimentaire dépositivore détritivore et leur rôle de bioturbateur (Uthicke, 1999), les holothuries apparaissent aussi comme des candidats intéressants pour le développement de systèmes aquacoles plus durables, notamment en aquaculture intégrée

multitrophique (IMTA) (Tolon et al., 2017; Chopin, 2013; MacDonald et al., 2013; Yokoyama, 2013; Zamora and Jeffs, 2013; Slater and Carton, 2009; Paltzat et al., 2008; Zhou et al., 2006).

### 1.3.2 *Holothuria forskali*, une nouvelle espèce d'intérêt pour l'aquaculture et les biotechnologies

*Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823) est une espèce endémique des côtes bretonnes (fig. 15), présente en Atlantique et Mer du Nord, depuis l'Irlande jusqu'au Nord de l'Afrique, et en Méditerranée (données INPN, [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/28454](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/28454)).



Fig. 15 : *Holothuria forskali* dans son habitat (photos : C. Jegou, LBCM)

Son biotope est caractérisé par des fonds rocheux, colonisés par les laminaires et des algues encroustantes (fig. 15), dans des zones battues à semi-battues. *H. forskali* est observée préférentiellement sur les parois verticales, de -1 à -100 mètres de profondeur. Son régime alimentaire est assez mal connu, tantôt décrite comme détritivore – psammivore (David et al., 2020; Uthicke, 1999), et parfois comme brouteur de biofilm. Récemment, David et al. ont caractérisé les sources alimentaires en fonction des profils d'acides gras et de pigments contenus dans l'intestin : il montre la présence de microalgues (diatomées), l'absence de macroalgues fraîches et la présence d'acides gras inhabituels (longues chaînes monoinsaturées), et conclut à un contenu intestinal de haute qualité nutritionnelle (David et al., 2020).

*H. forskali* possède la particularité d'émettre des tubes de Cuvier en cas de stress, filaments tubulaires blancs extrêmement collants et urticants, ayant pour objectifs de faire fuir les potentiels prédateurs. Cependant, si le niveau de stress s'intensifie, elle peut s'auto-éviscérer volontairement, et éjecter ainsi une partie de ses organes vitaux – auquel cas elle peut les régénérer – ou l'ensemble, provoquant alors la mort de l'animal (Rinkevich and Matranga, 2009; Garcia-Ararras and Greenberg, 2002). Comme tous

les échinodermes, *H. forskali* est gonochorique, avec un cycle de reproduction annuel au printemps en Atlantique Nord-Est (Laguerre et al., 2020; Santos et al., 2015; Tuwo and Conand, 1992), avec une ponte synchrone chez les mâles et les femelles. La fécondation est externe et va donner lieu à un développement embryonnaire et des stades larvaires caractéristiques des échinodermes (Laguerre et al., 2020).

### 1.3.3 Les microbiotes des holothuries

#### Généralités

Chez les holothuries, les études sont focalisées principalement sur l'espèce la plus commercialisée, à savoir *Apostichopus japonicus* (Wang et al., 2018; Ye et al., 2018; Gao et al., 2017a), et ciblent plus précisément le microbiote gastro-intestinal. Quel que soit l'hôte holothurie concernée, les Proteobacteria dominent en terme d'abondance dans les microbiotes (Gao et al., 2017a; Kim et al., 2017). Chez l'holothurie japonaise *A. japonicus*, la présence de bactéries spécifiques a été montrée dans les taxons des Epsilonproteobacteria et Rickettsiales (Enomoto et al., 2012). La dominance des Proteobacteria (Kim et al., 2017) et plus précisément de la classe des Alphaproteobacteria et des genres *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et de la famille des *Flavobacteriaceae* est décrite (Kim et al., 2017; Enomoto et al., 2012).

#### Microbiote gastro-intestinal

Le microbiote gastro-intestinal de *A. japonicus* est principalement constitué de Gammaproteobacteria, parmi lesquelles le genre *Vibrio* majoritairement, et les genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Enterobacter* (Gao et al., 2017a; Bogatyrenko and Buzoleva, 2016; Sha et al., 2016; Gao et al., 2014a). Les différentes parties, depuis l'estomac jusqu'à l'intestin postérieur, présentent des microbiotes distincts (Gao et al., 2014; Enomoto et al., 2012) (fig. 16), résultat également observé également chez *Holothuria atra* (Ward-Rainey et al., 1996), *H. scabra* (Plotieau et al., 2013) et *H. glaberrima* (Pagán-Jiménez et al., 2019). Ainsi, chez *A. japonicus*, l'intestin antérieur comporte davantage d'Acidobacteria, dont l'abondance relative diminue dans l'intestin postérieur (Gao et al., 2014), chez *H. glaberrima*, les intestins antérieur et médian sont composés principalement de Proteobacteria et de Bacteroidetes, tandis que l'intestin postérieur est majoritairement composé de Firmicutes et de Bacteroidetes (Pagán-Jiménez et al., 2019). De plus, chez *H. scabra*, il est démontré une variation de la concentration en bactéries le long du système digestif, avec des concentrations plus importantes sur la partie antérieure en comparaison avec la partie médiane (Plotieau et al., 2013), résultat confirmé par des approches culture-dépendantes chez *H. atra* (Ward-Rainey et al., 1996).

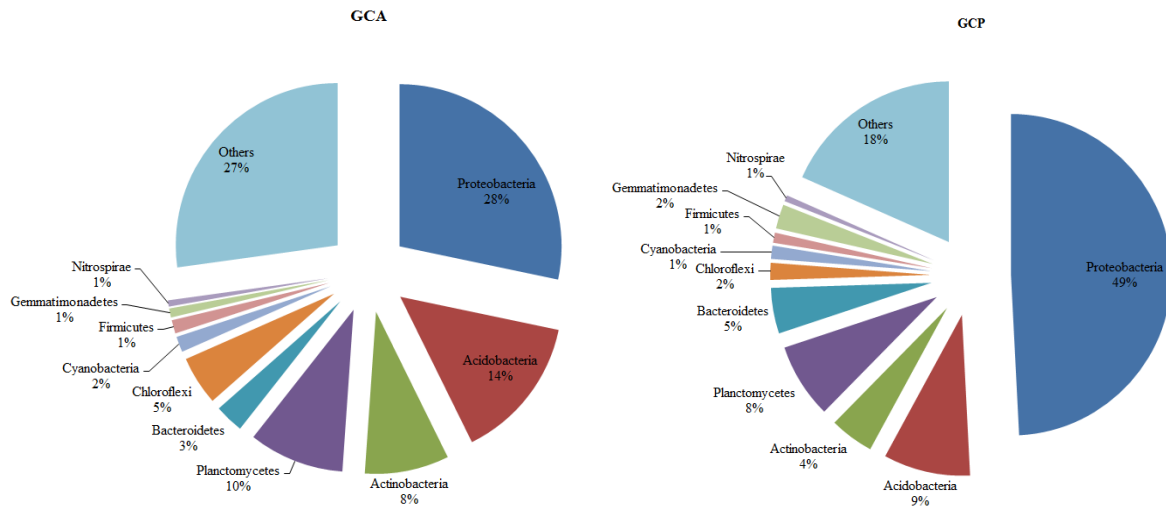


Fig.16 : Composition du microbiote gastro-intestinal antérieur (GCA) et postérieur (GCP) chez *Apostichopus japonicus* (source : Gao et al. 2014)

L'exploration de ce microbiote gastro-intestinal chez les holothuries répond également à des préoccupations aquacoles, et notamment sur la compréhension des performances de croissance. Ainsi, la composition des communautés bactériennes de fèces d'holothuries *A. japonicus* présentant les meilleures croissances diffère significativement de celle des fèces des holothuries ayant des croissances moindres (Yamazaki et al., 2016).

Plus récemment, le processus de régénération du système digestif et de son microbiote associé, après auto-éviscération volontaire, a été étudié, chez *Sclerodactyla briareus* (Weigel, 2020) et *A. japonicus* (Yamazaki et al., 2020; Zhang et al., 2019). Il en ressort, chez ces 2 espèces, des étapes clés au processus de régénération associées à des taxons bactériens spécifiques. Tout d'abord, les communautés bactériennes de l'intestin et des fèces post et pré-éviscération sont différentes, et évoluent au cours de la régénération. Pendant la régénération, les Bacteroidota et les Rhodobacterales augmentent significativement dans l'intestin de *A. japonicus* (Zhang et al., 2019) et les *Alteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Oceanospirillaceae* dans leurs fèces (Yamazaki et al., 2020). Chez *S. briareus*, les microbiotes de l'estomac et de l'intestin suivent des régénérations différentes en terme de compositions, et diffèrent également de l'environnement de l'hôte (Weigel, 2020). L'étude de ces processus de régénération de l'intestin et de ses microbiotes met en exergue les interactions hôte – microbiote, et démontrent à la fois la spécificité des bactéries associées, mais aussi la sélection de ce microbiote dans l'holobionte.



### Microbiote cœlomique

La description du microbiome cœlomique reste rare chez les échinodermes, et encore plus chez les holothuries. Quelques auteurs explorent le microbiote cœlomique cultivable et non-cultivable par metabarcoding (Offret et al., 2019; León-Palmero et al., 2018; Kim et al., 2017; Enomoto et al., 2012). Les compositions des microbiotes intestinaux et cœlomiques de *H. forskali* (n=2) et *H. tubulosa* (n=2) sont différentes entre elles et avec les communautés bactériennes de l'eau de mer. De plus, les bactéries de la famille des *Flavobacteriaceae* sont largement majoritaires.

### Un microbiote source de souches probiotiques

Le microbiote cultivable des invertébrés marins et notamment celui des holothuries est une source de candidats potentiels biotechnologiques (Chen et al., 2021; Offret et al., 2019). Dans la revue de Chen, il est mentionné que 78 genres bactériens ont été décrits comme cultivables chez les holothuries (Chen et al., 2021).

Des candidats probiotiques ont été isolés à partir des microbiotes gastro-intestinaux des holothuries, et surtout chez *A. japonicus* (Bogatyrenko and Buzoleva, 2016; Chi et al., 2014). En effet, des souches bactériennes cultivables assimilées à des genres probiotiques connus tels que les *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Pseudomonas*, ont été isolées de l'intestin de *A. japonicus*, où elles peuvent contribuer à la fonction digestive de l'hôte (Ye et al., 2018; Bogatyrenko and Buzoleva, 2016; Chi et al., 2014). Des souches antibactériennes appartenant aux genres *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, et *Shewanella* ont également été isolées dans le microbiote gastro-intestinal (Wang et al., 2018; Chi et al., 2014; Farouk et al., 2007).

Les travaux de León-Palmero et al. 2018 ont démontré des activités antibactériennes et anti-fongiques pour certaines des souches isolées à partir du liquide cœlomique de *H. forskali* et notamment *B. subtilis* group, *Vibrio alginolyticus* group et *Pseudoalteromonas tetraodonis*. Par ailleurs, des études conduites au LBCM ont démontré une activité antibactérienne pour environ 10 % des souches isolées dans le liquide cœlomique de *Holothuria forskali* (Offret et al., 2019), et que ces souches appartenant majoritairement au genre *Vibrio* et *Pseudoalteromonas*.



## 1.4. Objectifs de la thèse

### 1.4.1 Objectifs

La thèse « Microbiote des Echinodermes : Spécificité et plasticité des microbiotes chez *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) » a pour objectif principal l'étude du microbiote des échinodermes, et plus particulièrement de celui de l'holothurie noire endémique *H. forskali*.

La thèse est organisée en six chapitres, correspondant à un questionnement progressif sur le microbiote de *H. forskali* :

- Existe-t-il un microbiote spécifique chez les échinodermes ?
- Existe-t-il des variabilités anatomiques du microbiote de *H. forskali* ?
- Comment évolue ce microbiote au cours du cycle de vie ?
- Le régime alimentaire influence-t-il le microbiote en aquaculture ?
- Peut-on détecter des bactéries pathogènes dans le microbiote ?
- Le microbiote cultivable : quelles sont les concentrations et y-a-t-il des souches présentant des activités ?

Ainsi, les trois premiers chapitres aborderont la question de la spécificité et de la variabilité du microbiote de *H. forskali* à différentes échelles : échelle de l'espèce, échelle intra-anatomique, échelle temporelle et échelle spatiale. Ces différentes analyses visent à estimer le degré de spécificité et de plasticité du microbiote de *H. forskali*. Pour répondre à ces questions, des campagnes de prélèvement dans le milieu naturel ont été menées, entre décembre 2018 et novembre 2020, sur deux sites en Finistère (Bretagne, France). Au total, 15 collectes ont été réalisées.

Ensuite, une exploration du microbiote sera réalisée dans un objectif d'ouverture vers l'aquaculture : une première étude sur le lien entre pratiques zootechniques et microbiote, et une seconde étude sur la détection de potentiels pathogènes en aquaculture. Ces travaux ont été réalisés en partenariat avec des structures aquacoles.

Finalement, un chapitre sera consacré à l'étude du microbiote cultivable de *H. forskali* et à la constitution d'une souchothèque de souches bactériennes présentant des activités agarolytiques, protéolytiques et antibactériennes.

### 1.4.2 Méthodologie générale

Pour analyser le microbiote, deux approches ont été conduites en parallèle (fig. 17) : (i) l'analyse du microbiote dit « total » par Metabarcoding 16S et séquençage Illumina MiSeq, et (ii) une approche culture-dépendante. Lors de chaque collecte, les échantillons sont prélevés en duplicata, et une part des échantillons est cultivée en microbiologie pasteurienne classique, et la seconde partie est analysée par métagénomique. Pour se faire, l'ADN bactérien des échantillons est extrait, les échantillons sont ensuite envoyés à la plateforme AnaEE (Grenoble, France) pour préparation des bibliothèques, et envoyés à l'entreprise Fasteris (Suisse) pour la prestation de séquençage.

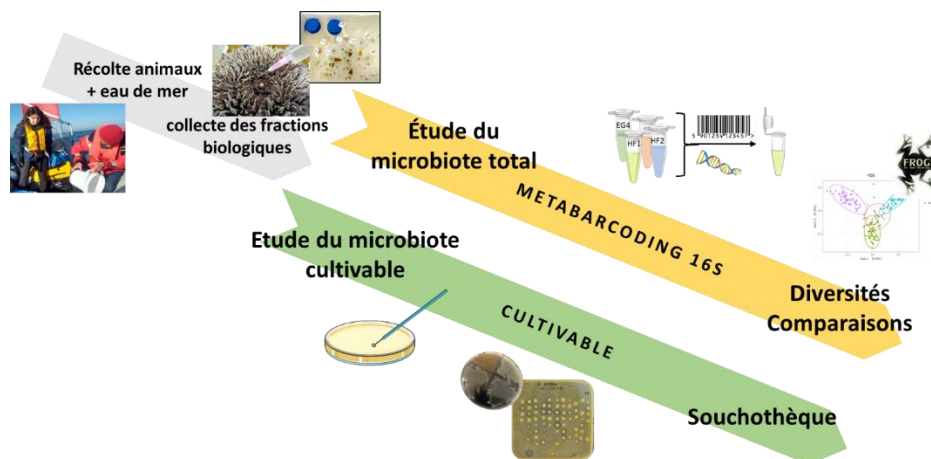


Fig. 17 : Principe général du protocole d'échantillonnage du microbiote et de traitement des données de metabarcoding 16S en bioinformatique

### 1.4.3 Le projet HoloFarm

Les travaux de la thèse contribuent à l'acquisition de connaissances dans le cadre d'un projet collaboratif, HOLOFARM, financé par le FEAMP (Fond Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche, mesure 47 / innovation aquaculture). Le projet HOLOFARM (2018 – 2021) a pour objectif d'initier une nouvelle filière de production aquacole, l'holothuriculture, basée sur la maîtrise de la reproduction et l'élevage de l'holothurie noire *H. forskali* (échinodermes). Un des axes du projet « WP4 : Microbiote associé et prévention de pathologie » consiste à réaliser un inventaire du microbiote de *H. forskali* et constituer une souchothèque de candidats probiotiques, ces travaux seront alimentés par les travaux de thèse. Ce projet collaboratif regroupe des partenaires académiques et des professionnels : Agrocampus Ouest site de Beg-Meil, Muséum national d'histoire naturelle (Station marine de Concarneau), Laboratoire de Biotechnologies et Chimie marines (UBO), Station Biologique de Roscoff (UPMC – CNRS), l'entreprise aquacole AQUA B et le Comité Régional de la Conchyliculture Bretagne Nord.





# **Chapitre 1**

## Spécificité du microbiote cœlomique de trois échinodermes



## 2. Spécificité du microbiote cœlomique de trois échinodermes : le concombre de mer *Holothuria forskali*, l'étoile de mer *Marthasterias glacialis*, et l'oursin *Sphaerechinus granularis*

### 2.1 Préambule

L'objectif de ce premier chapitre est d'établir la composition du microbiote de trois espèces d'échinodermes (fig. 18) et déterminer s'il existe une spécificité du microbiote vis-à-vis d'un hôte. Une présentation du liquide cœlomique est proposée en préambule, suivie d'un article soumis au journal ASM / Applied Environmental Microbiology.



Fig. 18 : les trois échinodermes de l'étude. A : l'holothurie *Holothuria forskali*. B : l'étoile de mer *Marthasterias glacialis*. C : l'oursin *Sphaerechinus granularis*.

#### 2.1.1 Le liquide cœlomique, un compartiment clé pour l'immunité de l'hôte

Le liquide cœlomique est le fluide remplissant la cavité cœlomique des échinodermes (Smith et al., 2019; Kurek et al., 2007), dans lequel baignent les organes de ces animaux. Il contribue à la circulation des métabolites, nutriments et coelomocytes, à l'immunité et au maintien de l'homéostasie. Le liquide cœlomique a un pH de 7.8 et une salinité de 34 ‰ chez *H. leucospilota* (Chia & Xing 1996). Il est le compartiment clé de l'immunité des Echinodermes, responsable de la réponse immunitaire cellulaire dont les médiateurs sont les coelomocytes, et de la réponse humorale, relayée par des molécules comme les lectines (Smith et al., 2018; Chen et al., 2015; Matranga, 1996).

Les coelomocytes, cellules différenciées du liquide cœlomique, sont impliqués dans les fonctions de la réponse immunitaire cellulaire telles que la phagocytose, l'encapsulation, la production de peptides antimicrobiens et la cytotoxicité envers des bactéries pathogènes ou des molécules exogènes, et sont également indispensables aux processus de cicatrisation et de biodéfense (Dang et al., 2019; Smith et al., 2018; Chen et al., 2015) (fig. 19). Ce sont donc des médiateurs de l'immunité chez les échinodermes.

Ils participent à d'autres fonctions et au maintien de l'homéostasie : échanges gazeux, transport et stockage de nutriments, production de tissu conjonctif, ou encore excrétion de déchets métaboliques (Chen et al., 2015; Eliseikina and Magarlamov, 2002). Du fait de leur activité sur la cicatrisation, ils jouent un rôle important dans le processus de régénération, caractéristique des échinodermes (Weigel, 2020; Li et al., 2019; Chen et al., 2015). Ils seraient produits par les couches externes épithéliales de la cavité cœlomique, le tractus digestif, l'arbre respiratoire (Chen et al., 2015; Xing et al., 2008) et par les coelomocytes eux-mêmes (Gu et al., 2010; Ramirez-Gomez and Garcia-Arraras, 2010).

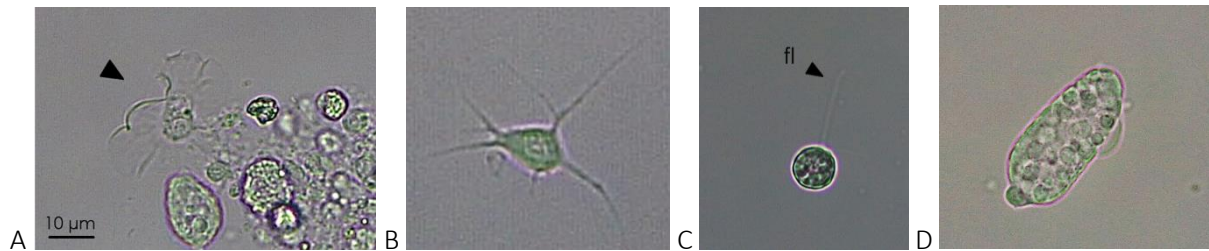


Fig. 19 : Photos de coelomocytes. A : Amoebocyte sous forme pétaloïde. B : Amoebocytes filopodial. C : Cellule vibratile et son flagelle (fl). D : Spherulocytes.

La preuve de concept du rôle de biodéfense assuré par les coelomocytes a été validée par la réalisation de greffes : rejet d'allogreffe et acceptation d'autogreffe chez les oursins et les étoiles de mer, il y a donc reconnaissance du soi et du non-soi (Smith et al., 2018; Ramirez-Gomez and Garcia-Arraras, 2010; Hildemann and Dix, 1972). Par ailleurs, en cas d'injection de corps étrangers dans la cavité cœlomique, des Holothuridés notamment, les corps étrangers sont encapsulés par les coelomocytes, agrégés et éliminés. Des « corps bruns foncés » apparaissent dans le liquide cœlomique, à la suite des encapsulations, témoins de l'activité des coelomocytes (par activité phénoxyase des coelomocytes et production de mélanine) (Smith et al., 2018; Dan-Sohkawa et al., 1995; Hetzel, 1965). Chez les Echinidés, les coelomocytes sont aussi responsables de la production de ROIs (reactive oxidant intermediates) et de phagocytose (Smith et al., 2018; Chen et al., 2015).

En cas d'injection de bactéries (potentiellement) pathogènes exogènes dans le liquide cœlomique, le nombre de bactéries pathogènes diminue ainsi que le nombre de coelomocytes, témoignant de l'élimination des bactéries exogènes par les coelomocytes (Smith et al., 2018; Chen et al., 2015).

Le liquide cœlomique est donc un compartiment clé pour les échinodermes, assurant des fonctions essentielles majeures (homéostasie, biodéfense, cicatrisation...) et hébergeant un microbiote associé.

## 2.2 Publication 1 (soumission à AEM)

### Plasticity and specificity of the cœlomic microbiota among three Echinoderms: the Sea Cucumber *Holothuria forskali*, the Sea Star *Marthasterias glacialis*, and the Sea Urchin *Sphaerechinus granularis*

Laguerre Hélène<sup>1</sup>, Offret Clément<sup>1</sup>, Noël Cyril<sup>2</sup>, Jegou Camille<sup>1</sup>, Yvin M. <sup>1</sup>, Fleury Y. <sup>1</sup>, Le Chevalier P. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Brest, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, F-29334 Quimper, France

<sup>2</sup> IFREMER-IRSI-Service de Bioinformatique (SeBiMER), 1625 Route de Sainte-Anne, 29280 Plouzané

---

**Key words:** Echinodermata, *Holothuria forskali*, *Sphaerechinus granularis*, *Marthasterias glacialis*, 16S rRNA, V4 Metabarcoding, microbiota, cœlomic fluid, antibacterial activity.

#### Abstract

In this study, the bacterial communities of the cœlomic microbiota were characterized in three Echinoderms: the deposit-feeder sea Cucumber *Holothuria forskali*, the grazer sea Urchin *Sphaerechinus granularis*, and the carnivorous sea Star *Marthasterias glacialis*. Samples were collected from the same habitat in the Glenan Archipelago (Brittany, France) at different times for 2 years. The cœlomic microbiota were analysed by both non-culturable approach with V4-16S Metabarcoding and by culturable approach with the isolation of strains and antimicrobial activity assays. Most of the OTUs of the cœlomic microbiota were affiliated to the phylum Proteobacteria and notably five orders: Burkholderiales, Flavobacteriales, Alteromonadales, Vibrionales and Pseudomonadales. Significant differences were observed regarding richness, biodiversity and composition between species and sampling dates. They could be explained by sub-abundant taxa that represented the global diversity. Cœlomic microbiota also revealed an important specific and unshared bacterial communities, validating a specific microbiota among the three Echinoderm species. Moreover, significant variations of the microbiota occurred among sampling dates, suggesting a high plasticity and thus a potential selection of these microbiota. Finally, out of the 831 bacterial strains isolated from culturable microbiota, 20 strains exhibited antibacterial activities, most of them assigned to the genera *Vibrio* and *Shewanella*.



## Importance

Echinoderms play an important role in all marine ecosystems, as bioturbation and organic matter recycling animals for detritivorous species. Moreover, exploration of their microbiota reveals interesting compounds for biotechnological issues such as antitumor, cytotoxic or antibacterial agents. The coelomic fluid constitutes a key compartment for immunity and homeostasis in Echinoderms, with specialized cells called coelomocytes, and also with the microbiota. The coelomic microbiota remains unexplored. In this study, we compared the coelomic microbiota of three Echinoderms, a sea urchin, a sea star and a sea cucumber, living in the same habitat in a marine protected area (Brittany, France), by both 16S metabarcoding and culture-based approaches. The results highlighted the existence of a coelomic microbiota specific from an echinoderm host, and varying according to time. 20 antibacterial strains were isolated from these microbiota and constituted potential probiotic candidates.

## INTRODUCTION

The Echinoderms are interesting organisms that taxonomically belong to the Deuterostomians with the Chordates, and diverging from other marine invertebrates of the Bilateria Clade such as Molluscs, Annelids or Arthropods that belonging to the Protostomians (1). The taxon “Echinoderms” was first described in the 18th century and then classified into an independent phylum by Mortensen in the 20th (2), and divided in 5 classes: the Asterozoa (sea stars), the Echinozoa (sea urchins), the Crinozoa (crinoids), the Ophiurozoa (brittle stars) and the Holothurozoa (sea cucumbers).

These marine organisms are identified by morphological characteristics, including a pentaradial symmetry, a calcium carbonate endoskeleton called stereom, a mutable connective tissue, and a water vascular system. Their body cavity is filled with the coelomic fluid, that plays an important role in metabolism, immunity and homeostasis (3,4). This immunity is provided by the coelomocytes that constitute cellular mediators for the immune response (5–7). Moreover, this biological compartment contains a specific microbiota that is especially implicated in the immunity response with bacteria producing antibacterial compounds (8–13). Some of these antibacterial strains, isolated from marine invertebrates, could be used in aquaculture as probiotics, to boost zootechnical performances (14–17), or to prevent diseases (18–20).

However, these culturable bacteria represent only a limited part of the total microbiota (21). With the development of the NGS technologies and the metabarcoding methods, research on microbiota has exploded (22–25), first on Sponges (26,27) and Corals (28,29), and then on Ascidiarians (30), Cnidarians (10,31) or Molluscs (32,33).

In Echinoderms, most of the studies explored the gut microbiota on commercial species, such as the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* (13,34,35) or the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (36). To date, the cœlomic microbiota remains under-explored.

The analysis of the cœlomic microbiota of a sea star exhibited a specific and selected microbiota compared with bacterial communities of ambient seawater (37), which was mostly composed of Proteobacteria, the order Alteromonadales (genus *Pseudoalteromonas*) (38), the families *Flavobacteriaceae* and *Rhodobacteraceae* (37,39). Moreover, the composition of these cœlomic microbiota exhibited specific and non-culturable families of bacteria. Otherwise, the existence of spatio-temporal variations and important inter- and intra-specific variations of this microbiota was also reported in Asteroidea (39).

In Holothuroidea, only a few studies have been conducted to define the culturable and non-culturable cœlomic microbiota (10,11,21,40,41). In *A. japonicus*, the composition of cœlomic microbiota was dominated by Proteobacteria and more precisely by the taxa *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* and *Flavobacteriaceae* (21,41), and the presence of unique bacteria from the Epsilonproteobacteria and Rickettsiales has been reported (21). In *Holothuria tubulosa* and *H. forskali*, from the NE Atlantic and the Mediterranean Sea, the composition of the pooled microbiota of intestines and cœlomic fluid differed between species and from seawater, and exhibited dominant OTUs from the *Flavobacteriaceae* (10). Furthermore, studies on culturable cœlomic microbiota showed a concentration around 10<sup>5</sup> CFU/ml for *H. forskali*, and permitted the isolation of antimicrobial and antifungal strains from both species (10,11).

This study aimed to explore the composition and diversity of the cœlomic fluid microbiota from three Echinodermata living in a same habitat in the NE Atlantic: the sea cucumber *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823), the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck, 1816), and the sea star *Marthasterias glacialis* (Linnaeus, 1758). The cœlomic microbiota were analysed by two complementary methods: the 16S Metabarcoding using Illumina MiSeq sequencing technology, and the culturable approach with strains isolation and antibacterial screening.

## RESULTS

The cœlomic microbiota of 15 animals per species and per sampling were collected at the same time and the same place, resulting in 180 samples of cœlomic microbiota and 12 samples of seawater.

### Sequencing information and quality control

3,088,247 paired-end sequences were assembled and pre-processed (mean length of 254 pb), distributed as follows: 11,042 942 total amplicons for the sea cucumber *H. forskali*, 8,909,074 total amplicons for the sea star *M. glacialis*, 10,406,577 for the sea urchin *S. granularis*, and 2,729,654 in seawater samples (Suppl. Tab. 1). The mean library depth reached 176,001 amplicons per sample, varied according to species: 184,049 amplicons for *H. forskali*, 159,091 for *M. glacialis*, 173,443 for *S. granularis*, and 227,471 for seawater samples. After cleaning, filtering and clustering, the number of total sequences was 8,937 716 clustered in 17,101 OTUs. The cœlomic microbiota of respectively *H. forskali*, *M. glacialis*, *S. granularis* and seawater samples were composed of 9,927, 7,696, 7,424 and 2,563 OTUs.

### Community composition of the cœlomic microbiota

#### Composition of the cœlomic microbiota of *H. forskali*

The composition of the cœlomic microbiota of *H. forskali* was overall dominated by the phylum Proteobacteria that represented more than a half of the total abundance with a mean of 61.8% among sampling dates (fig. 1A). The Bacteroidota, the Firmucutes and the Actinobacteroidota were secondary well represented. These four most abundant phyla accumulated more than 90% of the total abundance. Otherwise, the microbiota composition evolved over time, mainly between samples of 2019 and 2020, with a general increase of the Proteobacteria, instead of the Bacteroidota. At a lower taxonomic rank, differences were accentuated between samplings (fig. 1B, suppl. Tab. 1), showing very diverse and variable patterns of orders. Some orders represented high cumulative abundances such as Burkholderiales (18.3%), Flavobacteriales (13.9%), Alteromonadales (9.9%), Vibrionales, Rhodobacterales and Pseudomonadales, and each reached more than 5 % of the total abundance, and exhibited temporal variations. The sampling in February 2019 was dominated by the the Flavobacteriales and the Rhodobacterales while samplings of 2020 by Burkholderiales. The increase of the Burkholderiales and to a lesser extent the Alteromonadales in 2020 was concomitant and could explain the increase of the Gram negative Proteobacteria at the phylum level, and on the contrary, the Vibrionales and the Rhodobacterales decreased in 2020. For *H. forskali*, 23 orders with an abundance higher than 1% represented 82% of the total abundance and 12 OTUs from 7 main orders constituted 38% of the total abundance (suppl. Tab. 1).

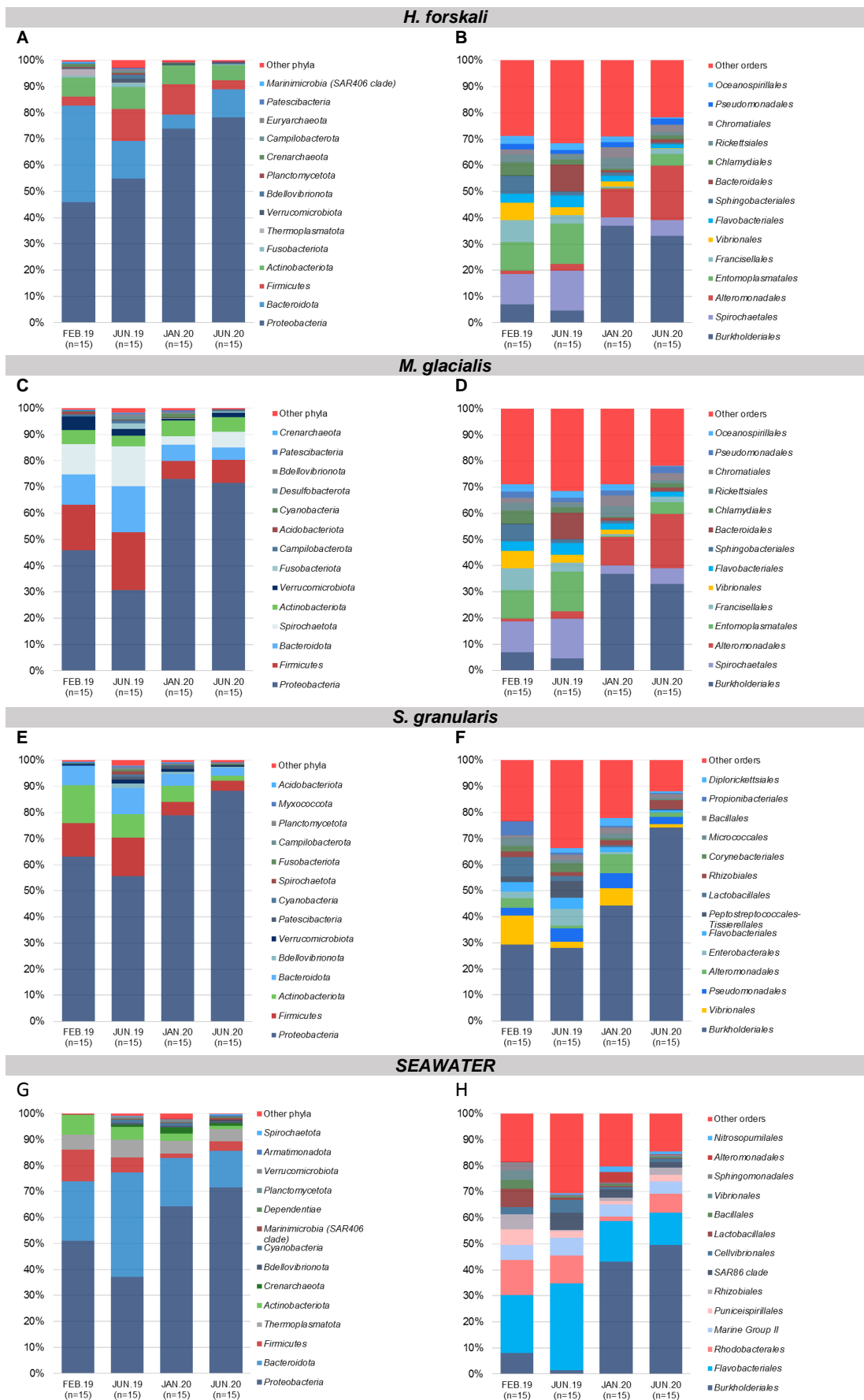


Fig. 1: Relative composition of the major taxa present in the coelomic microbiota of the three species and the bacterial communities of seawater according to sampling date. Relative abundance in the 15 most abundant phyla (left column) and orders (right column) respectively, in: (A-B) *H. forskali*; (C-D) *M. glacialis*; (E-F) *S. granularis*; (G-H): seawater samples. Sampling code: Feb.19 = February 2019, Jun.19 = June 2019, Jan.20 = January 2020, Jun.20 = June 2020.

Composition of the cœlomic microbiota of *M. glacialis*

Proteobacteria reached 54.1% of the total abundance in the cœlomic microbiota of *M. glacialis*, followed by Firmicutes (14.2%), Bacteroidota (10.1%) and Spirochaetota (9.5%) (fig. 1C). An important decrease of the Firmicutes, the Bacteroidota and the Spirochaetota was observed between samplings of 2019 and 2020. In the rank order, the microbiota was mainly composed by the Burkholderiales (18.7%), the Spirochaetales (9.5%), the Alteromonadales (8.6%) and the Entomoplasmatales (8.4%) (fig. 1D). In 2019, the most abundant orders were the Spirochaetales, the Entomoplasmatales, shunted by the Proteobacteria orders the Burkholderiales and the Alteromonadales in 2020 that dominated the microbiota with a mean cumulative abundance of 50.8%. More precisely, 13 OTUs from 10 orders accumulated 53.3% of the total abundance (suppl. Tab. 1).

Composition of the cœlomic microbiota of *S. granularis*

The composition of the cœlomic microbiota of *S. granularis* was mainly composed of Proteobacteria (70.1%), and to a lesser extent, of Firmicutes (9.6%), Actinobacteriota (9.6%) and Bacteroidota (6.6%) (fig. 1E). More precisely, at the rank order, the cœlomic microbiota of the sea urchin *S. granularis* was composed of Burkholderiales (from 28.7% in 2019 to 59.2 % in 2020), and less abundant orders such as the Vibrionales (4.7%) or the Pseudomonadales (4.3%) (fig. 1F). Regarding to the composition in OTUs, 6 OTUs (5 orders) represented 48.2% (suppl. Tab. 1).

Composition of bacterial community of seawater

In samples of seawater, the relative abundance of the main phyla evolved according to time, with a massive increase of the Proteobacteria coupled with a decrease of the Bacteroidota, the Firmicutes and the Actinobacteria, and a stable abundance of the Thermoplasmatota (mean abundance of 5.2%) (fig. 2G). In samples of seawater, 4 orders constituted the majority of the total abundance (63.1%): the Burkholderiales (32.1%), the Flavobacteriales (18%), the Rhodobacterales (7.8%) and the Marine Group II (5.2%,) (fig. 2H). The order Burkholderiales (phylum Proteobacteria) and the order Flavobacteriales (phylum Bacteroidota) dominated the composition in seawater samples and showed an important increase in 2020. Finally, 18 OTUs (7 orders) contributed for 52.7% of the total abundance in the samples of seawater (suppl. Tab. 2).

Alpha-Diversity

Alpha-diversity was analysed to compare the intrinsic diversity in each type of samples. Analysis of intraspecific richness (Chao1 richness estimator) and diversity (Shannon's diversity index) exhibited differences between species and date of sampling (Fig. 2) and were confirmed by the results of the

Kruskal-Wallis test ( $p$ -value threshold 0.05) (tab. 1 and suppl. Tab. 2). The diversity of the cœlomic microbiota highly varied according to time, whatever the species concerned. The highest values of the Shannon's diversity index were observed in June 2019 and the lowest in June 2020. The estimated richness evolved according to time to a lesser extent and on the contrary, the richness increased in June 2020. The comparison of the 3 species of Echinoderms demonstrated that the microbiota of *H. forskali* exhibited the highest number of OTUs, estimated richness and diversity, for each date of sampling (fig. 2, and rarefaction curve suppl. fig. 2).

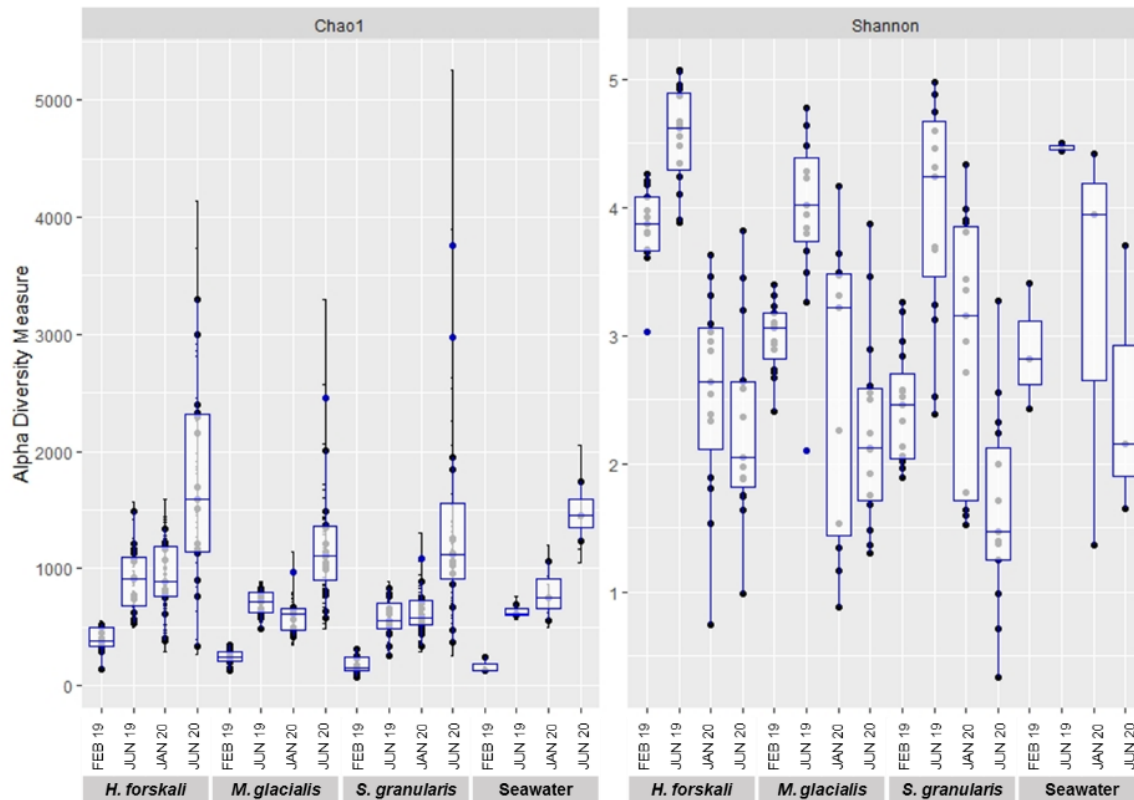


Fig. 2: Plot of alpha-diversity comparison of the cœlomic microbiota of three species of Echinoderms: *H. forskali*, *M. glacialis*, *S. granularis* and seawater.

Table 1: Statistical analysis on alpha-diversity indices (Kruskal-Wallis test, threshold 0.05).

Variables	Chao1's richness		Shannon's diversity	
	chi-squared	p-value	chi-squared	p-value
species	12.072	0.00714*	8.8245	0.03172*
date of sampling	122.4	< 2.2e-16*	90.096	< 2.2e-16*
species + date of sampling	137.37	< 2.2e-16*	112.04	< 2.2e-16*

\* significant for  $p$ -value < threshold alpha 0.05

## Beta diversity analysis

Beta-diversity analysis was assessed using the Bray-Curtis distance metrics (fig.3). First, samples were grouped by species (fig. 3A), and also by the date of sampling with the nMDS plots built per species (fig. 3B, C, D), suggesting a specific and temporally variable microbiota in the 3 species of Echinoderms. Results of Permanova analysis validated significant differences between the composition and abundance in the bacterial communities according to these variables: species and date sampling (tab. 2). Thus, the microbial communities in the cœlomic microbiota of the 3 Echinoderms varied according to time and differed from one species to another one.

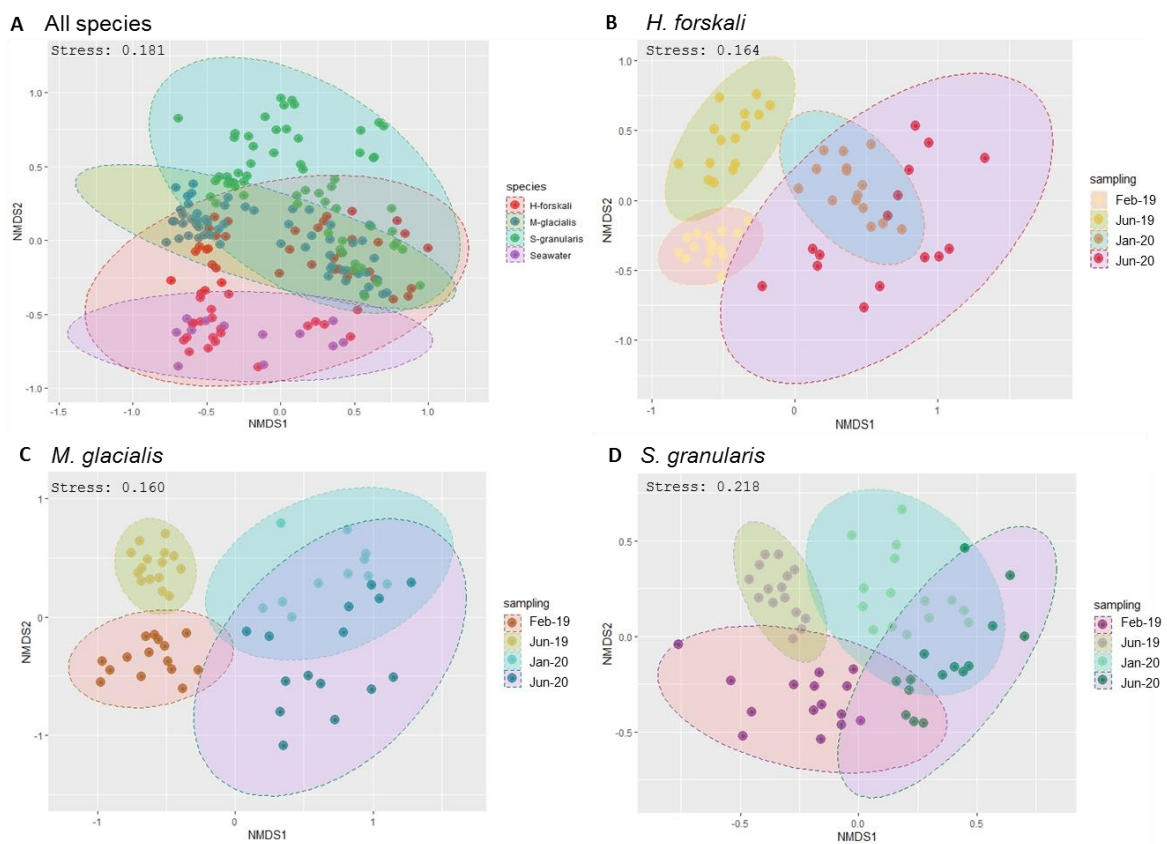


Fig. 3: Bacterial community dissimilarities between the 3 species of Echinoderms and the sampling dates. Non-metric MultiDimensional Scaling (nMDS) plot based on the Bray-Curtis distances with 0.95 interval confidence ellipse. A: all Echinoderms samples; B-C-D: within samples of cœlomic fluid microbiota of *H. forskali* (B), *M. glacialis* (C), *S. granularis* (D). Sampling code: Feb\_19 = February 2019, Jun\_19 = June 2019, Jan\_20 = January 2020, Jun\_20 = June 2020.

Table 2. Permutational multivariate analysis of variance (Permanova) using the Bray Curtiss distance.

Variables	F	R <sup>2</sup>	p-value	
Species	4.1	0.05454	0.001	*
Date of sampling /				
<i>H. forskali</i>	6.8796	0.2693	0.001	*
<i>M. glacialis</i>	5.9295	0.25489	0.001	*
<i>S. granularis</i>	5.002	0.21133	0.001	*

\* significant for p-value < threshold alpha 0.05

### Specific OTUs

The total cœlomic microbiota of the 3 echinoderms was composed by 16 661 OTUs, among which only 2 123 shared OTUs (12.7%) with the bacterial communities of seawater (fig. 4A). In total, 87.3% of the total OTUs kept unshared and specific from the cœlomic fluid microbiota of the 3 Echinoderms and represented a total abundance of 24.2%. These specific OTUs mainly belonged to families such as *Francisellaceae* or *Flavobacteriaceae* (tab. 3).

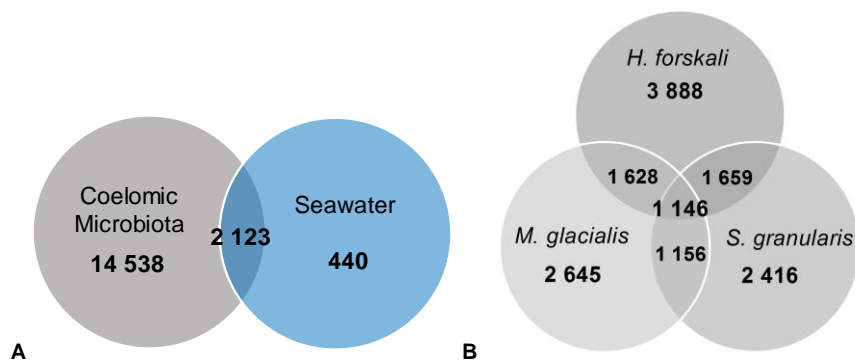


Fig. 4: Venn diagram of shared and specific OTUs. A: Shared and unique OTUs between the total cœlomic microbiota and the seawater; B: Shared and specific OTUs between the cœlomic microbiota of the 3 Echinoderms.

From these specific cœlomic OTUs, the 3 species of Echinoderms shared together 1 146 OTUs, which represented 11.5% of the total OTUs in *H. forskali*, 14.9% in *M. glacialis* and 15.4% in *S. granularis* (fig. 4B). Otherwise, *H. forskali* contained the highest proportion of unique OTUs (39.2% of OTUs abundance and 8.6% of the sequences), followed by *M. glacialis* (34.4% of OTUs abundance and 7.2% of the sequences), *S. granularis* (32.5% of OTUs abundance and 8.7% of the sequences) and the seawater (17.2%) (Fig. 4, tab. 3).

The main abundant specific families in the cœlomic fluid of *H. forskali* were the *Flavobacteriaceae* with 260 OTUs and especially the genera *Flavobacterium*, *Formosa*, and *Lutibacter*, the *Chitinophagaceae* and the *Arenicellaceae* (tab. 3). For *M. glacialis*, the specific OTUs belonged to families such as *Francisellaceae* (49 OTUs), *Diplorickettsiaceae* (57 OTUs), *Flavobacteriaceae* (59 OTUs), *Spirochaetaceae* (63 OTUs), and for *S. granularis*, *Diplorickettsiaceae* (78 OTUs), *Legionellaceae* (76 OTUs) and also *Flavobacteriaceae* (49 OTUs).



<i>H. forskali</i>			<i>M. glacialis</i>			<i>S. granularis</i>			Echinoderms		
Families	Abundance (%)	Nb. OTUs	Families	Abundance (%)	Nb. OTUs	Families	Abundance (%)	Nb. OTUs	Families	Abundance (%)	Nb. OTUs
<i>Flavobacteriaceae</i>	0.34%	260	<i>Francisellaceae</i>	0.29%	49	<i>Diplorickettsiaceae</i>	0.55%	78	<i>Francisellaceae</i>	1.19%	69
<i>Chitinophagaceae</i>	0.31%	36	<i>Diplorickettsiaceae</i>	0.27%	57	<i>Legionellaceae</i>	0.43%	76	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.96%	464
<i>Arenicellaceae</i>	0.22%	13	<i>Hyphomonadaceae</i>	0.26%	14	<i>Chitinophagaceae</i>	0.41%	27	<i>Simkaniaceae</i>	0.78%	88
<i>Sphingobacteriaceae</i>	0.20%	37	<i>Prevotellaceae</i>	0.24%	11	<i>Spirochaetaceae</i>	0.38%	3	<i>Fusobacteriaceae</i>	0.54%	36
<i>Legionellaceae</i>	0.17%	46	<i>Legionellaceae</i>	0.22%	53	<i>Hymenobacteraceae</i>	0.25%	19	<i>Legionellaceae</i>	0.53%	221
<i>Hymenobacteraceae</i>	0.17%	20	<i>Bacillaceae</i>	0.21%	22	<i>Bdellovibrionaceae</i>	0.17%	21	<i>Diplorickettsiaceae</i>	0.51%	218
<i>Sphingomonadaceae</i>	0.17%	48	<i>Spirochaetaceae</i>	0.21%	63	<i>Prevotellaceae</i>	0.14%	14	<i>Spirosomaceae</i>	0.44%	61
<i>Orbaceae</i>	0.16%	1	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.20%	59	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.14%	49	<i>Spirochaetaceae</i>	0.44%	90
<i>Diplorickettsiaceae</i>	0.16%	35	<i>Fokiniaceae</i>	0.18%	3	<i>Parachlamydiaceae</i>	0.13%	39	<i>Sphingomonadaceae</i>	0.43%	211
<i>Rhodobacteraceae</i>	0.15%	137	<i>Endozoicomonadaceae</i>	0.16%	29	<i>Gemmatimonadaceae</i>	0.12%	9	<i>Holosporaceae</i>	0.42%	36
<i>Bdellovibrionaceae</i>	0.15%	32	<i>Nitrososphaeraceae</i>	0.15%	2	<i>Sphingomonadaceae</i>	0.10%	35	<i>Nocardioideaceae</i>	0.42%	85
<i>Rhizobiaceae</i>	0.13%	477	<i>Ruminococcaceae</i>	0.15%	10	<i>Bryobacteraceae</i>	0.10%	4	<i>Rhodobacteraceae</i>	0.40%	249
<i>Cyclobacteriaceae</i>	0.12%	23	<i>Prolixibacteraceae</i>	0.14%	41	<i>Acetobacteraceae</i>	0.10%	9	<i>Chitinophagaceae</i>	0.39%	103
<i>Micropepsaceae</i>	0.12%	3	<i>Marinifilaceae</i>	0.14%	34	<i>Spirosomaceae</i>	0.10%	7	<i>Sphingobacteriaceae</i>	0.39%	76
<i>Nitrincolaceae</i>	0.12%	11	<i>Chitinophagaceae</i>	0.12%	21	<i>Cellvibrionaceae</i>	0.09%	5	<i>Rickettsiaceae</i>	0.36%	29
<b>Total unshared</b>	<b>8.6%</b>	<b>39.2%</b>	<b>Total unshared</b>	<b>7.2%</b>	<b>34.4%</b>	<b>Total unshared</b>	<b>8.7%</b>	<b>32.5%</b>	<b>Total unshared</b>	<b>24.2%</b>	<b>87.3%</b>

Table 3. Table of the 15 most abundant families of the unshared OTUs by species. “Total unshared” represented the mean of the unshared count abundance and of the unshared OTUs.

From specificity to a common core microbiota among echinoderms

The common core microbiota of the 3 species of Echinoderms was determined (prevalence threshold 0.5). This core was constituted by 10 families and 16 OTUs (fig. 5), among which the *Comamonadaceae*, the *Pseudoalteromonadaceae*, the *Oxalobacteraceae* and the *Vibrionaceae*, represented widespread marine families. The relative abundance of these core taxa differed between the 3 species.

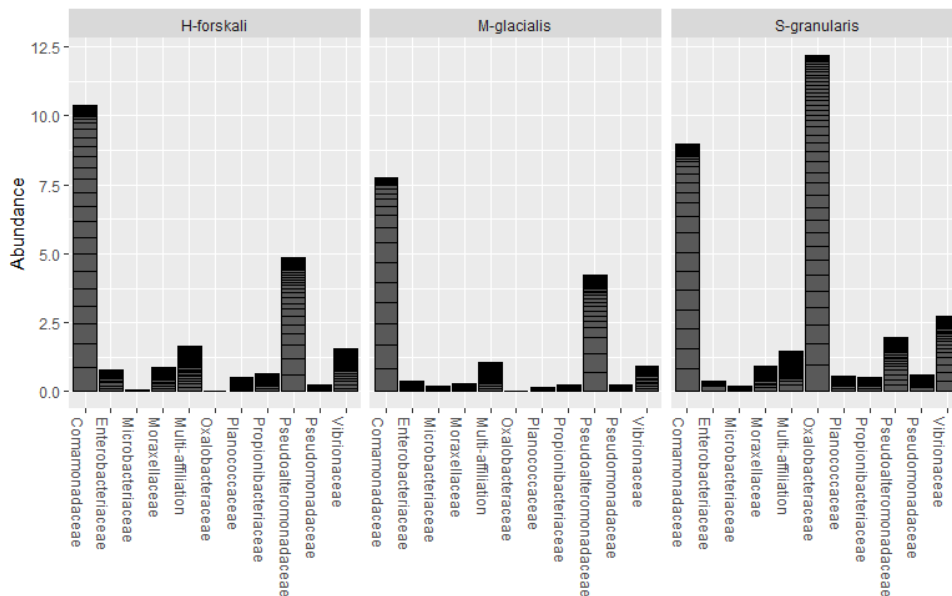


Fig. 5: Core microbiota of the 3 Echinoderms from the Glenan Archipelago.

## Enumeration of culturable microbiota

After incubation, colonies were counted on marine agar plates to determine the concentration of culturable coelomic microbiota (fig. 6A). The highest concentration of culturable microbiota was found for *H. forskali* with a mean of  $3.9 \times 10^4$  CFU/mL while the culturable microbiota of *M. glacialis* and *S. granularis* were respectively estimated at  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL and  $4.9 \times 10^1$  CFU/mL. The culturable concentration of bacteria in seawater was  $8.1 \times 10^2$  CFU/mL. Results on statistical tests exhibited significant differences in term of concentrations of culturable microbiota between species (Kruskal-Wallis test with threshold 0.05, chi-squared 142.25, p-value  $< 2.2 \times 10^{-16}$ ), and a seasonal difference in the coelomic culturable microbiota in *H. forskali* (pairwise comparison using Wilcoxon test, threshold 0.05, p-value  $1.50 \times 10^{-6}$ ) and in *M. glacialis* (pairwise comparison using Wilcoxon test, threshold 0.05, p-value 0.00295).

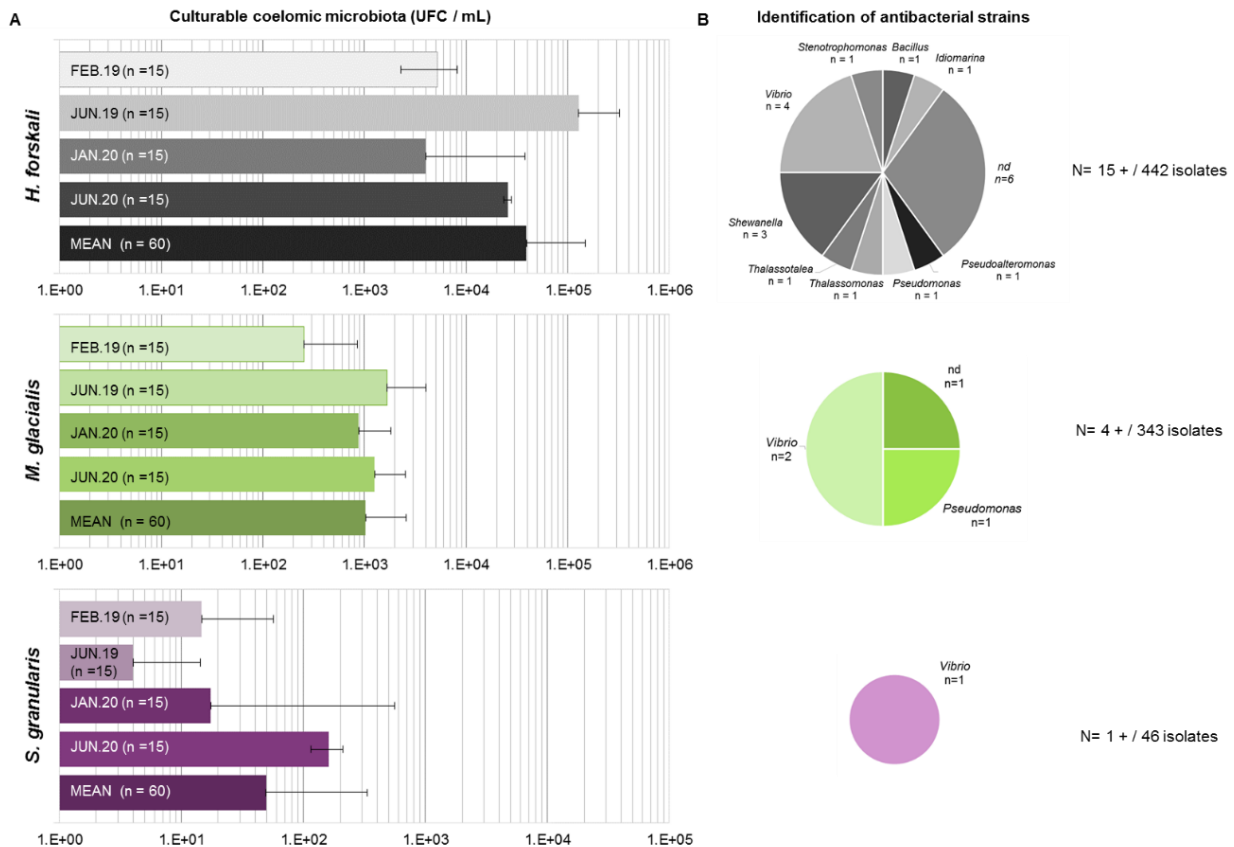


Fig. 6: Results of culturable microbiota assays. A: Enumeration of culturable microbiota (in CFU/mL) for the 3 species according to sampling date; B: Identification of antibacterial strains isolated from culturable microbiota for each species.

## Screening for antibacterial activity in culturable strains

831 isolates were assayed for antimicrobial activity from which 442, 343 and 46 originated from the coelomic fluids of *H. forskali*, *M. glacialis*, and *S. granularis* respectively (fig. 6B). Among these bacterial strains, only 20 presented a positive antibacterial activity against one or more pathogens, representing 2.4 % of the total isolates (fig. 6B). After cryopreservation at  $-80^{\circ}\text{C}$ , 6 of the 20 antibacterial strains did

not spread. *H. forskali*, that showed the highest concentration in culturable bacteria, contained also the highest number of antibacterial strains (15). The 16S identification of the strains showed different genera (fig. 6B) mainly *Vibrio* and *Shewanella*.

## DISCUSSION

Cœlomic microbiota of 3 species from 3 different classes of Echinoderms collected in the same habitat were sampled for 2 years: the detritivorous sea cucumber *H. forskali*, the carnivorous sea star *M. glacialis* and the grazer sea urchin *S. granularis*. The cœlomic microbiota of these 3 species were analysed both by the culture-independent (metabarcoding 16S) and by the culture-based approaches, to study the composition, the specificities, their variations and their antibacterial activities of the cœlomic microbiota.

Results on the microbiota diversity exhibited a variable diversity and also richness according to species and sampling date, with a highest alpha diversity for *H. forskali*, whatever the date of sampling, compared to the other Echinoderms and the bacterial communities of seawater. These results were completed with sequencing information such as library depth and clustering process with the number of OTUs formed for *H. forskali*, and also with enumeration of culturable bacteria, where the concentration for *H. forskali* ( $3.9 \times 10^4$  CFU/mL) was 10- and 1,000 fold higher than that for *M. glacialis* and *S. granularis*, respectively. The variation of diversity and richness across Echinoderm species had already been recorded in other different areas (10,37,39). Moreover, alpha-diversity rates varied between the samplings, suggesting a temporal variation of the cœlomic microbiota, in term of richness and diversity.

The cœlomic microbiota was dominated by the Gram negative phylum Proteobacteria, which represented more than half of the total abundance, and also by the Bacteroidota, the Firmicutes and the Actinobacteriota. These 3 phyla reached more than 80% of the cumulative abundance whatever the species. Differences between species at the phylum rank could be observed between abundance of secondary phyla or less abundant phyla, such as Spirochaetota and Verrucomicrobiota for *M. glacialis*, and the Thermoplasmata for seawater samples. The Proteobacteria constituted the main phylum in marine environment where they played a key role especially in the recycling of dissolved organic matter, associated with Bacteroidota (25,63–66). These more abundant phyla were also in the majority in the microbiota of marine invertebrates and occupied the same abundance ranks, in the cœlomic microbiota of other Echinoderms (37,39,67), or in other marine invertebrates such as Ascidiata (68).

These specific variations were also observed at a lower taxonomic rank: the pattern of relative abundance of the main orders differed according to species. For each species, only 4 orders cumulated

more than 50 % of the abundance, varying according to species between Burkholderiales, Flavobacteriales, Alteromonadales, Vibrionales, Entomoplasmatales and Rhodobacterales. These orders were frequently found in marine environment and marine host microbiota. They occupied different functions from organic compounds degradation (69), to production of antibacterial peptides (70,71) or conversely responsible for pathogenic reactions (72). Within these orders, only a few OTUs contributed to explain the main abundance. Thus, the coelomic microbiota of the 3 Echinoderms were constituted by only few OTUs that represented the main abundance and occupied the niches, nevertheless, the diversity between Echinoderms species was explained by numerous sub-abundant OTUs. Differential composition in abundant and sub-abundant taxa and their role have already been described in microbiome studies (73–76). The abundance of few OTUs was observed in other Echinoderms such as the sea star *Asterias amurensis* where one genus related to *Helicobacter* reached 97.3% of the reads (39), and also the abundance of the family *Flavobacteriaceae* in Holothurians (10,21,77).

The beta diversity analysis built with the Bray-Curtis distances showed that the microbiota of the 3 Echinoderms were distinct between them, but also between sampling date. This suggested that the microbiota varied across time and host, and that environment played a role in microbiota selection (78,79). Otherwise, temporal variations of the coelomic microbiota of the 3 echinoderms and the bacterial communities of seawater were assessed, with a global increase of Proteobacteria in 2020 probably correlated with the increase of the Burkholderiales, validating the temporal variations previously deduced by richness and diversity analyses. The temporal variations in the composition of microbiota were highly documented for gut microbiota in vertebrates and correlated with health or food habit (Parfrey and Knight, 2012; Zhang et al., 2017) but remain largely unexplored for marine invertebrates. Even if the coelomic compartment seemed further away from the environment and more stable in the face of environmental fluctuations (21), the coelomic fluid and its microbiota was subject to temporal variations, that could be explained by different factors such as host physiology, health, feeding behaviour or other environmental factors coming from their natural Habitat (63,79,82).

Many specific and unshared OTUs were found in the coelomic microbiota of the 3 Echinoderms and in bacterial communities of seawater. The highest number and proportion of unshared and specific OTUs were found in the coelomic microbiota of *H. forskali* with notably the abundant families *Flavobacteriaceae* (Bacteroidota) represented by 260 OTUs and genera such as *Flavobacterium* (39 OTUs) or *Tenacibaculum* (16 OTUs). These genera were often associated to fish disease (72,83–85) even if other genera are correlated with organic degradation of algal polysaccharides such as the genera *Formosa* (4 OTUs) (86). In the coelomic microbiota of the sea star *M. glacialis*, specific OTUs were significantly different and belonged mainly to the families *Francisellaceae*, *Hyphomonadaceae*, or *Spirochaetaceae*, and in the sea urchin *S. granularis*, from *Diplorickettsiaceae* and *Legionellaceae*.

Specific and unshared OTUs could take part in a “specific microbiota” for each species of the 3 Echinoderms, because of their presence and abundance correlated with one specific host (33,87). The shared OTUs between the 3 species could also be qualified as a “common specific microbiota”.

Otherwise, defining a core microbiota was a complex choice and weighting between parameters such as prevalence, abundance, function and specificity related to a host, and the methodology was still relevant (88–93). Moreover, the core microbiota could be multiscale: from one specific host to a specific population in an ecological niche (91) or species living in a same habitat, should be omnipresent (88) or temporally variable (90). The “common core microbiota” of the 3 Echinoderms, constituted by the most prevalent taxa, was composed by ubiquitous taxa for this group of Echinoderms living in a same habitat, and indeed, probably associated to an ecological niche (94).

These observations confirmed the conclusion that the main part of the cœlomic microbiota from these 3 Echinoderms species were highly variable and responsible for diversity, and that cœlomic microbiota was constituted by a few abundant OTUs dominating the total abundance. Another hypothesis suggested by the presence of specific OTUs only found in the cœlomic microbiota of Echinoderms and absent from seawater, was the selection of the microbiota. Who and how was made this selection: by the host, by the microbiota itself, or by the holobiont.

From the culturable microbiota, that represented a weak part of the total microbiota (21), bacterial strains have been isolated and cultivated, 2.4% of which exhibited an antibacterial activity against pathogenic bacterial strains in aquaculture. These strains belonged to abundant taxa present in metabarcoding data: first the genus *Pseudoalteromonas* with a total abundance of 6.3% and a total of 512 OTUs in the cœlomic microbiota of the 3 echinoderms, and then *Vibrio* (1.6% and 144 OTUs), *Shewanella* (0.1%, 26 OTUs), *Idiomarina* (0.02% and 6 OTUs), *Thalassotalea* (0.1%, 22 OTUs), *Pseudomonas* (1.2%, 108 OTUs), and *Bacillus* (0.3%, 57 OTUs). These genera were common culturable bacteria present in the cœlomic fluid of Echinoderms (10,21) and in marine environment. Among these genera, some are associated with antibacterial activities and often known to produced antibacterial peptides, such as the genus *Pseudoalteromonas* (11,70,71), with growing performance as probiotics such as *Bacillus sp.*(14,20) , or in the contrary associated to disease in aquaculture such as the genera *Vibrio* and *Shewanella* (95,96). Isolation of antibacterial strains from Echinoderms was already related in sea urchins (40) or in sea cucumbers (10,11). The presence of these abundant antibacterial or interesting strains supports the role of the microbiota in the host health (82) and also the role of the cœlomic compartment in Echinoderm immunity (4,5,97).

## Conclusion

The cœlomic microbiota of 3 species of Echinoderms living in a same habitat, the sea cucumber *H. forskali*, the sea star *M. glacialis* and the sea urchin *S. granularis* have been analysed for two years in the Glenan Archipelago (South Brittany, France). Results obtained with metabarcoding 16S revealed a specific composition of the cœlomic microbiota of the 3 Echinoderms, and therefore a very highly variable composition according to time, suggesting a plasticity of cœlomic microbiota. The composition was overall dominated by Proteobacteria, and by only a few OTUs which constituted the majority of the total abundance. The presence of numerous specific OTUs and of antibacterial strains in the cœlomic microbiota of the 3 Echinoderms suggested a selection of these microbiota. Furthermore, the antibacterial culturable strains isolated from Echinoderms offered new perspectives for biotechnological issues, as potential probiotic candidates.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection

Four collections were carried out over two successive years: two in winter (on February 27, 2019 and January 22, 2020; seawater temperature 10°C) and two in summer conditions (on June 5, 2019 and June 10, 2020; seawater temperature 15°C). Animals were collected by scuba diving between 5 and 12 meters depth in the Glenan Archipelago (South Brittany, France, WGS84: 47°43'57.76''N and 04°00'50.99''W) (fig. 7). For each sampling period, 15 specimens were collected for each of the 3 species: *H. forskali*, *S. granularis* and *M. glacialis*. These three benthic species could be found mostly on vertical walls, in the same habitat composed of rocky beds colonized with kelp (*Laminaria sp.* and *Sargassum sp.* principally) and encrusting algae. Animals were stored in distinct 50 L tanks filled with local seawater and directly transferred to the laboratory. 3 samples of ambient seawater were collected in sterile 15 mL centrifuge tubes.

Animals were weighted and measured in the laboratory (suppl. fig. 1). For each animal, two cœlomic fluid samples were obtained, for the culturable and non-culturable analysis. Before each sample collection, the needle insertion area on the animal's body surface was washed and disinfected using 70% ethanol. For *H. forskali*, cœlomic fluid was collected into the cœlomic cavity, by introducing a 25G needle fixed on a 2.5mL syringe through the body wall in the ventral side. For *S. granularis*, the needle was inserted in the body cavity by the oral pole of the sea urchin, through the peristomial membrane. For *M. glacialis*, cœlomic fluid was removed by dissection of an arm of the sea star, the cœlomic fluid was collected in sterile 15 mL tubes. For non-culturable analysis, tubes were centrifuged at 13,000 g for

10 minutes to precipitate bacteria. Supernatants were removed and the pellets were then stored at -20°C before further analysis. For studies on culturable microbiota, samples were directly processed.

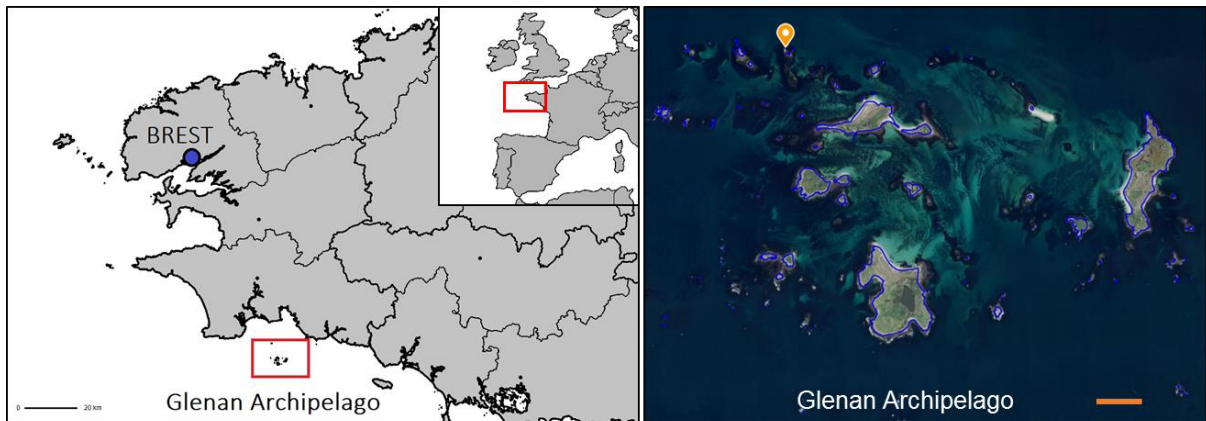


Fig. 7: Sampling in the Glenan Archipelago (South Brittany, France). Sampling area and diving zone located with an orange point, scale bar in orange: 500m (source: [geoportail.gouv.fr](http://geoportail.gouv.fr)).

### Analysis of cœlomic microbiota using 16S metabarcoding

#### DNA extraction and sequencing

Bacterial DNA from pellets stored at -20°C was extracted with the Qiagen DNA Stool mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions (protocol for pathogen detection, with an initial lysis step at 95°C). The products of DNA extraction were then amplified at the AnaEE Platform (Grenoble, France). 4 replicates of each sample and 4 negative controls were performed for the randomised PCR, focused on the hypervariable region V4 of the 16S rDNA gene, using barcoded primers for Bacteria: Bact02F (5'-GCCAGCMGCCGCGGTAA -3') and rBact02R (5'-GGACTACCMGGGTATCTAA -3') according to the Metafast protocol (42). Sequencing was then performed with the technology Illumina MiSeq (2x250 pb) by Fasteris (Geneva, Switzerland). Sequencing data was finally sent to the format fastq.gz for bioinformatics analysis.

#### Bioinformatics and data processing

After quality control and trimming on sequences, sequences were assigned to samples with ngsfilter from the Obitools (43). Then, sequencing data were analysed using Frogs 3.1.0 (44,45) on the Genouest Galaxy server. First, reads were demultiplexed and merged, then chimera were removed using VSearch (46,47), and sequences were clustered using Swarm (aggregation parameter: d=3) (45). Singletons were filtered and removed from data. Finally OTUs (Operational Taxonomic Units) were taxonomically assigned using Blast (48) and the SILVA 138 (pintail 100) database. Contaminant OTUs present in control



samples (blanks, DNA extraction kit and lab reagents) were filtered and removed, if their relative abundance reached more than 1% (33).

#### Statistical analysis

Data (count table, OTUs table and samples data) were imported in R (49) for the analysis of the bacterial community composition and the diversity, using the R packages *phyloseq* (50), *vegan* (51) and *ggplot2* (52). Alpha diversity indices were calculated (Chao1, Shannon's diversity indice) and means were compared according to the variables "species" and "sampling date" with the non-parametric test of Kruskal-Wallis (p-value threshold 0.05), and then pairwise comparisons with the Wilcoxon test (p-value adjust method holm). The beta diversity analysis was built with the function *decostand* and the count transformation Hellinger (53–55), the Bray-Curtis distances were calculated with the function *vegdist* of the package *vegan*, and the nMDS plot were drawn with the function *metaMDS* (56). A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was done with the function *Adonis* (57) on these distances. Compositions of cœlomic microbiota were then compared at the phylum and order levels using R and Excel. A Venn diagram of shared and unique OTUs was built with the count table in Excel. Finally, the common core microbiota between the 3 species was determined using a prevalence threshold of 0.5 with the R package *microbiome* (58).

#### Analysis of cœlomic microbiota with culturable approaches

##### Count and isolation of culturable bacteria

100µl of pure and diluted (10<sup>-1</sup>) samples were deposited on marine agar media (MA, Marine Broth 2216, Difco and European Bacteriological Agar, Biokar). Plates were incubated at 18°C for 3 days before enumeration. Pairwise Wilcoxon tests were performed on culturable concentrations (threshold 0.05). After bacterial enumeration, 831 strains of cœlomic bacteria were isolated in marine broth media (*H. forskali* n=442, *M. glacialis* n=343 and *S. granularis* n=46). Finally, pure isolates were cryopreserved in glycerol 25% (v/v) in 96-well microplates and were stored at -80°C before the antibacterial screenings.

##### Antimicrobial activities of cœlomic isolates

6 pathogenic bacterial strains were selected as targets: *Lactococcus garvieae* (ATCC43921), *Listonella anguillarum* (NCBIM829), *Vibrio harveyi* (ORM4), *V. parahaemolyticus* (13028/A3), *V. tapetis* (CECT4600), *Yersinia ruckeri* (ATCC29473). Strains were cultivated in marine broth media and incubated at 18°C or 30°C for 2 days. For the antibacterial assays, marine agar plates were inoculated by inundation with the pathogenic strains (10<sup>6</sup> UFC/mL). Overnight cultures of cœlomic isolates in marine broth were deposited in 2 µL spot on the plate. A 2 µL spot of sterile marine broth was used as negative control, and



a 2 µl spot of kanamycin (1 mg/mL) as positive control. Plates were incubated at 18°C for 3 days and potential antibacterial activity was visualized with Gel Doc XR (Biorad, CA, USA).

### Identification of antibacterial isolates

Isolates exhibiting an antibacterial activity were selected. DNA was extracted with the NucleoSpin Microbial DNA kit from Macherey-Nagel (Düren, Germany), according to the manufacturer's protocol. The 16S rDNA was amplified by PCR using the modified universal primers forward 24F-w18 (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), and reverse 1492R-w20 (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3') (59–61), and the PCR master mix from Promega (Promega, WI, USA), according to the following program: an initial step of denaturation at 95°C for 5 min; then 30 cycles of 90°C for 30 s, 54°C for 1 min, 72°C for 1 min; and a final extension step of 5 min at 72°C. PCR products were visualized by gel electrophoresis (0.8% agarose in 1X TAE buffer containing Sybr™ green). DNA concentration was quantified by fluorometric with the Qubit Fluorometer (Invitrogen, CA, USA).

DNA products were sequenced by GATC (Eurofins genomics, Köln, Germany). Sequences were analysed with BLASTn (62) on the NCBI server (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and aligned with similar sequences (taxonomical affiliation if % homology >99).

### **Acknowledgements and funds**

This work was funded by European maritime and fisheries Fund in France (HOLOFARM project, FEAMP - Innovative Aquaculture). Hélène Laguerre was supported by a “Quimper-Bretagne Occidentale” grant for PhD thesis. Thanks you to Christian Miquel and Stéphane Lobreaux from the Alpine Ecology Laboratory (LECA, Grenoble Alpes University) for their advice on bioinformatics and Alain Dufour for the proofreading of this paper.

## References

1. Hirth F. On the Origin and Evolution of the Tripartite Brain. *Brain Behav Evol.* 2010;76(1):3–10.
2. Lawrence JM. *Sea Urchins: Biology and Ecology.* Academic Press; 2020. 736 p.
3. Kurek A, Homa J, Kauschke E, Plytycz B. Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *Eur J Soil Biol.* 2007 Nov;43:S121–6.
4. Smith LC, Arizza V, Barela Hudgell MA, Barone G, Bodnar AG, Buckley KM, et al. Echinodermata: The Complex Immune System in Echinoderms. In: Cooper EL, editor. *Advances in Comparative Immunology.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 409–501.
5. Chen M, Wang F, Xing K, Zhu A, Zhang S. Immunology and Diseases. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science.* Elsevier; 2015. p. 257–87.
6. Matranga V. Molecular aspects of immune reactions in Echinodermata. *Prog Mol Subcell Biol.* 1996;15:235–47.
7. Smith LC, Ghosh J, Buckley KM, Clow LA, Dheilly NM, Haug T, et al. Echinoderm Immunity. In: Söderhäll K, editor. *Invertebrate Immunity.* Boston, MA: Springer US; 2010. p. 260–301.
8. Desriac F, Le Chevalier P, Brillet B, Leguerinel I, Thuillier B, Paillard C, et al. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol Lett.* 2014 Jan;350(1):107–16.
9. ElAhwany AMD, Ghozlan HA, ElSharif HA, Sabry SA. Phylogenetic diversity and antimicrobial activity of marine bacteria associated with the soft coral *Sarcophyton glaucum*: Antimicrobial activity of marine bacteria with *Sarcophyton glaucum*. *J Basic Microbiol.* 2015 Jan;55(1):2–10.
10. León-Palmero E, Joglar V, Álvarez PA, Martín-Platero A, Llamas I, Reche I. Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. Lee B-L, editor. *PLOS ONE.* 2018 May 9;13(5):e0196178.
11. Offret C, Jégou C, Mounier J, Fleury Y, Chevalier PL. New insights into the haemo- and coelomicrobiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. *J Appl Microbiol.* 2019 Apr;126(4):1023–31.
12. Rizzo C, Lo Giudice A. Marine Invertebrates: Underexplored Sources of Bacteria Producing Biologically Active Molecules. *Diversity.* 2018 Jun 27;10(3):52.
13. Ye S, Liu M, Wang L, Li R, Li Q. Composition and Diversity of Intestinal Microbiota of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* from Different Habitats. *Int J Agric Biol.* 2018;20(8):5.
14. Adorian TJ, Jamali H, Farsani HG, Darvishi P, Hasanpour S, Bagheri T, et al. Effects of Probiotic Bacteria *Bacillus* on Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, and Hematological Parameters of Asian Sea Bass, *Lateolabrax japonicus* (Bloch). *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2019 Mar;11(1):248–55.
15. Chi C, Liu J-Y, Fei S-Z, Zhang C, Chang Y-Q, Liu X-L, et al. Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of *A. japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2014 Jun;38(2):367–73.

16. Hai NV. The use of probiotics in aquaculture. *J Appl Microbiol*. 2015 Oct;119(4):917–35.
17. Zhao F, Liu Q, Cao J, Xu Y, Pei Z, Fan H, et al. A sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) polysaccharide improves the gut microbiome to alleviate the symptoms of type 2 diabetes mellitus in Goto-Kakizaki rats. *Food Chem Toxicol*. 2020 Jan;135:110886.
18. Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs*. 2010 Apr 4;8(4):1153–77.
19. Offret C, Rochard V, Laguerre H, Mounier J, Huchette S, Brillet B, et al. Protective Efficacy of a *Pseudoalteromonas* Strain in European Abalone, *Haliotis tuberculata*, Infected with *Vibrio harveyi* ORM4. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019 Mar;11(1):239–47.
20. Zhao Y, Yuan L, Wan J, Sun Z, Wang Y, Sun H. Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*. 2016 Feb;49:237–42.
21. Enomoto M, Nakagawa S, Sawabe T. Microbial Communities Associated with Holothurians: Presence of Unique Bacteria in the Coelomic Fluid. *Microbes Environ*. 2012;27(3):300–5.
22. Apprill A. Marine Animal Microbiomes: Toward Understanding Host–Microbiome Interactions in a Changing Ocean. *Front Mar Sci*. 2017;4.
23. Bush A, Compson ZG, Monk WA, Porter TM, Steeves R, Emilson E, et al. Studying Ecosystems With DNA Metabarcoding: Lessons From Biomonitoring of Aquatic Macroinvertebrates. *Front Ecol Evol*. 2019;7:434.
24. Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob Ecol Conserv*. 2019 Jan 1;17:e00547.
25. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Aug 8;103(32):12115–20.
26. Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich AB, Wagner M, Hacker J, et al. Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Sep 1;68(9):4431–40.
27. Kennedy J, Marchesi JR, Dobson ADW. Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 May 1;75(1):11–20.
28. Ainsworth TD, Thurber RV, Gates RD. The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends Ecol Evol*. 2010 Apr 1;25(4):233–40.
29. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2007 May;5(5):355–62.
30. López-Legentil S. Temporal stability of bacterial symbionts in a temperate ascidian. *Front Microbiol*. 2015;6:11.

31. Stabili L, Gravili C, Pizzolante G, Lezzi M, Tredici SM, De Stefano M, et al. *Aglaophenia octodonta* (Cnidaria, Hydrozoa) and the Associated Microbial Community: a Cooperative Alliance? *Microb Ecol.* 2018 Jul 1;76(1):258–71.
32. Pierce ML, Ward JE, Holohan BA, Zhao X, Hicks RE. The influence of site and season on the gut and pallial fluid microbial communities of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Bivalvia, Ostreidae): community-level physiological profiling and genetic structure. *Hydrobiologia.* 2016 Feb 1;765(1):97–113.
33. Rossbach S, Cardenas A, Perna G, Duarte CM, Voolstra CR. Tissue-Specific Microbiomes of the Red Sea Giant Clam *Tridacna maxima* Highlight Differential Abundance of Endozoicomonadaceae. *Front Microbiol.* 2019;10.
34. Gao F, Li F, Tan J, Yan J, Sun H. Bacterial Community Composition in the Gut Content and Ambient Sediment of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Revealed by 16S rRNA Gene Pyrosequencing. Badger JH, editor. *PLoS ONE.* 2014 Jun 26;9(6):e100092.
35. Wang Q, Zhang X, Chen M, Li W, Zhang P. Comparison of intestinal microbiota and activities of digestive and immune-related enzymes of sea cucumber *Apostichopus japonicus* in two habitats. *J Oceanol Limnol.* 2018 May;36(3):990–1001.
36. Laport MS, Bauwens M, Collard M, George I. Phylogeny and Antagonistic Activities of Culturable Bacteria Associated with the Gut Microbiota of the Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*). *Curr Microbiol.* 2018 Mar 1;75(3):359–67.
37. Jackson EW, Pepe-Ranney C, Debenport SJ, Buckley DH, Hewson I. The Microbial Landscape of Sea Stars and the Anatomical and Interspecies Variability of Their Microbiome. *Front Microbiol.* 2018 Aug 13;9:1829.
38. Lloyd MM, Pespeni MH. Microbiome shifts with onset and progression of Sea Star Wasting Disease revealed through time course sampling. *Sci Rep.* 2018 Nov 7;8.
39. Nakagawa S, Saito H, Tame A, Hirai M, Yamaguchi H, Sunata T, et al. Microbiota in the coelomic fluid of two common coastal starfish species and characterization of an abundant *Helicobacter*-related taxon. *Sci Rep.* 2017 Dec;7(1):8764.
40. Haug T, Kjuul AK, Styrvold OB, Sandsdalen E, Olsen ØM, Stensvåg K. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J Invertebr Pathol.* 2002 Oct;81(2):94–102.
41. Kim T-Y, Lee J-J, Kim B-S, Choi SH. Whole-Body Microbiota of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) from South Korea for Improved Seafood Management. *J Microbiol Biotechnol.* 2017 Oct 28;27(10):1753–62.
42. Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring.* Oxford University Press; 2018. 268 p.
43. Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. OBITools: a Unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour.* 2015 May;10.1111/1755-0998.12428.
44. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Berger B, editor. *Bioinformatics.* 2018 Apr 15;34(8):1287–94.

45. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*. 2014;2:e593.
46. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010 Oct 1;26(19):2460–1.
47. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;4:e2584.
48. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009 Dec 15;10(1):421.
49. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021.
50. McMurdie PJ, Holmes S. *phyloseq*: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. Watson M, editor. *PLoS ONE*. 2013 Apr 22;8(4):e61217.
51. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, et al. *vegan*: Community Ecology Package. 2019.
52. Wickham H. *ggplot2*: Elegant Graphics for Data Analysis. 2nd ed. Springer International Publishing; 2016.
53. Oksanen J. Ordination of boreal heath-like vegetation with principal component analysis, correspondence analysis and multidimensional scaling. *Vegetatio*. 1983 Jun 1;52(3):181–9.
54. Anderson MJ, Ellingsen KE, McArdle BH. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecol Lett*. 2006 Jun;9(6):683–93.
55. Legendre P, Gallagher ED. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*. 2001 Oct 1;129(2):271–80.
56. Minchin PR. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination. *Vegetatio*. 1987 Apr 1;69(1):89–107.
57. Anderson MJ. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In: *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. American Cancer Society; 2017. p. 1–15.
58. Shetty SA, Hugenholtz F, Lahti L, Smidt H, de Vos WM. Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Mar;41(2):182–99.
59. Galkiewicz JP, Kellogg CA. Cross-Kingdom Amplification Using Bacteria-Specific Primers: Complications for Studies of Coral Microbial Ecology. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Dec;74(24):7828–31.
60. Hogg JC, Lehane MJ. Identification of Bacterial Species Associated with the Sheep Scab Mite (*Psoroptes ovis*) by Using Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Sep;65(9):4227–9.
61. Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester; New York: Wiley; 1991.

62. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403–10.
63. Apprill A. Marine Animal Microbiomes: Toward Understanding Host–Microbiome Interactions in a Changing Ocean. *Front Mar Sci.* 2017 Jul 18;4:222.
64. Stevens H, Stübner M, Simon M, Brinkhoff T. Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005 Nov 1;54(3):351–65.
65. Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, Kultima JR, Labadie K, Salazar G, et al. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science.* 2015 May;348(6237):1261359.
66. Zhou Z, Tran PQ, Kieft K, Anantharaman K. Genome diversification in globally distributed novel marine Proteobacteria is linked to environmental adaptation. *ISME J.* 2020 Aug;14(8):2060–77.
67. Faddetta T, Ardizzone F, Faillaci F, Reina C, Palazzotto E, Strati F, et al. Composition and geographic variation of the bacterial microbiota associated with the coelomic fluid of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Sci Rep.* 2020 Dec 8;10(1):21443.
68. Erwin P, Pineda MC, Webster N, Turon X, Lopez-Legentil S. Down under the tunic: bacterial biodiversity hotspots and widespread ammonia-oxidizing archaea in coral reef ascidians. *ISME J.* 2013 Oct 24;8.
69. Pérez-Pantoja D, Donoso R, Agulló L, Córdova M, Seeger M, Pieper DH, et al. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environ Microbiol.* 2012;14(5):1091–117.
70. Bowman JP. Bioactive Compound Synthetic Capacity and Ecological Significance of Marine Bacterial Genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs.* 2007 Dec;5(4):220–41.
71. Desriac F, Jégou C, Balnois E, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y. Antimicrobial Peptides from Marine Proteobacteria. *Mar Drugs.* 2013 Sep 30;11(10):3632–60.
72. Loch TP, Faisal M. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *J Adv Res.* 2015 May;6(3):283–300.
73. Ainsworth TD, Krause L, Bridge T, Torda G, Raina J-B, Zakrzewski M, et al. The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *ISME J.* 2015 Oct;9(10):2261–74.
74. Gobet A, Mest L, Perennou M, Dittami SM, Caralp C, Coulombet C, et al. Seasonal and algal diet-driven patterns of the digestive microbiota of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a generalist marine herbivore. *Microbiome.* 2018 Dec;6(1):60.
75. Mariadassou M, Pichon S, Ebert D. Microbial ecosystems are dominated by specialist taxa. *Ecol Lett.* 2015 Aug 6;18.
76. Reveillaud J, Maignien L, Eren MA, Huber JA, Apprill A, Sogin ML, et al. Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *ISME J.* 2014 Jun;8(6):1198–209.
77. Nedashkovskaya OI, Suzuki M, Vancanneyt M, Cleenwerck I, Zhukova NV, Vysotskii MV, et al. *Salegentibacter holothuriorum* sp. nov., isolated from the edible holothurian *Apostichopus japonicus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004 Jul;54(Pt 4):1107–10.

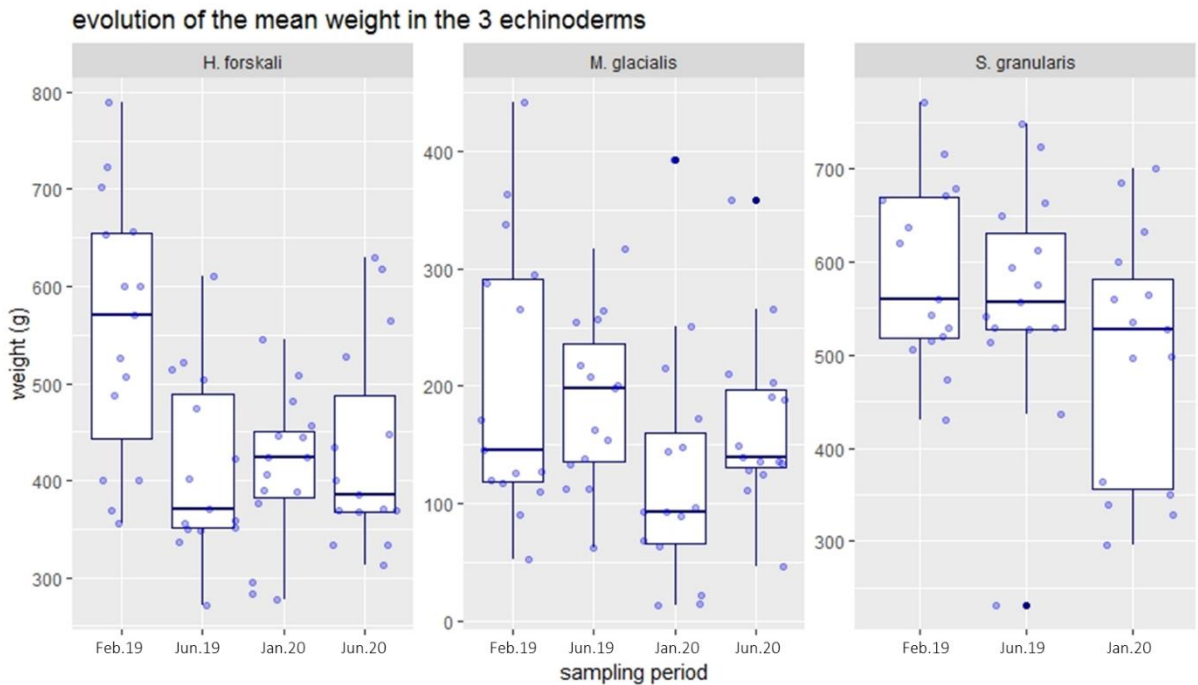
78. Björk JR, O'Hara RB, Ribes M, Coma R, Montoya JM. The dynamic core microbiome: Structure, dynamics and stability. *Ecology*; 2017 May.
79. Carrier TJ, Reitzel AM. Convergent shifts in host-associated microbial communities across environmentally elicited phenotypes. *Nat Commun.* 2018 Mar 5;9(1):1–9.
80. Parfrey LW, Knight R. Spatial and temporal variability of the human microbiota. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Jul 1;18:5–7.
81. Zhang Z, Li D, Refaey MM, Xu W. High Spatial and Temporal Variations of Microbial Community along the Southern Catfish Gastrointestinal Tract: Insights into Dynamic Food Digestion. *Front Microbiol.* 2017;8.
82. Bordenstein SR, Theis KR. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. Waldor MK, editor. *PLOS Biol.* 2015 Aug 18;13(8):e1002226.
83. Avendaño-Herrera R, Toranzo A, Magarinos B. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: A review. *Dis Aquat Organ.* 2006 Sep 1;71:255–66.
84. Bowman JP. The Marine Clade of the Family *Flavobacteriaceae*: The Genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonia*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter* and *Zobellia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass.* New York, NY: Springer; 2006. p. 677–94.
85. Waśkiewicz A, Irzykowska L. *Flavobacterium* spp. – Characteristics, Occurrence, and Toxicity. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition).* Oxford: Academic Press; 2014. p. 938–42.
86. Mann AJ, Hahnke RL, Huang S, Werner J, Xing P, Barbeyron T, et al. The genome of the alga-associated marine *flavobacterium Formosa agariphila* KMM 3901T reveals a broad potential for degradation of algal polysaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Nov;79(21):6813–22.
87. Risely A. Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *J Anim Ecol.* 2020;89(7):1549–58.
88. Aguirre de Cárcer D. The human gut pan-microbiome presents a compositional core formed by discrete phylogenetic units. *Sci Rep.* 2018 Dec;8(1):14069.
89. Astudillo-García C, Bell JJ, Webster NS, Glasl B, Jompa J, Montoya JM, et al. Evaluating the core microbiota in complex communities: A systematic investigation: Core microbiota in complex communities. *Environ Microbiol.* 2017 Apr;19(4):1450–62.
90. Björk JR, O'Hara RB, Ribes M, Coma R, Montoya JM. The dynamic core microbiome: Structure, dynamics and stability. *Ecology*; 2017 May.
91. Hernandez-Agreda A, Gates RD, Ainsworth TD. Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. *Trends Microbiol.* 2017 Feb;25(2):125–40.
92. Lemanceau P, Blouin M, Muller D, Moëgne-Loccoz Y. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci.* 2017 Jul;22(7):583–95.

93. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH. Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *BMC Microbiol.* 2012;12(1):20.
94. Rodriguez Barreras R, Tosado E, Godoy-Vitorino F. Trophic niches reflect compositional differences in microbiota among Caribbean sea urchins. *PeerJ.* 2021 Aug 31;9.
95. Deng H, He C, Zhou Z, Liu C, Tan K, Wang N, et al. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture.* 2009 Feb;287(1–2):18–27.
96. Gao X-Y, Liu Y, Miao L-L, Li E-W, Hou T-T, Liu Z-P. Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express.* 2017 Dec;7(1):23.
97. Ramirez-Gomez F, Garcia-Ararras J. Echinoderm immunity. *Invertebr Surviv J.* 2010 Sep 1;7.

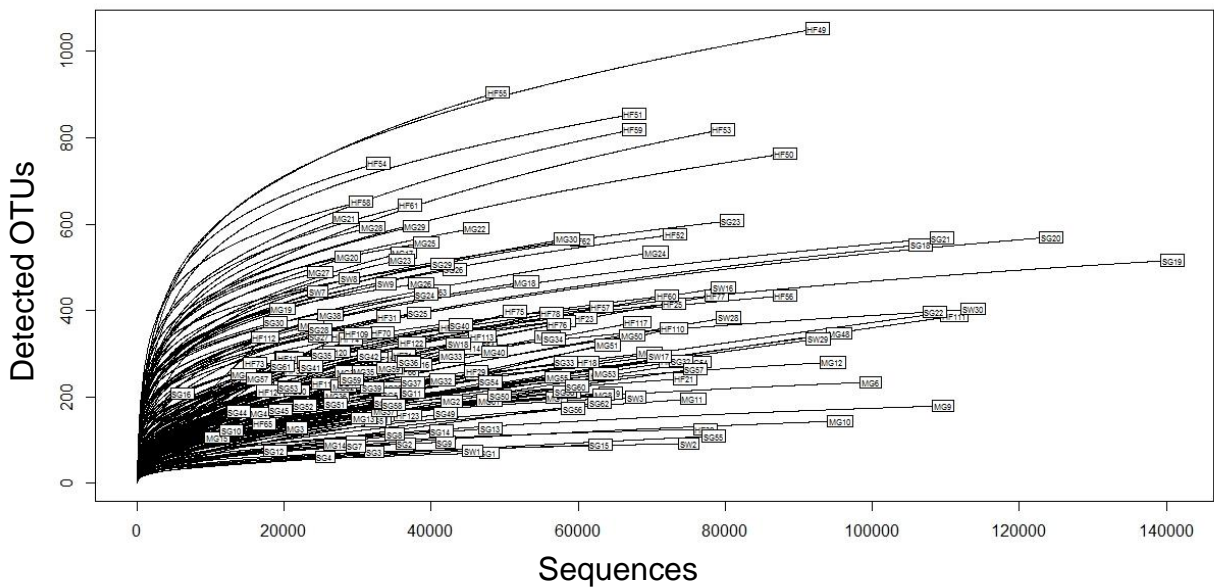


Supplementary materials

Supplementary figure 1: mean weight of the 3 species of Echinoderms according to the sampling period.



Supplementary figure 2: rarefaction curves.



Supplementary table 1: Results of sequencing data preprocess

Process Species / type	Demultiplexing-merging	Clustering	removing Chimera	Tax. affiliation	Data for analysis (after removing singletons and contaminants)	
	paired-end assembled sequences	Sequences	Sequences	Sequences	Sequences	OTUs
<i>Holothuria forskali</i>	11 042 942	6 437 256	6 411 318	6 302 164	2 948 191	9 927
<i>Marthasterias glacialis</i>	8 909 074	4 327 330	4 259 867	4 200 360	2 493 538	7 696
<i>Sphaerechinus granularis</i>	10 406 577	3 516 116	3 389 431	3 330 994	2 738 863	7 424
seawater	2 729 654	309 801	301 858	289 832	757 124	2 563
<b>Total</b>	<b>33 088 247</b>	<b>14 590 503</b>	<b>14 362 474</b>	<b>14 123 350</b>	<b>8 937 716</b>	<b>17 101</b>

Supplementary table 2: relative abundance and OTUs content of the 15 first orders for the 3 echinoderms

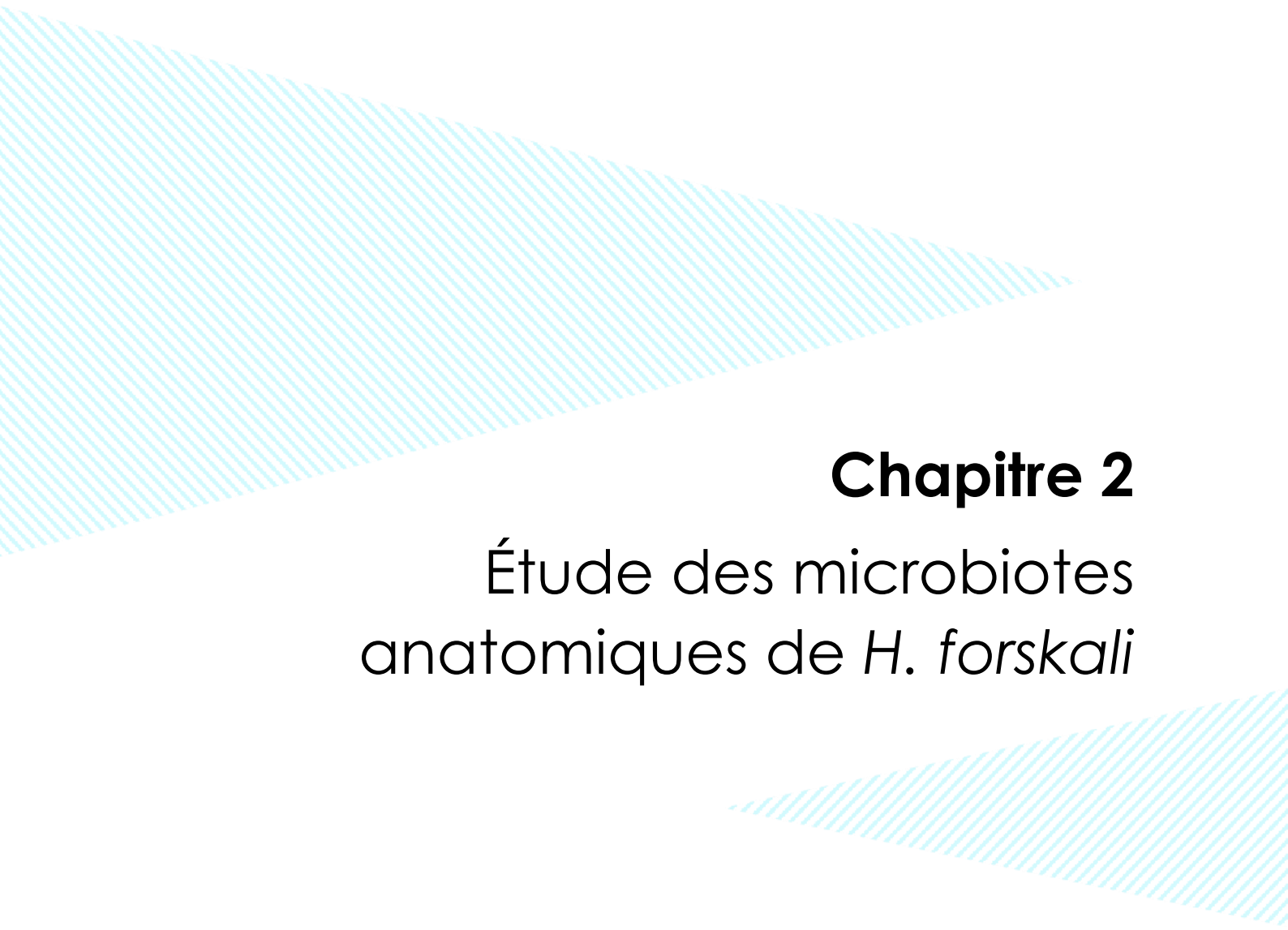
<i>H. forskali</i>				<i>M. glacialis</i>				<i>S. granularis</i>				Seawater			
Orders	Relative abundance e (%)	number of OTUs	Number of OTUs with abundance e >1%	Orders	Relative abundance e (%)	number of OTUs	Number of OTUs with abundance e >1%	Orders	Relative abundance e (%)	number of OTUs	Number of OTUs with abundance e >1%	Orders	Relative abundance e (%)	number of OTUs	Number of OTUs with abundance e >1%
<i>Alteromonadales</i>	9.9%	633	1	<i>Alteromonadales</i>	8.6%	373	1	<i>Alteromonadales</i>	3.1%	220	1	<i>Alteromonadales</i>	1.1%	57	0
<i>Bacillales</i>	1.9%	94	0	<i>Bacteroidales</i>	2.9%	215	0	<i>Bacillales</i>	1.7%	78	0	<i>Bacillales</i>	1.3%	21	0
<i>Burkholderiales</i>	18.3%	731	2	<i>Burkholderiales</i>	18.7%	577	2	<i>Bacteroidales</i>	1.4%	125	0	<i>Burkholderiales</i>	32.1%	252	2
<i>Caulobacterales</i>	1.3%	71	0	<i>Caulobacterales</i>	1.6%	62	0	<i>Burkholderiales</i>	43.1%	634	2	<i>Cellvibrionales</i>	2.0%	54	0
<i>Corynebacteriales</i>	1.8%	137	0	<i>Chlamydiales</i>	2.7%	125	1	<i>Corynebacteriales</i>	1.8%	118	0	<i>Flavobacteriales</i>	18.0%	322	4
<i>Cytophagales</i>	1.3%	106	0	<i>Chromatiales</i>	2.1%	22	1	<i>Diplonickettsiales</i>	1.4%	122	0	<i>Lactobacillales</i>	2.0%	28	1
<i>Enterobacterales</i>	3.2%	96	2	<i>Entomoplasmatales</i>	8.4%	80	1	<i>Enterobacterales</i>	2.9%	76	1	<i>Marine Group II</i>	5.2%	13	2
<i>Flavobacteriales</i>	13.9%	706	2	<i>Flavobacteriales</i>	3.0%	274	0	<i>Flavobacteriales</i>	2.7%	221	0	<i>Nitrosopumiliales</i>	1.1%	5	0
<i>Lactobacillales</i>	1.2%	114	0	<i>Francisellales</i>	4.1%	65	1	<i>Lactobacillales</i>	2.4%	128	0	<i>Pseudomonadales</i>	0.9%	51	0
<i>Peptostreptococcales T.</i>	1.9%	84	0	<i>Oceanospirillales</i>	2.0%	68	1	<i>Micrococcales</i>	1.7%	222	0	<i>Puniceispirillales</i>	3.2%	35	1
<i>Propionibacteriales</i>	1.3%	94	0	<i>Pseudomonadales</i>	2.1%	149	0	<i>Peptostreptococcales-T.</i>	2.6%	84	0	<i>Rhizobiales</i>	2.7%	732	0
<i>Pseudomonadales</i>	4.4%	277	1	<i>Rickettsiales</i>	2.4%	103	0	<i>Propionibacteriales</i>	1.6%	85	0	<i>Rhodobacteriales</i>	7.8%	107	4
<i>Rhizobiales</i>	1.8%	2713	0	<i>Sphingobacteriales</i>	2.9%	85	1	<i>Pseudomonadales</i>	4.3%	235	1	<i>SAR86 clade</i>	2.4%	22	4
<i>Rhodobacteriales</i>	5.0%	287	2	<i>Spirochaetales</i>	9.5%	74	2	<i>Rhizobiales</i>	2.1%	2184	0	<i>Sphingomonadales</i>	1.1%	34	0
<i>Vibrionales</i>	5.6%	221	2	<i>Vibrionales</i>	3.2%	161	2	<i>Vibrionales</i>	4.7%	109	1	<i>Vibrionales</i>	1.2%	16	0
<b>Total</b>	<b>72.8%</b>	<b>6364</b>	<b>38.0%</b>	<b>Total</b>	<b>74.1%</b>	<b>2433</b>	<b>53.3%</b>	<b>Total</b>	<b>77.6%</b>	<b>4641</b>	<b>48.2%</b>	<b>Total</b>	<b>82.1%</b>	<b>1749</b>	<b>52.7%</b>

## 2.3 Conclusion du chapitre et perspectives

Les microbiotes coelomiques des 3 espèces d'échinodermes vivant dans un même habitat, le concombre de mer *H. forskali*, l'étoile de mer *M. glacialis* et l'oursin *S. granularis* ont été analysés à partir de collectes réalisées pendant 2 ans sur un site finistérien. Les résultats obtenus par metabarcoding 16S valident l'existence d'un microbiote spécifique d'un hôte échinoderme, mais également d'un core microbiote des échinodermes, commun aux 3 espèces. Des souches à activité antibactérienne ont été isolées à partir des microbiotes cultivables, posant la question du rôle de ces souches dans le liquide coelomique de l'hôte, compartiment notamment associé à l'immunité de l'animal. Par ailleurs, la présence de ces souches à activité antibactérienne offre des perspectives pour de futures applications en biotechnologie.

La plasticité et la spécificité des microbiotes analysés suggèrent une sélection du microbiote à l'échelle de l'holobionte.

A l'échelle d'un hôte spécifique, existe-t-il différents niveaux d'organisation et de sélection du microbiote ?



## **Chapitre 2**

# Étude des microbiotes anatomiques de *H. forskali*



## 3. Étude des microbiotes anatomiques de *H. forskali*

### 3.1 Préambule

Le présent chapitre a pour objectif d'établir l'existence ou non de microbiotes compartimentés chez *H. forskali*, en fonction des organes ou systèmes (fig. 20). Ainsi, 3 compartiments anatomiques ont été étudiés : (i) l'épiderme, compartiment anatomique externe, en contact direct avec l'environnement, (ii) le tractus gastro-intestinal, compartiment interne en lien indirect avec l'environnement, et (iii) le liquide coelomique, compartiment interne sans contact avec l'environnement.

Pour se faire, des collectes en milieu naturel ont été réalisées sur 2 sites en Finistère (Bretagne, France) en parallèle, à différentes périodes de l'année 2020. Ces échantillonnages permettront également de déterminer s'il existe, à l'échelle d'un compartiment anatomique donné, des variations spatio-temporelles du microbiote, et s'il existe un ou des core(s) microbiote(s) chez *H. forskali*. Les travaux sont présentés sous la forme d'un manuscrit en préparation à soumettre pour publication.

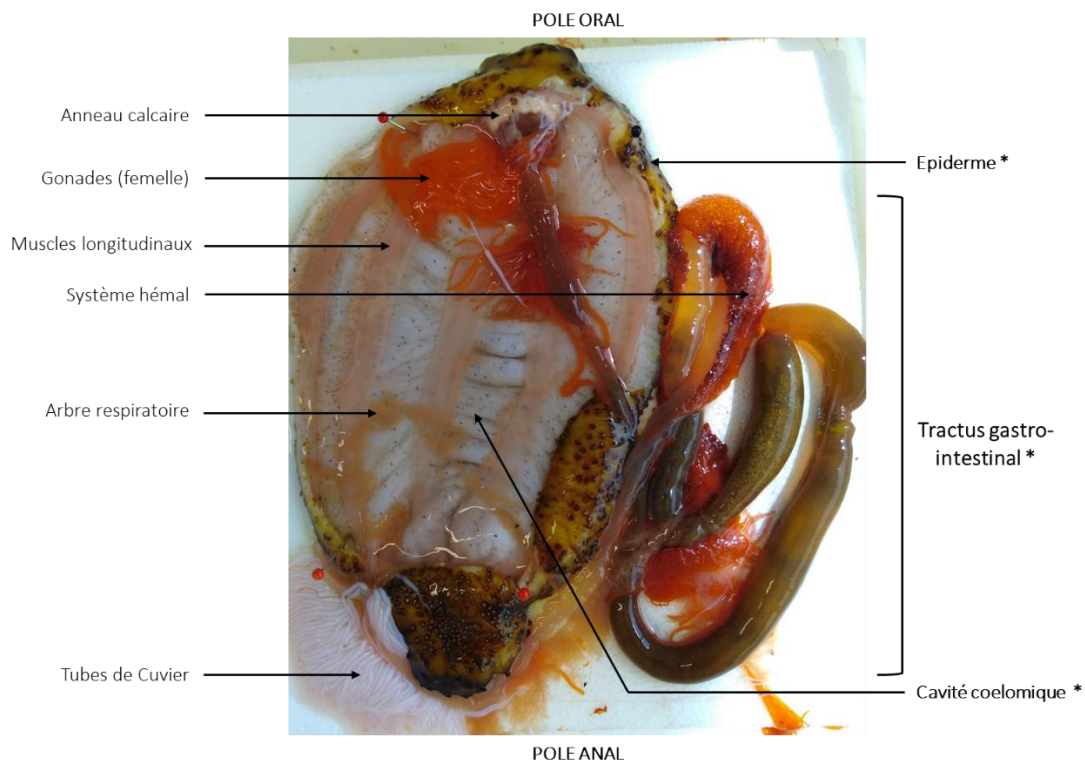


Fig. 20 : Morphologie générale interne de *H. forskali*. Les compartiments anatomiques étudiés dans la thèse sont signalés par un astérisque.

## 3.2 Publication 2 (Draft)

# Multiscale analysis of the sea-cucumber *H. forskali* microbiota exhibited an anatomical-specific microbiota and spatiotemporal variations

Laguerre Hélène<sup>1</sup>, Offret Clément<sup>1</sup>, Noël Cyril<sup>2</sup>, Miquel Christian<sup>3</sup>, Jegou Camille<sup>1</sup>, Fleury Y. <sup>1</sup>, Le Chevalier P. <sup>1</sup>

1. University of Brest, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, F-29334 Quimper, France

2. IFREMER-IRSI-Service de Bioinformatique (SeBiMER), 1625 Route de Sainte-Anne, 29280 Plouzané

3. UMR CNRS 5553, Université de Grenoble – Alpes, 38041 Grenoble

---

### Summary

The Black Sea-cucumber *Holothuria forskali* was a new targeted species for aquaculture but knowledge on its biology were almost non-existent and the species remained mysterious. Studying its associated microbiota was a way towards the development of a controlled and sustainable aquaculture. In this study, the microbiota of three anatomical compartments of the host *H. forskali* were analysed: the skin, the gastro-intestinal tract and the coelomic fluid, across three periods of the year 2020 and in parallel in two sites of South Brittany. Results exhibited significantly different bacterial assemblages for each compartment, in terms of diversity, composition and abundance, and also different from the ambient sediment and seawater. Moreover, analysis of bacterial communities of the three microbiota showed spatio-temporal variations, mainly between the winter in comparison with samples from summer and autumn. Analysis of the specificities at an anatomical scale reflected specific taxa and families associated to each compartment, with a potential role in the host health. Results also exhibited relationship between the anatomical microbiota and their ambient environment. In fact, abundance of common taxa between the sediment and the gastro-intestinal microbiota validated the feeding behaviour of the host *H. forskali*. This study highlighted the importance of the microbiote for the host, and validated the existence of anatomical-related microbiota in the holobionte *H. forskali*.

**Key-words:** Microbiota, *Holothuria forskali*, Echinodermata, sea-cucumber, coelomic microbiota, gastro-intestinal microbiota, skin microbiota, V4-16S metabarcoding, bacterial community, anatomical microbiota.

## INTRODUCTION

Sea-cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata) were traditionally sought species in Asian market as luxury food (1,2), and the attraction of Asian populations for them had led to an overexploitation of natural stocks and a development of large sea-cucumbers farming (3,4). In a lesser extent, they were also studied for their antibacterial or anti-cancer compounds (5). The development of infectious disease in shellfish farming in Europe and the recent interest for European sea-cucumbers have conducted to focus on domestication trials of new species such as *Holothuria tubulosa*, *H. arguinensis*, *H. polii* or *H. forskali* (6–10).

Otherwise, aquaculture research had opened up to new areas of investigation from the theory of the hologenome (11–13) and the discovery of the roles of the microbiota on host health (14,15) and its correlation with zootechnical performances (16,17), that was made possible with the development of high-throughput sequencing technologies (18–20). In this context, study and understand the relationships between target species and their microbiota was primordial. Many studies have demonstrated the existence of anatomical microbiota or tissue-specific microbiota associated to a host (16,21–24). In Holothurians, studies were mainly focused on the most commercial species *Apostichopus japonicus*, and described the gut microbiota (25–28) and the coelomic microbiota (29), and correlations with disease (30) or zootechnical performances (17,31). Few studies have been conducted on microbiota of temperate waters and European holothurians. *H. forskali*, a new candidate species for aquaculture targeted by the Asian market, was a detritivorous sea-cucumber from temperate water that could be found from the N-E Atlantic to the Mediterranean Sea (9,32). Knowledge on their associated microbiota remained anecdotal (32,33). Its coelomic microbiota has shown the presence of antibacterial strains of bacteria, of highly diverse, specific and variable bacterial communities dominated by Proteobacteria and Flavobacteriales (32,33).

In this study, the microbiota of three anatomical compartments of *H. forskali* (coelomic fluid, gastrointestinal tract and skin) and the bacterial community of two environmental compartments (seawater and sediment) were analysed and compared in two sites and in three sampling periods. The aim of this study was first to describe the composition of the microbiota among three anatomical compartments of *H. forskali* and then, to analyse their spatiotemporal variations and their specificities. Different indicators have been used to demonstrate both the relationships and the specificities of each anatomical microbiota: (1) the anatomical-associated core microbiota based on a prevalence score, then (2) the anatomical specific microbiota composed by unshared taxa, and finally (3) patterns of taxa with a specific differential abundance.



## Material and methods

### Animal collection

In this study, six samplings were carried out in different times in 2020 and in two sites from the West Coast of Brittany, France (fig. 1, tab. 1). The Glenan Archipelago was composed by nine main islands and several rocky islets located in the Bay of Concarneau at 13 km from the coast. The diving area in the North of the Archipelago (WGS84: 47°43'57.76"N and 04°00'50.99"W) was reached by nautical facilities. The Port of Brezellec (WGS84: 48°4'15.48"N and 04°39'44.98"W) was located at the Western tip of Brittany, in the Bay of Douarnenez, and was constituted by rocky cliffs and the diving area was directly accessible from the coast. The two sampling areas were characterized by rocky beds colonized by kelp. For each sampling collection, 15 specimens of *H. forskali* were collected by scuba diving between 8 and 12 meters depth. Animals were mainly found on vertical walls in both locations. Animals were stored in 50 L tanks filled with local seawater and directly transferred to the laboratory. Ambient seawater (n=3) and sediment deposited on the rocks (n=3) were collected with a sterile 20 mL syringe and then put in sterile 15 mL centrifuge tubes.



Fig. 1: Sampling areas in the West Coast of Brittany, France. The Port of Brezellec in the western tip of Brittany (site and diving area located with a green point noted "BZ"), and the Glenan Archipelago in the south west coast of Brittany (site and diving area located with a blue point, noted "GL").

Tab. 1: sampling conditions in the two sites: dates, seawater temperature and season.

	Date: (dd/m)	Site	Seawater temperature (°C)	Season
2020	31/1	Brezellec	10	winter
	22/1	Glenan	10	winter
	26/5	Brezellec	15	summer
	2/6	Glenan	15	summer
	29/9	Brezellec	16	autumn
	16/10	Glenan	14	autumn

## Recovery of biological fractions

At the laboratory, animals (n=15 per collection date) were weighted (suppl. fig. 1) and quickly dissected to collect the three biological fractions: the skin microbiota (n=15 per sampling date), the coelomic microbiota (n=15 per sampling date) and the gastro-intestinal microbiota (n=15 per sampling date) (suppl. fig. 2). The dissection were conducted in the most possible aseptic conditions under Bunsen burner, and manipulations were made with gloves. First, 10 cm<sup>2</sup> of dorsal surface of the skin were swabbed, put in a 1.5mL microcentrifuge tube and vortexed with sterile artificial seawater. Then, the animal's body surface was washed and disinfected with 70% ethanol and the coelomic fluid was collected with a 25G needle and a 2.5mL sterile syringe by insertion through the body wall in the ventral side. Finally, animals were dissected by ventral incision, and the gastro-intestinal tract was ligatured, removed from the animal, the walls of the digestive tract and its content were compressed and the liquid collected in a sterile 15 mL centrifuge tube. All the samples were stored on ice before processing. Sample were then centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes. Supernatants were removed and the pellets were then stored at -20°C before further analysis.

## Microbiota analyses with Metabarcoding 16S

### Genomic DNA extraction and sequencing

Genomic DNA was extracted with the Qiagen DNA Stool mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with minor modifications (an initial step at 95°C to improve lysis of Gram-positive bacteria). Samples of DNA were then amplified at the AnaEE Platform (Grenoble, France) in 4 replicates and negative controls were added for the randomised PCR. The barcoded primers used for amplification were Bact02F (5'-GCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and rBact02R (5'-GGACTACCMGGGTATCTAA-3') targeting the V4 Region of the 16S rDNA gene, according to the Metafast protocol (35). Sequencing was then performed with the technology Illumina MiSeq (2x250 pb) by FASTERIS (Geneva, Switzerland).

### Pre-processing on sequencing data

After quality control and trimming on sequences, sequences were assigned to samples with ngsfilter from the ObiTools (36) and then processed using Frogs 3.1.0 (37,38) available in the Galaxy server Genouest: R1 and R2 sequences were merged by pairs, chimera were removed with VSearch (39,40), and sequences were clustered with Swarm (with a distance for aggregation of 3) (38). Finally, singletons and low abundance sequences (minimum abundance threshold <5.106) were filtered and removed from data and remaining sequences were taxonomically assigned as OTUs (Operational taxonomic

Units) with Blast (41) and the SILVA 138 (pintail 100) database. OTUs identified as contaminants were manually removed from data.

### Statistical analysis

The data (count table, OTUs table and samples data) were loaded in R (42) as a *phyloseq* object to analyse and compare the bacterial communities of the three anatomical microbiota of *H. forskali* (coelomic fluid, gastro-intestinal tract and skin) and the two environmental compartments (seawater and sediment), with the packages *phyloseq* (43). Alpha diversity indices were first calculated (Chao1 richness, Inverse Simpson and Shannon's diversity indices) and the means were compared according to the variable "biological compartment" with the non-parametric test of Kruskal-Wallis (p-value threshold 0.05). Rarefaction curves were drawn with the function *rarecurve* from the *vegan* R package (44). For the beta-diversity analysis of the bacterial communities, the OTU table was transformed using the function *decostand* and the count transformation of Hellinger (44–46), the distance matrix was built with the function *vegdist* based on the Bray-Curtis distance, and plotted with the function *metaMDS* (47) from *vegan* and the R package *ggplot2* (48). A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA, n=999 permutations) was done with the function *Adonis* (49). Composition of the three anatomical microbiota and bacterial communities from environmental compartments were then compared at two taxonomical ranks, phylum and family, with R and Excel. The anatomical-specific core microbiota of *H. forskali* was explored with the R package *microbiome* (50), using a prevalence threshold of 0.5. The specific microbiota of each anatomical compartment was also determined with unshared OTUs from the holobiont *H. forskali*. Finally, a correlation analysis was performed at the family level (algorithm: pearson's correlation, permutations = 100, p-value= 0.05, correlation threshold 0.3) and a linear discriminant analysis (LDA) on effect size (LEfSe) was made with the package *Lefse* (51) (adjusted p-value cutoff: 0.05; log LDA score:2) available on Microbiome Analyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca>) (52,53).

## RESULTS

### Data description and preprocess on sequencing data

After six sampling collections in the two sites, 309 samples have been analysed: 91 samples of coelomic microbiota, 91 samples of skin microbiota, 91 samples of gastrointestinal contents, 18 samples of sediment and 18 samples of seawater. After sequencing, 68,662,807 sequences with an average length of 311pb have been merged. The mean library size was  $222,210 \pm 97,379$  sequences per sample (suppl. tab. 1). After clustering, cleaning and filtering, 11,328,782 sequences were taxonomically assigned with the Silva 138 database and 8,610 OTUs were used for microbiota analysis.

Alpha-diversity

For the samples of anatomical microbiota of *H. forskali* and the bacterial communities of seawater, 8,610 OTUs were constituted. The coelomic microbiota of *H. forskali* was composed by 3,576 OTUs, the gastro-intestinal tract 5,106 OTUs, the skin 3,159 OTUs, the seawater 1,658 OTUS and the sediment 3,266 OTUs. The highest observed and estimate richness was observed for the samples of sediment (Observed richness: 1,072±297 OTUs, Chao1: 1,427±299; mean ± sd, suppl. tab. 2) (fig.2A-B, tab. 2), followed by the gastro-intestinal microbiota (Observed richness: 395±200; Chao1: 523±222) (fig. 2A,C). The richness and estimate richness for the samples of coelomic microbiota, skin microbiota and seawater were lower and comprised between 170 and 258 OTUs per sample (fig. 2A-C, suppl. tab. 2). Concerning the diversity indices of Shannon and Inverse Simpson, the differences were attenuated, even if the values for the samples of sediment and gastro-intestinal microbiota were greater (fig. 2, suppl. tab. 2). Moreover, analysis of the different alpha diversity indices revealed that the bacterial communities of sediment was composed by a lot of species but with low abundances, and on the contrary, the gastro-intestinal tracts a high proportion of abundant OTUs, validated by the rarefaction curves. Thus, the differences of richness and diversity between the different sample types was statistically demonstrated by non-parametric tests of Kruskal-Wallis (tab. 2).

Table 2: statistics on alpha-diversity indices, calculated for each anatomical microbiota (Kruskal-Wallis test, p-value threshold 0.05).

Variables	Samples	df	Chao1		Shannon		Inverse Simpson	
			chi-squared	p-value	chi-squared	p-value	chi-squared	p-value
anatomical compartment	309	4	131.45	< 2.2e-16 *	119.24	< 2.2e-16 *	62.618	8.165e-13 *

\* significant for p-value < threshold 0.05

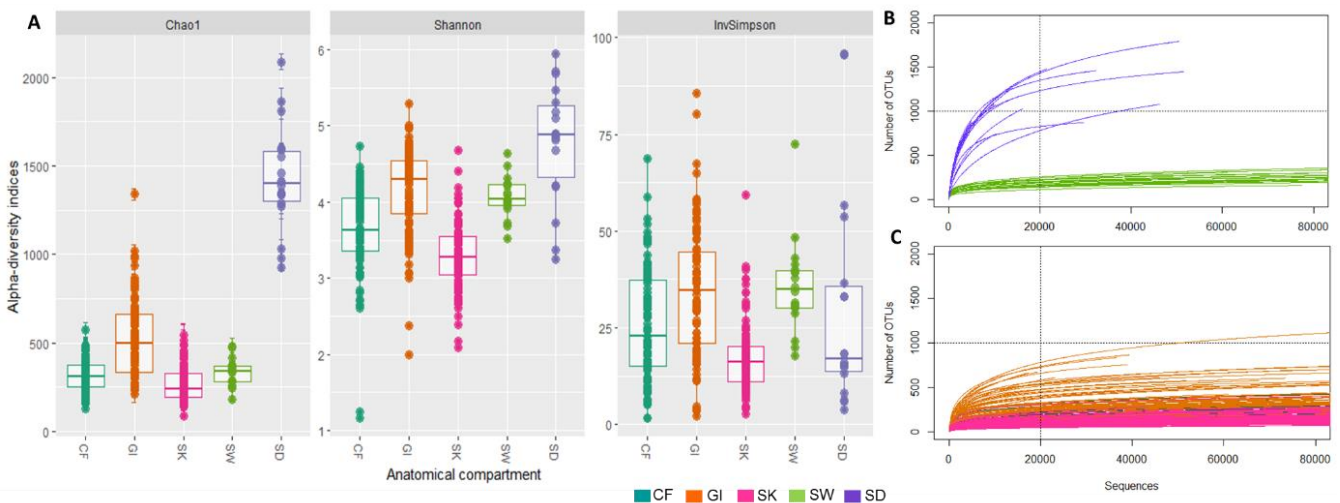


Fig. 2: Alpha-diversity analysis. A: Chao1 richness, Shannon’s and inverse Simpson’s diversity indices according to anatomical and environmental compartment; B: Rarefaction curves of environmental samples; C: Rarefaction curves of anatomical microbiota of *H. forskali*. Code: CF= coelomic fluid microbiota, GI= gastro-intestinal tract, SK= skin, SW= seawater, SD= sediment.

## Beta-diversity

Beta-diversity analysis was built with the Bray-Curtis distance metrics. Samples were grouped together according to the type of sample (coelomic fluid microbiota, gastro-intestinal microbiota, skin microbiota, bacterial communities of seawater and sediment), validated by the permutational multivariate analysis of variance (fig. 3, tab. 3). Moreover, in each of the three anatomical compartments, the nMDS plots demonstrated a temporal division (tab. 3, suppl. fig. 3), and also of a spatial organisation clearly visible for the skin microbiota and the coelomic fluid microbiota (tab. 3, suppl. fig. 3). The sampling period and the site influenced both the three anatomical microbiota, validated by statistics (tab. 3, suppl. fig. 3). For the two environmental compartments, samples were grouped by type and by period of sampling (suppl. fig. 3).

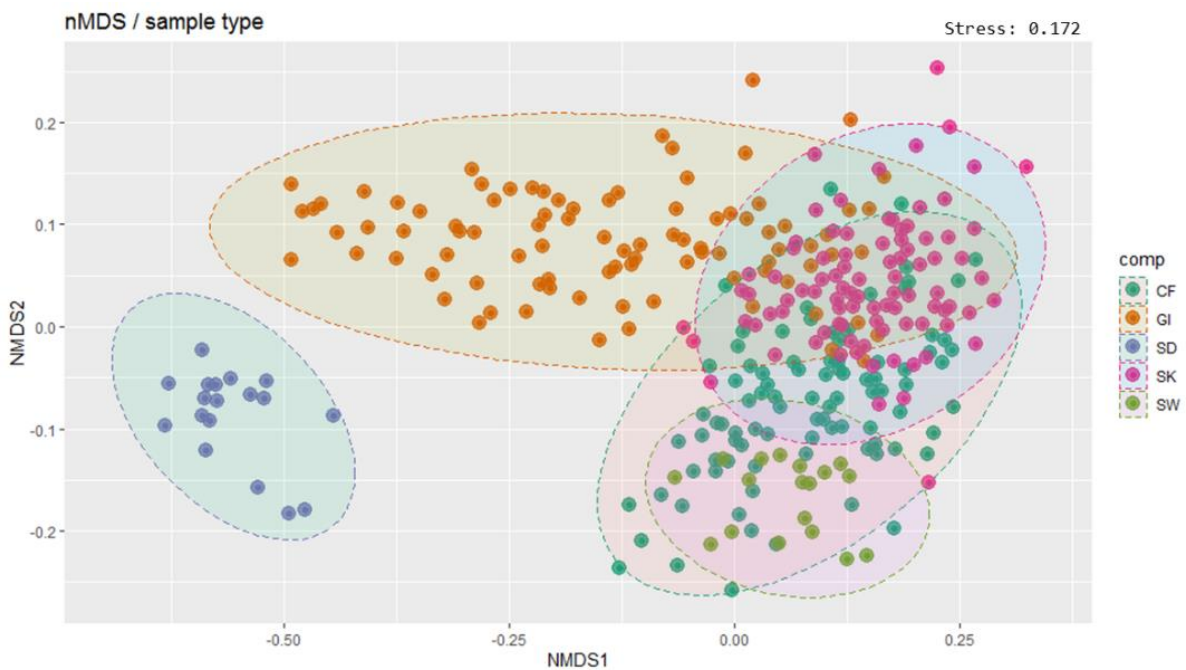


Fig. 3: nMDS plots of samples dissimilarities based on the Bray-Curtis distance. nMDS plot of all microbiota samples with 95% confidence ellipses. Code: CF= coelomic fluid microbiota; GI= gastro-intestinal microbiota ; SK= skin microbiota ; SW= seawater ; SD= sediment.

Table 3. Permutational multivariate analysis of variance (Permanova) conducted on microbiota data, according to the anatomical compartment, the site and/or the period of sampling. Number of permutations: 999; method: distance of Bray-Curtis; p-value threshold 0.05.

Anatomical compartment	Variables	PERMANOVA					
		df	Sum Of Sqs	R <sup>2</sup>	F	p-value	
All	anatomical compartment	4	18.297	0.19231	18.096	0.001	*
Coelomic fluid (n=91)	site	1	0.6524	0.02745	2.754	0.001	*
	period	2	2.5081	0.10551	5.2935	0.001	*
	site x period	5	4.7959	0.20175	4.2965	0.001	*
gastro-intestinal tract (n=91)	site	1	0.5805	0.02359	2.3778	0.005	*
	period	2	2.7847	0.11319	5.7037	0.001	*
	site x period	5	4.5976	0.18687	3.9068	0.001	*
skin (n=89)	site	1	0.4559	0.02179	2.0608	0.005	*
	period	2	1.217	0.05817	2.7505	0.001	*
	site x period	5	2.6263	0.12553	2.4404	0.001	*

\* significant for p-value < 0.05

### Composition of bacterial communities of the three anatomical microbiota of *H. forskali* and the environment

The bacterial communities and microbiota were dominated by the Proteobacteria whatever the sample concerned, with a mean abundance of 57%, with a range from 42% for the seawater samples to 63% in the sediment (suppl. fig. 4). The Bacteroidota (14%), the Actinobacteria (10%) and the Firmicutes (7%) were also abundant in all samples.

The composition of the bacterial communities and the microbiota varied at the rank family according to the sample type (fig. 4B, suppl. fig. 5). 14 families accumulated between 40% and 56% of the total abundance and their relative abundance highly varied between samples. In the coelomic fluid microbiota, the *Flavobacteriaceae* (9%), the *Pseudoalteromonadaceae* (7%) and the *Vibrionaceae* (6%) were the most abundant families, with a higher abundance of *Flavobacteriaceae* in winter, decreasing in summer and autumn in favor of *Vibrionaceae*. The composition of the skin microbiota was closed to the coelomic microbiota with a high content of *Comamonadaceae* (6%), with more variations according to time and site. In the gastro-intestinal microbiota, the main families were the *Rhodobacteraceae* (14%), the *Haliaceae* (14%) and the *Flavobacteriaceae* (6%), and compositions exhibited variations between samples in winter in comparison with autumn and summer, with an increase of *Rhodobacteraceae* and *Haliaceae*, whatever the site concerned. Moreover, compositions were different between the two sites in winter. For environmental samples, compositions of bacterial communities

were different between sediment and seawater, with a dominance of *Flavobacteriaceae* in seawater samples (21%), and of *Vibrionaceae* in sediment (26%).

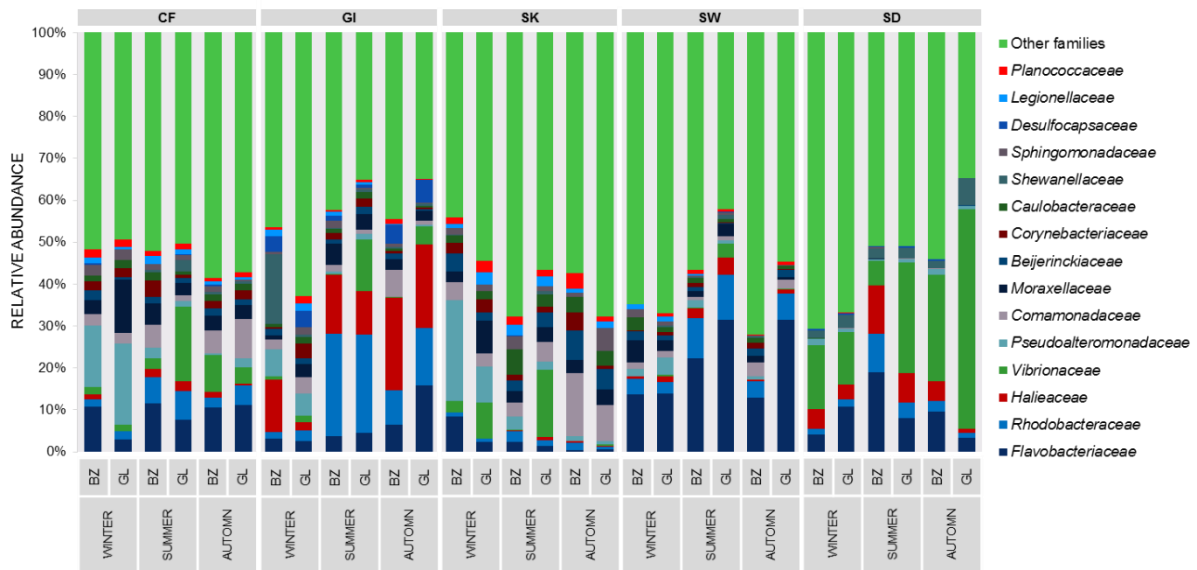


Fig. 4: Relative abundance of the 15 principal families present in each type of sample. Code: CF= coelomic fluid microbiota; GI= gastro-intestinal microbiota ; SK= skin microbiota ; SW= seawater ; SD= sediment; BZ= site of Brezzellec; GL= Glenan Archipelago.

### Anatomical-associated core microbiota

The core microbiota could be analysed at different scale: the holobiont (suppl. fig. 6), or at a tissue-specific scale. The three anatomical-associated core microbiota have been determined: the coelomic, gastro-intestinal and skin microbiota (fig. 5), using a minimum prevalence threshold of 0.5 among samples.

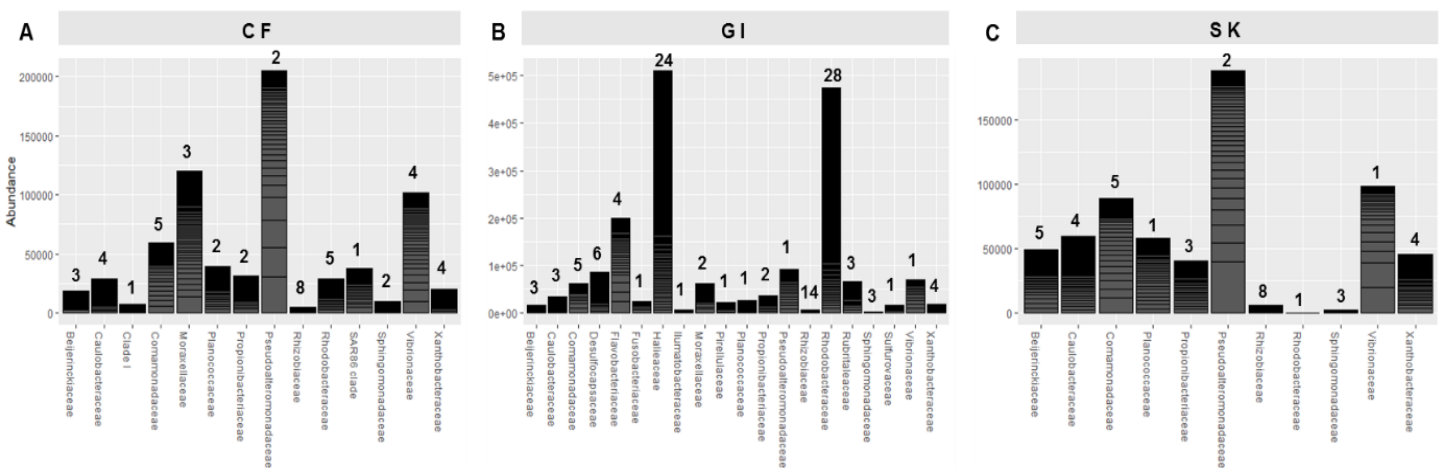


Fig. 5: Abundance plots of the three anatomical-associated core microbiota, at the taxonomic rank family. A. CF: Coelomic fluid core microbiota; B. GI: Microbiota of the gastro-intestinal tract; C. SK: skin microbiota. Values on each bar plot: number of core OTUs per family. Code: CF= coelomic fluid microbiota ; GI= gastro-intestinal microbiota ; SK= skin microbiota.



These core microbiota were chosen to be temporally and spatially stable. The coelomic core microbiota was constituted by 47 OTUs (fig. 5A), among which two abundant *Pseudoalteromonadaceae*. The gastro-intestinal microbiota, the most diverse of the three anatomical compartments, was composed by 109 core OTUs, and was dominated in term of diversity and abundance by *Rhodobacteraceae* (28 OTUs) and *Haliaceae* (24 OTUs) (fig. 5B). The skin microbiota contained 37 core OTUs and two abundant taxa of *Pseudoalteromonas* (fig. 5C). In these anatomical-associated core OTUs, 29 OTUs were shared between the three compartments.

### Anatomical-specific microbiota

Anatomical-specific OTUs have been determined, from unshared and specific OTUs from the holobiont *H. forskali*. From the 7,503 OTUs present in the different microbiota of the host *H. forskali*, 4,414 were unshared with the environment (59%). In these 4,414 OTUs, only a weak part was shared between the three anatomical compartments (453 OTUs, 10%). In the unshared OTUs, 807 were specific from the coelomic microbiota (representing 23% of the total coelomic microbiota), 1,570 from the gastro-intestinal microbiota (31% of the total gastro-intestinal microbiota) and 856 for the skin microbiota (27% of the total skin microbiota) (fig. 6). The most abundant of the specific OTUs belonged to the *Flavobacteriaceae* (23 OTUs) and *Legionellaceae* (38 OTUs) for the coelomic microbiota, *Legionellaceae* (65 OTUs) and *Pirellulaceae* (68 OTUs) for the gastro-intestinal microbiota, and *Diplorickettsiaceae* (43 OTUs) and *Legionellaceae* (48 OTUs) for the skin microbiota. These specific OTUs were mainly less prevalent OTUs, excepted in the gastro-intestinal microbiota.

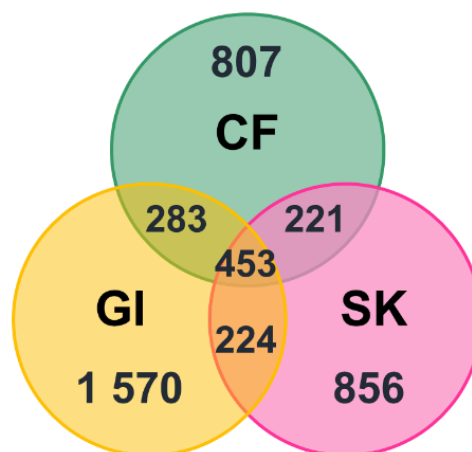


Fig. 6: Specific and unshared OTUs from the three anatomical microbiota of *H. forskali*. Code: CF= coelomic fluid microbiota ; GI= gastro-intestinal microbiota ; SK= skin microbiota.



### Differential abundance analysis

The different abundance profiles between the three anatomical microbiota have been analysed with the package *LEfSe* (fig. 7). This differential abundance analysis highlighted the variation of composition in each anatomical compartment, with relevant families, validated by correlation analysis (suppl. fig. 7). Thus, the families *Haliaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Desulfocapsaceae* or *Rubritaleaceae* were significantly more abundant and representative from the gastro-intestinal microbiota, while the marine families SAR116 clade or SAR86 clade were linked to the coelomic microbiota for example. At a lower taxonomic level, genus associated with differential abundance among compartment were identified (suppl. fig. 8), such as the genera *Halioglobus* or *Shewanella* in the gastrointestinal microbiota, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* in the coelomic microbiota, and *Spingomonas* and *Caulobacter* in the skin microbiota.

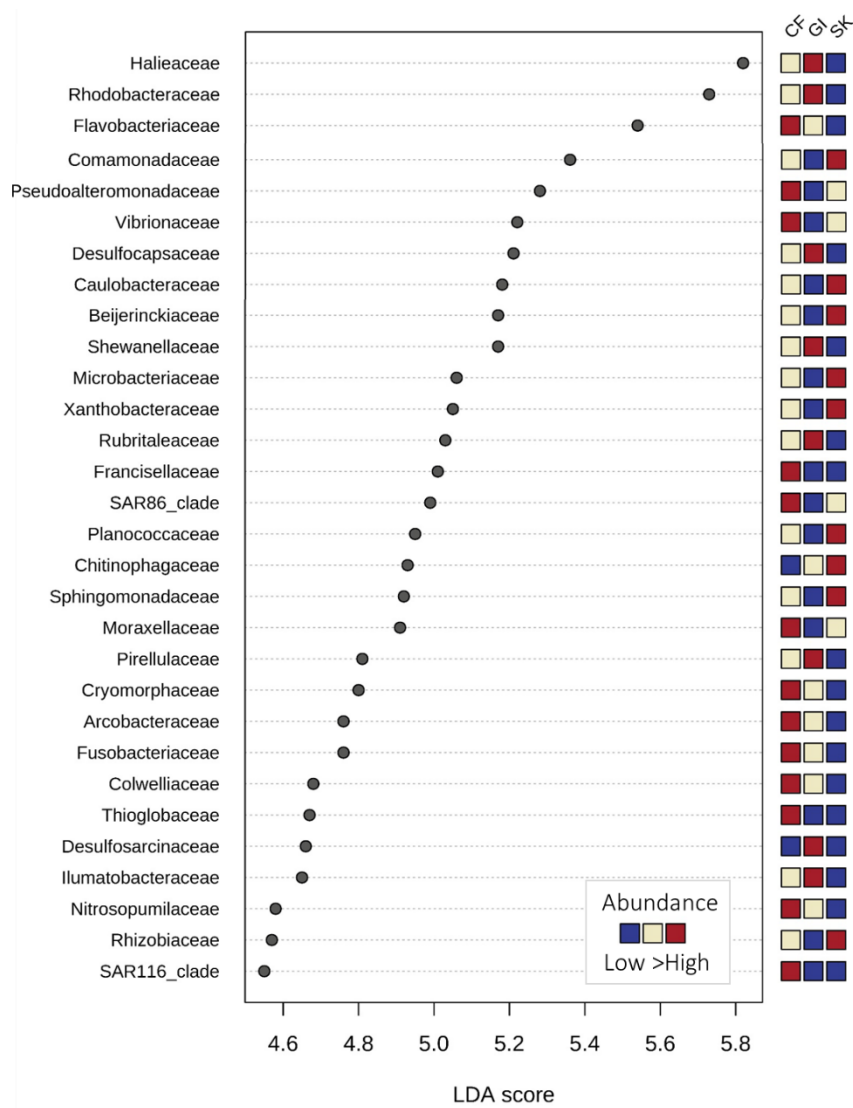


Fig. 7: Differential abundance profiles among anatomical compartment by LDA analysis (Lefse). 30 most relevant families selected with LDA. Code: CF= coelomic fluid microbiota ; GI= gastro-intestinal microbiota ; SK= skin microbiota.

## DISCUSSION

In this studies, the composition of three anatomical microbiota in the host sea-cucumber *H. forskali* has been analysed and followed in two sites in parallel in Brittany (France) and in three different periods of 2020.

### Bacterial assemblages linked to anatomical microbiota and temporally-variable

Bacterial communities from three anatomical microbiota of the host sea-cucumber *H. forskali* and two environmental compartments have been analysed and compared: seawater samples (n=18), sediment samples (n=18), coelomic microbiota (n=91), gastro-intestinal microbiota (n=91) and skin microbiota (n=91). These anatomical microbiota were compared by several analysis: alpha-diversity, composition and evaluation of community dissimilarities. Analysis of samples from the three anatomical microbiota (n=15 per type of sample and per sampling date) and bacterial communities of seawater (n=3 per sampling date) and sediment (n=3 per sampling date) exhibited relevant differences in terms of intrinsic richness and diversity, with the highest values for the gastro-intestinal microbiota in comparison with the coelomic and the skin microbiota. The differential richness and intrinsic diversity among anatomical microbiota of a marine invertebrate host have already been described in a shellfish (21,22) and in sea-stars (22,54). In addition, the beta-diversity analysis based on communities dissimilarities with the Bray Curtiss metrics and composition of the three microbiota at the rank family demonstrated the existence of distinct bacterial communities for each of the three anatomical compartments, and also distinct from the environmental bacterial communities of seawater and sediment. Moreover, these specific assemblages significantly varied over time and secondary over site (55–59), whatever the analysis chosen.

### A gastro-intestinal microbiota highly diverse, revealing the feeding behaviour of the host

The sediment first and the gastro-intestinal tract harboured the most rich and diverse bacterial communities in comparison with the other anatomical compartments and the seawater. Moreover, analysis of the alpha-diversity indices showed that the sediment communities was composed by a lot of abundant OTUs by samples and the gastro-intestinal microbiota by many less abundant OTUs. In low anthropized ecosystems, the high diversity of bacterial communities of sediments have already been demonstrated (60,61) and linked to ecosystemic services like organic matter decomposition or as a feed source for detritivorous animals (62). These results could be explained by the feeding behaviour of the sea-cucumbers, which fed on the ambient sediment (63,64) and incorporated bacteria from the sediment in its microbiota (26). The gastro-intestinal microbiota and the bacterial communities of sediments shared 1,993 OTUs between them, representing 39% of the total OTUs of the gastro-

intestinal content, and in these shared OTUs, 47% were specific and only found in these two sample types (n=943 OTUs) (data not shown). These specific OTUs shared between the gastro-intestinal microbiota and the bacterial communities of sediment belonged to abundant families of the gut microbiota, such as *Haliaceae*, *Thermoanaerobaculaceae*, or *Pirellulaceae*, or typical families of bacteria described in sediments, such *Sedimenticolaceae*, *Haliaceae* or *Desulfolunaceae* (65,66). These last families were correlated with differential abundances between the gastro-intestinal microbiota and bacterial community of sediment in comparison with the other compartments. These results validated the feeding behaviour and the food source for the host *H. forskali* (67,68). Finally, the gastro-intestinal microbiota was also subject to spatiotemporal variations, with a main contribution of the variable sampling period compared to the site. Results on temporal variations were concordant with biological observation on the host *H. forskali* and with studies in other marine invertebrates. In late Winter in the study area, natural broodstock of *H. forskali* stopped or limited their feeding until spawning in April – May (8,9,67). Otherwise, seasonal variations in the surrounding environment such as phytoplankton succession, seaweed development, or winter storms for example, had consequences on organic matter available and on bacterial assemblages in sediment. To a lesser extent, spatial variations of the gastro-intestinal microbiota had also been registered and were probably link to local environmental factors such as feeding availability and sediment composition (26,55,69).

### A skin microbiota mirror of its environment

The skin microbiota exhibited spatial and temporal variations, between site, period, and both variables. The skin was the most external of the three anatomical compartment and, in fact, was directly in contact with the two environmental compartments, seawater (1,006 OTUs shared, 32%) and sediment (821 OTUs shared, 26%). Moreover, 56% of the taxa (1,754 OTUs) were absent in environmental samples and should probably originated from the host itself and/or from other environmental compartments, constituted by the other eukaryotic organisms living in the same habitat, contributing to exchanges of bacteria. Thus, these variations of microbiota were characteristic from the host habitat and other environmental factors. This proximity contributed to the diversity of the skin microbiota and of its habitat, and, otherwise, participated to the adaptation of the host to variation of its environment, the skin being the first barrier against pathogens (58,70,71). Results showed that the skin was a defined biological compartment, with its own microbiota.

### The coelomic fluid, the key compartment in echinoderms

In echinoderms, the coelomic fluid was one of the most studied compartments because of its role on host physiology and immunity (72,73). Antitumor compounds, antimicrobial and antifungal strains have been frequently detected in many different species of Echinoderms (34,74,75) and in *H. forskali*

(9,33,34). The coelomic fluid contained its own microbiota, which included a weak part of culturable bacteria (29,33,34). This microbiota has been described to contain unique bacteria (29). In this study, results demonstrated that the coelomic microbiota was different from the other studied compartments in terms of composition, namely differential relative abundance of taxa and presence of unshared taxa. The coelomic microbiota contained 23 % of unshared and unique taxa (807 OTUs) that represented a total abundance of 6.3%, suggesting that less abundant taxa were associated with anatomical-specific microbiota. On the other hand, the coelomic fluid and the environment shared together typically marine taxa, such as the NS9 marine group or the SAR116 Marine Group, and exhibited a positive and significant differential abundance between them compared to the skin and the gastro-intestinal microbiota. Even if the coelomic fluid was in the past described as a closed compartment, presence of marine taxa suggested the existence of exchanges with the environment and mainly the seawater. As the abundances of these taxa in the skin and in the gastro-intestinal microbiota were much lower, the host *H. forskali* should realized exchanges with other organs and potentially through its respiratory tree or its water vascular system. The respiratory tree, attached to the cloaca, was described as an exchange organ, responsible for gas exchange by aspiration of seawater through the anus like a pump, and for excretion of metabolic waste (76–78). Moreover, the coelomic fluid showed spatiotemporal variations, temporal variations was already reported in the haemolymph from oysters (56), and spatial variations in other Echinoderms (79). All the organs of the host Sea-cucumber bathed in the coelomic fluid of the main body cavity and were already linked to it. According to the health of the host, to the maturation stage or to the age of the host for example, physiology and metabolism varied, and the coelomic fluid, through all his functions, should varied too, with its microbiota.

### From bacterial composition to core specific microbiota, associated to anatomical compartment.

Core microbiota was well-studied but the definition and the perimeter of this core microbiota was already discussed (80–83). It was noted that the core microbiota could be investigated at different scale, from a tissue-specific core microbiota to a wide common microbiota of a host or an habitat (82). According to the authors and the studies, the parameters used to focus on microbiota could be the prevalence with highly variable threshold according to authors (84,85), the prevalence correlated with an abundance threshold (81,82), the presence of shared or unshared taxa, often linked with less abundant taxa (86,87). New studies explored a functional and dynamic core (83,88) that was temporally varying but also predictable. Depending of the scale of the microbiota and of the information sought, the focus could be placed either on the common points or on the divergence and specificities. In this studies, different analysis were driven to approach the concepts of core microbiota and specific microbiota and apply them to the host sea-cucumber *H. forskali*. The anatomical-associated core

microbiota was determined using a prevalence threshold of 0.5 and exhibited 47 core OTUs pour the coelomic microbiota, 37 for the skin microbiota, and 109 for the gastro-intestinal microbiota. In these core OTUs, 29 were shared between the 3 compartments and should probably play a functional role on the host or of on its habitat (82,83). These core OTUs were also characterized by high abundance. On the contrary, some taxa were differently distributed according to the compartment in terms of abundance, or absent. These OTUs could reflect a specific role in the present compartment. Another point of view was to identify specific and unshared taxa for each compartment, and to focus on differences between the 3 microbiota. Presence of OTUs in one of the three compartments should referred to the specificities of this compartment. Finally families correlated with a positive and significant differential abundance have been identified by biomarker analysis with the package *LEfse*. By crossing all data on core microbiota, specific microbiota and abundant-correlating microbiota, some taxa were always found whatever the indicator chosen and indicated a high relationship with the concerned compartment. These specific taxa were probably linked to anatomical functions, such as digestibility with the family Rhodobacteraceae often found in the gastro-intestinal tract (25,89,90), or immunity in the coelomic fluid with the presence of *Pseudoalteromonas* known to produce antibacterial peptides and associated with marine invertebrates (91).

The remaining questions were on the multiscale modulations of the microbiota, and on the mutual relationships between the host and this microbiota, and how do they operated these relations.

## Conclusion

In this present study, the microbiota of the host sea cucumber *H. forskali* was analysed and compared at different scales: 3 anatomical compartments, 2 sites and 3 periods in the year. Results validated the existence of distinct microbiota associated with an anatomical compartment, the skin microbiota, the coelomic microbiota and the gastro-intestinal microbiota, and then, exhibited spatiotemporal variations of them. Further investigation showed specific and core taxa associated to anatomical compartment, these results offered new perspectives of studies to understand the function of these anatomical microbiota linked to the host.

## Acknowledgements and funding information

This work was funded by European maritime and fisheries Fund in France (HOLOFARM project, FEAMP - Innovative Aquaculture). Hélène Laguerre was supported by a “Quimper-Bretagne Occidentale” grant for PhD thesis. Thanks you to Christian Miquel and Stéphane Lobreaux (Alpine Ecology Laboratory - LECA, Grenoble Alpes University) for their advice on bioinformatics.

## REFERENCES

1. Anderson S, Flemming J, Watson R, Lotze H. 2011. Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish Fish* 12:317–339.
2. Choo PS. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia. p. 81-118. In: V. Toral-Granda, A. Lovatelli and M. Vasconcellos (eds). *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 516. Rome, FAO.
3. Purcell SW, Hair CA, Mills DJ. 2012. Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: Progress, problems and opportunities. *Aquaculture* 368–369:68–81.
4. Chen J. 2003. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Beche--Mer Inf Bull* 18:6.
5. Janakiram N, Mohammed A, Rao C. 2015. Sea Cucumbers Metabolites as Potent Anti-Cancer Agents. *Mar Drugs* 13:2909–2923.
6. Domínguez-Godino JA, Slater MJ, Hannon C, González-Wangüermert M. 2015. A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: Breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. *Aquaculture* 438:122–128.
7. Marquet N, Conand C, Power DM, Canário AVM, González-Wangüermert M. 2017. Sea cucumbers, *Holothuria arguinensis* and *H. mammata*, from the southern Iberian Peninsula: Variation in reproductive activity between populations from different habitats. *Fish Res* 191:120–130.
8. Laguerre H, Raymond G, Plan P, Améziane N, Bailly X, Le Chevalier P. 2020. First description of embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea), a new species for aquaculture in the north-eastern Atlantic. *Aquaculture* 521:734961.
9. Santos R, Dias S, Pinteus S, Silva J, Alves C, Tecelão C, Pedrosa R, Pombo A. 2015. Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. *Aquac Res* 47:2307–2323.
10. Rakaj A, Fianchini A, Boncagni P, Lovatelli A, Scardi M, Cataudella S. 2018. Spawning and rearing of *Holothuria tubulosa* : A new candidate for aquaculture in the Mediterranean region. *Aquac Res* 49:557–568.
11. Margulis L. 1993. Origins of species: acquired genomes and individuality. *Biosystems* 31:121–125.
12. Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, Brucker RM, Baines JF, Bosch TCG, Cryan JF, Gilbert SF, Goodnight CJ, Lloyd EA, Sapp J, Vandenkoornhuyse P, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E, Bordenstein SR. 2016. Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* 1:e00028-16, /msys/1/2/e00028-16.atom.
13. Bordenstein SR, Theis KR. 2015. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biol* 13:e1002226.
14. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* 5:355–362.

15. Butt RL, Volkoff H. 2019. Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Front Endocrinol* 10:9.
16. Limborg MT, Alberdi A, Kodama M, Roggenbuck M, Kristiansen K, Gilbert MTP. 2018. Applied Hologenomics: Feasibility and Potential in Aquaculture. *Trends Biotechnol* 36:252–264.
17. Chi C, Liu J-Y, Fei S-Z, Zhang C, Chang Y-Q, Liu X-L, Wang G-X. 2014. Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of *A. japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 38:367–373.
18. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc Natl Acad Sci* 103:12115–12120.
19. Kumar A, Babu G, Lakra W. 2015. DNA Metabarcoding: A New Approach for Rapid Biodiversity Assessment. *J Cell Sci Mol Biol* 2.
20. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* 449:804–810.
21. Rossbach S, Cardenas A, Perna G, Duarte CM, Voolstra CR. 2019. Tissue-Specific Microbiomes of the Red Sea Giant Clam *Tridacna maxima* Highlight Differential Abundance of *Endozoicomonadaceae*. *Front Microbiol* 10.
22. Dubé CE, Ky C-L, Planes S. 2019. Microbiome of the Black-Lipped Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*, a Multi-Tissue Description With Functional Profiling. *Front Microbiol* 10.
23. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. 2016. The healthy human microbiome. *Genome Med* 8:51.
24. Meisterhans G, Raymond N, Girault E, Lambert C, Bourrasseau L, de Montaudouin X, Garabetian F, Jude-Lemeilleur F. 2016. Structure of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) Microbiota at the Organ Scale in Contrasting Sets of Individuals. *Microb Ecol* 71:194–206.
25. Bogatyrenko EA, Buzoleva LS. 2016. Characterization of the gut bacterial community of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Microbiology* 85:116–123.
26. Gao F, Li F, Tan J, Yan J, Sun H. 2014. Bacterial Community Composition in the Gut Content and Ambient Sediment of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Revealed by 16S rRNA Gene Pyrosequencing. *PLoS ONE* 9:e100092.
27. Sha Y, Liu M, Wang B, Jiang K, Sun G, Wang L. 2016. Gut bacterial diversity of farmed sea cucumbers *Apostichopus japonicus* with different growth rates. *Microbiology* 85:109–115.
28. Yokoyama H. 2013. Growth and food source of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* cultured below fish cages — Potential for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 372–375:28–38.
29. Enomoto M, Nakagawa S, Sawabe T. 2012. Microbial Communities Associated with Holothurians: Presence of Unique Bacteria in the Coelomic Fluid. *Microbes Environ* 27:300–305.
30. Zhang Z, Xing R, Lv Z, Shao Y, Zhang W, Zhao X, Li C. 2018. Analysis of gut microbiota revealed *Lactococcus garviaeae* could be an indicative of skin ulceration syndrome in farmed sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 80:148–154.

31. Zhao Y, Yuan L, Wan J, Sun Z, Wang Y, Sun H. 2016. Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 49:237–242.
32. Tuwo A, Conand C. 1992. Reproductive biology of the holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). *J Mar Biol Assoc U K* 72:745–758.
33. León-Palmero E, Joglar V, Álvarez PA, Martín-Platero A, Llamas I, Reche I. 2018. Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PLOS ONE* 13:e0196178.
34. Offret C, Jégou C, Mounier J, Fleury Y, Chevalier PL. 2019. New insights into the haemo- and coelo-microbiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. *J Appl Microbiol* 126:1023–1031.
35. Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press.
36. Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2015. OBITools: a Unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour* 10.1111/1755-0998.12428.
37. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294.
38. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2:e593.
39. Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461.
40. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584.
41. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421.
42. R Core Team. 2021. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
43. McMurdie PJ, Holmes S. 2013. *phyloseq*: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8:e61217.
44. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2019. *vegan*: Community Ecology Package.
45. Anderson MJ, Ellingsen KE, McArdle BH. 2006. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecol Lett* 9:683–693.
46. Legendre P, Gallagher ED. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129:271–280.



47. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 10:57–59.
48. Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed. Springer International Publishing.
49. Anderson MJ. 2017. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA), p. 1–15. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. American Cancer Society.
50. Shetty SA, Hugenholtz F, Lahti L, Smidt H, de Vos WM. 2017. Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. *FEMS Microbiol Rev* 41:182–199.
51. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12:R60.
52. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. 2020. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc* 15:799–821.
53. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. 2017. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res* 45:W180–W188.
54. Jackson EW, Pepe-Ranney C, Debenport SJ, Buckley DH, Hewson I. 2018. The Microbial Landscape of Sea Stars and the Anatomical and Interspecies Variability of Their Microbiome. *Front Microbiol* 9:1829.
55. Offret C, Paulino S, Gauthier O, Château K, Bidault A, Corporeau C, Miner P, Petton B, Pernet F, Fabioux C, Paillard C, Blay GL. 2020. The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 96:fiaa078.
56. Lokmer A, Goedknecht MA, Thielges DW, Fiorentino D, Kuenzel S, Baines JF, Wegner KM. 2016. Spatial and Temporal Dynamics of Pacific Oyster Hemolymph Microbiota across Multiple Scales. *Front Microbiol* 7.
57. Yung C-M, Ward CS, Davis KM, Johnson ZI, Hunt DE. 2016. Insensitivity of Diverse and Temporally Variable Particle-Associated Microbial Communities to Bulk Seawater Environmental Parameters. *Appl Environ Microbiol* 82:3431.
58. Chiarello M, Auguet J-C, Bettarel Y, Bouvier C, Claverie T, Graham NAJ, Rieuvilleneuve F, Sucré E, Bouvier T, Villéger S. 2018. Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet. *Microbiome* 6:147.
59. Gobet A, Mest L, Perennou M, Dittami SM, Caralp C, Coulombet C, Huchette S, Roussel S, Michel G, Leblanc C. 2018. Seasonal and algal diet-driven patterns of the digestive microbiota of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a generalist marine herbivore. *Microbiome* 6:60.
60. Polinski JM, Bucci JP, Gasser M, Bodnar AG. 2019. Metabarcoding assessment of prokaryotic and eukaryotic taxa in sediments from Stellwagen Bank National Marine Sanctuary. *Sci Rep* 9:14820.

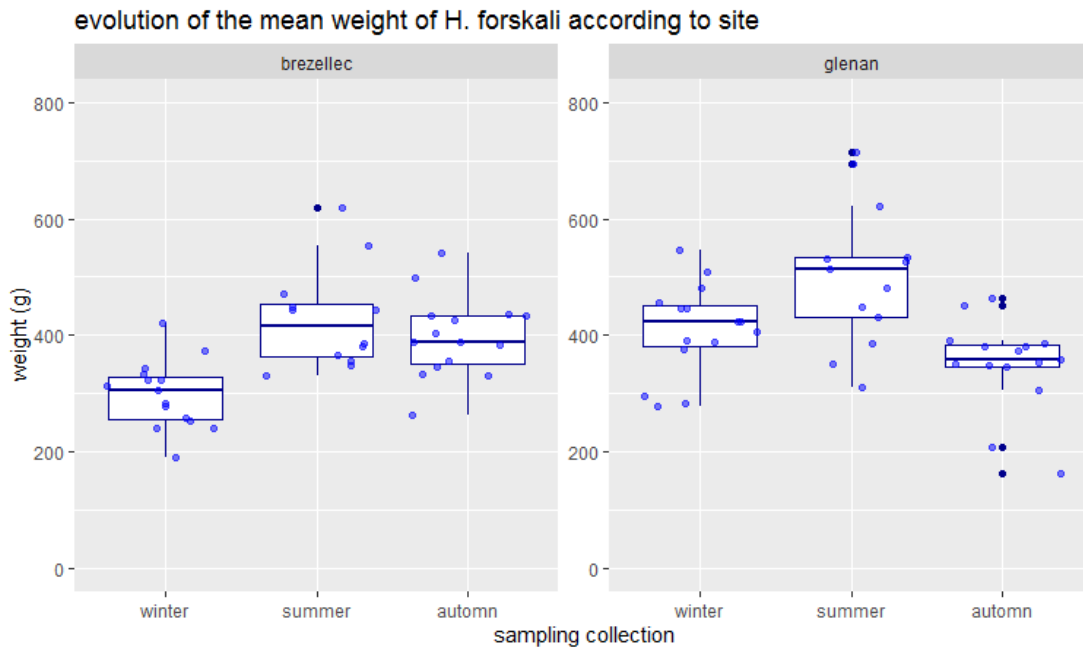
61. Harrison JP, Chronopoulou P-M, Salonen IS, Jilbert T, Koho KA. 2021. 16S and 18S rRNA Gene Metabarcoding Provide Congruent Information on the Responses of Sediment Communities to Eutrophication. *Front Mar Sci* 8:862.
62. Kristensen E. 2005. Interactions Between Macro- and Microorganisms in Marine Sediments. American Geophysical Union.
63. Uthicke S. 1999. Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria (Halodeima) atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Bull Mar Sci* 64:14.
64. Plotieau T, Lavitra T, Gillan D, Eeckhaut I. 2013. Bacterial diversity of the sediments transiting through the gut of *Holothuria scabra* (Holothuroidea; Echinodermata). *Mar Biol* 160.
65. Vavourakis CD, Mehrshad M, Balkema C, van Hall R, Andrei A-Ş, Ghai R, Sorokin DY, Muyzer G. 2019. Metagenomes and metatranscriptomes shed new light on the microbial-mediated sulfur cycle in a Siberian soda lake. *BMC Biol* 17:69.
66. Han J-R, Ye M-Q, Wang C, Du Z-J. 2019. *Halioglobus sediminis* sp. nov., isolated from coastal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 69:1601–1605.
67. David F, Hubas C, Laguerre H, Badou A, Herault G, Bordelet T, Ameziane N. 2020. Food sources, digestive efficiency and resource allocation in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea): Insights from pigments and fatty acids. *Aquac Nutr* 26:1568–1583.
68. MacDonald CLE, Stead SM, Slater MJ. 2013. Consumption and remediation of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) waste by the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Aquac Int* 21:1279–1290.
69. Mattila JM, Zimmer M, Vesakoski O, Jormalainen V. 2014. Habitat-specific gut microbiota of the marine herbivore *Idotea balthica* (Isopoda). *J Exp Mar Biol Ecol* 455:22–28.
70. Rebollar EA, Gutiérrez-Preciado A, Noecker C, Eng A, Hughey MC, Medina D, Walke JB, Borenstein E, Jensen RV, Belden LK, Harris RN. 2018. The Skin Microbiome of the Neotropical Frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring Potential Bacterial-Host-Pathogen Interactions From Metagenomic Data. *Front Microbiol* 9:466.
71. Deng H, He C, Zhou Z, Liu C, Tan K, Wang N, Jiang B, Gao X, Liu W. 2009. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture* 287:18–27.
72. Smith LC, Ghosh J, Buckley KM, Clow LA, Dheilly NM, Haug T, Henson JH, Li C, Lun CM, Majeske AJ, Matranga V, Nair SV, Rast JP, Raftos DA, Roth M, Sacchi S, Schrankel CS, Stensvåg K. 2010. Echinoderm Immunity, p. 260–301. In Söderhäll, K (ed.), *Invertebrate Immunity*. Springer US, Boston, MA.
73. Chen M, Wang F, Xing K, Zhu A, Zhang S. 2015. Immunology and Diseases, p. 257–287. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier.
74. Smith LC, Arizza V, Barela Hudgell MA, Barone G, Bodnar AG, Buckley KM, Cunsolo V, Dheilly NM, Franchi N, Fugmann SD, Furukawa R, Garcia-Ararras J, Henson JH, Hibino T, Irons ZH, Li C, Lun CM, Majeske AJ, Oren M, Pagliara P, Pinsino A, Raftos DA, Rast JP, Samasa B, Schillaci D, Schrankel CS, Stabili L, Stensvåg K, Sutton E. 2018. Echinodermata: The Complex Immune

- System in Echinoderms, p. 409–501. In Cooper, EL (ed.), *Advances in Comparative Immunology*. Springer International Publishing, Cham.
75. Yu S, Ye X, Chen L, Xie X, Zhou Q, Lian X-Y, Zhang Z. 2015. Cytotoxic and anti-colorectal tumor effects of sulfated saponins from sea cucumber *Holothuria moebii*. *Phytomedicine* 22:1112–1119.
  76. Jaeckle William B, Strathmann Richard R. 2013. The anus as a second mouth: anal suspension feeding by an oral deposit-feeding sea cucumber. *Invertebr Biol* 132:62–68.
  77. Huo D, Sun L, Li X, Ru X, Liu S, Zhang L, Xing L, Yang H. 2017. Differential Expression of miRNAs in the Respiratory Tree of the Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Under Hypoxia Stress. *G3 Bethesda Md* 7:3681–3692.
  78. Ru X, Zhang L, Liu S, Yang H. 2020. Plasticity of Respiratory Function Accommodates High Oxygen Demand in Breeding Sea Cucumbers. *Front Physiol* 11:283.
  79. Nakagawa S, Saito H, Tame A, Hirai M, Yamaguchi H, Sunata T, Aida M, Muto H, Sawayama S, Takaki Y. 2017. Microbiota in the coelomic fluid of two common coastal starfish species and characterization of an abundant *Helicobacter*-related taxon. *Sci Rep* 7:8764.
  80. Astudillo-García C, Bell JJ, Webster NS, Glasl B, Jompa J, Montoya JM, Taylor MW. 2017. Evaluating the core microbiota in complex communities: A systematic investigation: Core microbiota in complex communities. *Environ Microbiol* 19:1450–1462.
  81. Ainsworth TD, Krause L, Bridge T, Torda G, Raina J-B, Zakrzewski M, Gates RD, Padilla-Gamiño JL, Spalding HL, Smith C, Woolsey ES, Bourne DG, Bongaerts P, Hoegh-Guldberg O, Leggat W. 2015. The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *ISME J* 9:2261–2274.
  82. Risely A. 2020. Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *J Anim Ecol* 89:1549–1558.
  83. Lemanceau P, Blouin M, Muller D, Moënné-Loccoz Y. 2017. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci* 22:583–595.
  84. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH. 2012. Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *BMC Microbiol* 12:20.
  85. Aguirre de Cárcer D. 2018. The human gut pan-microbiome presents a compositional core formed by discrete phylogenetic units. 1. *Sci Rep* 8:14069.
  86. Shade A, Handelsman J. 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome: The hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* 14:4–12.
  87. Piazzon C, Naya-Català F, Simó Mirabet P, Picard Sanchez A, Roig F, Caldach-Giner J, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. 2019. Sex, Age, and Bacteria: How the Intestinal Microbiota Is Modulated in a Protandrous Hermaphrodite Fish. *Front Microbiol* 10:2512.
  88. Björk JR, O’Hara RB, Ribes M, Coma R, Montoya JM. 2017. The dynamic core microbiome: Structure, dynamics and stability. Preprint, *Ecology*.

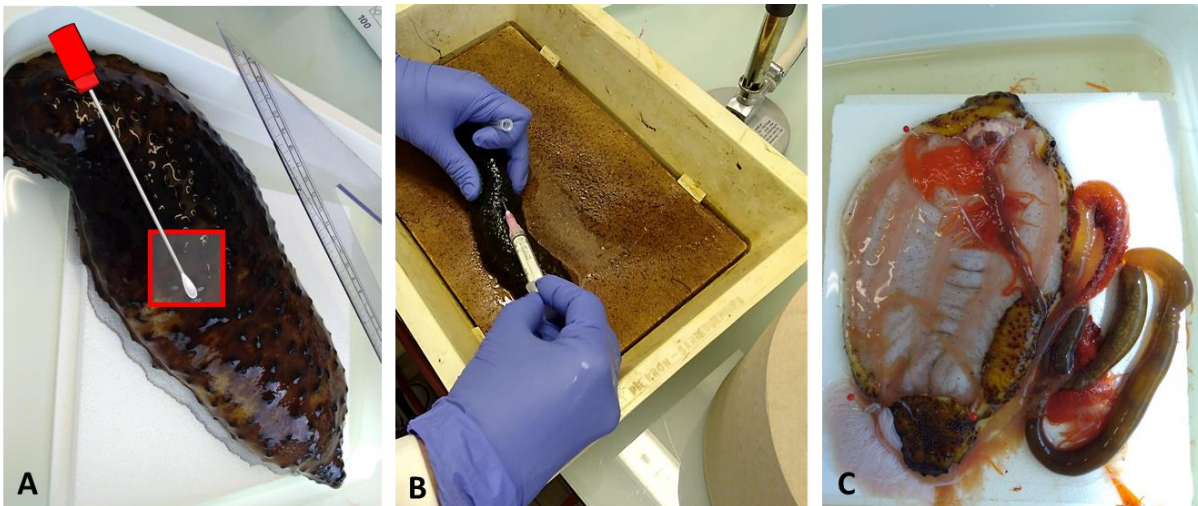
89. Wang Y, Wang K, Huang L, Dong P, Wang S, Chen H, Lu Z, Hou D, Zhang D. 2020. Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome* 8:106.
90. Steiner K, Heasman K, Laroche O, Pochon X, Preece M, Bowman JP, Walker SP, Symonds JE. 2021. The microbiome of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in a recirculation aquaculture system. *Aquaculture* 534:736227.
91. Offret C, Desriac F, Le Chevalier P, Mounier J, Jégou C, Fleury Y. 2016. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Mar Drugs* 14.

## Supplementary materials

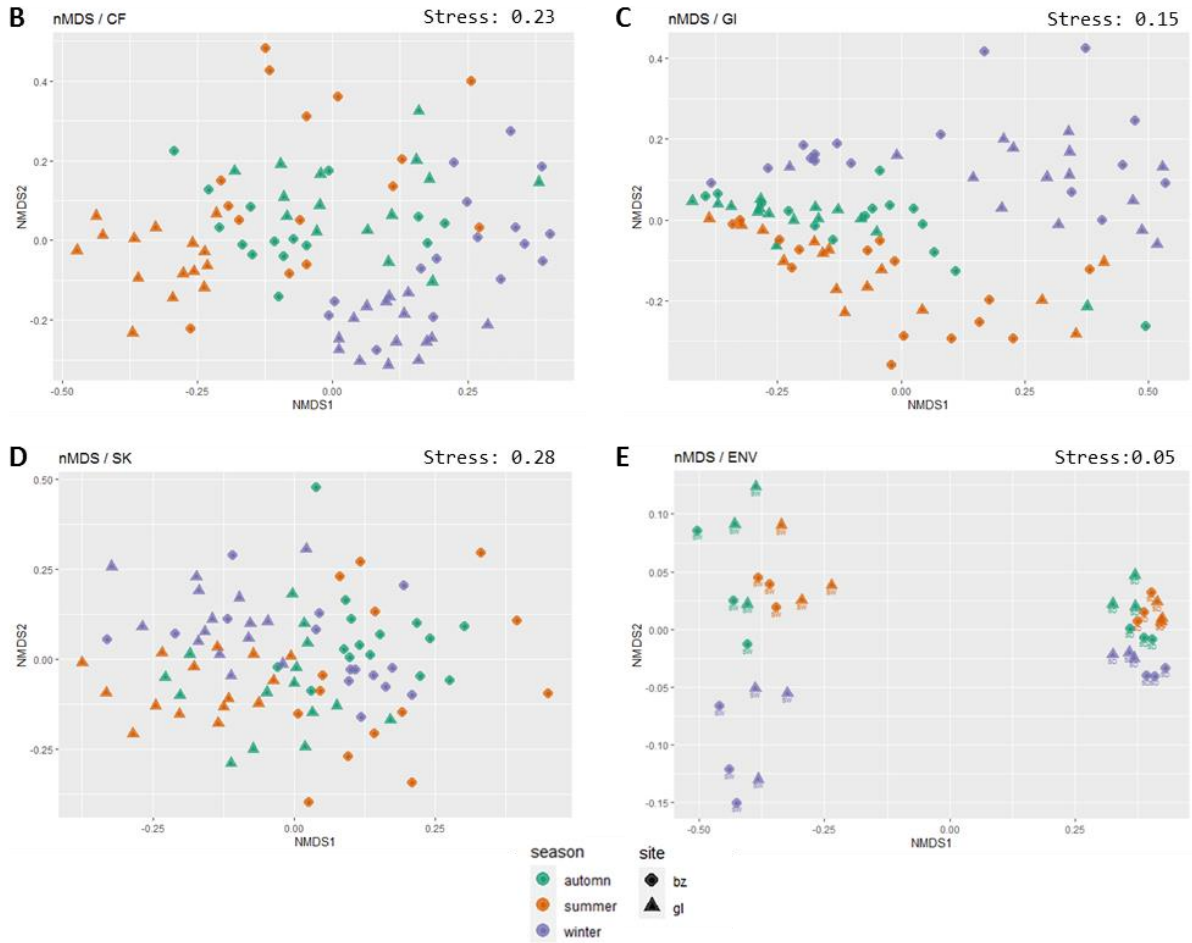
Suppl. fig. 1: Evolution of the mean weight of *H. forskali*, according to time and site.



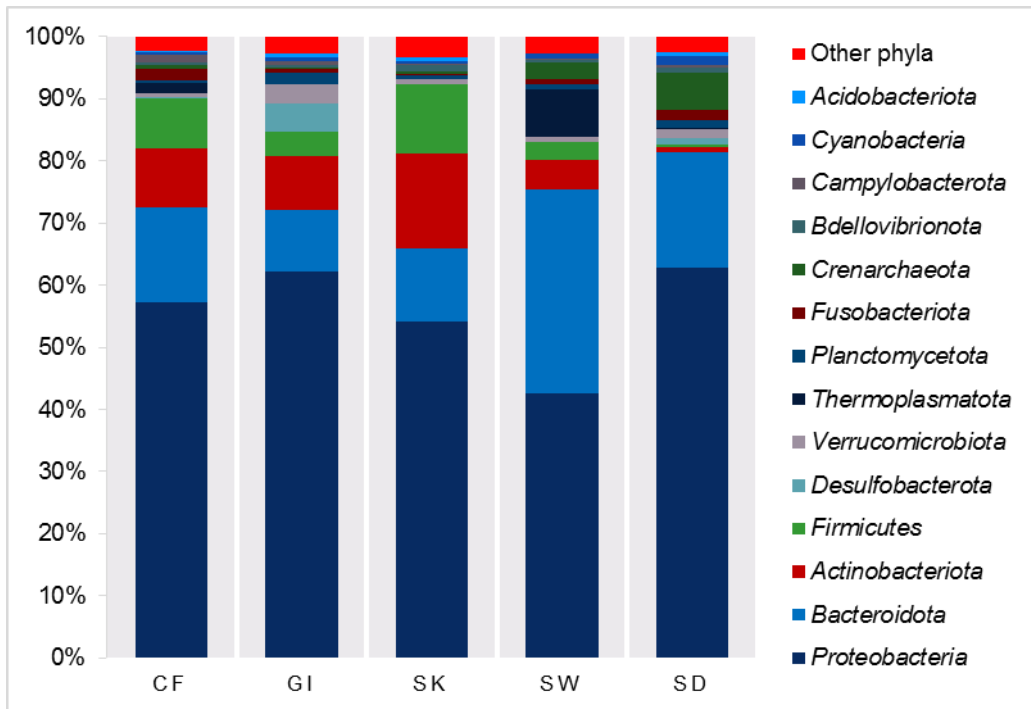
Suppl. fig. 2: Dissection of the sea-cucumber. A: Skin microbiota sampling with a sterile swab in the dorsal face; B: coelomic fluid sampling with a 25G needle fixed on a 2.5 mL syringe; C: global view of the dissection and the gastro-intestinal tract.



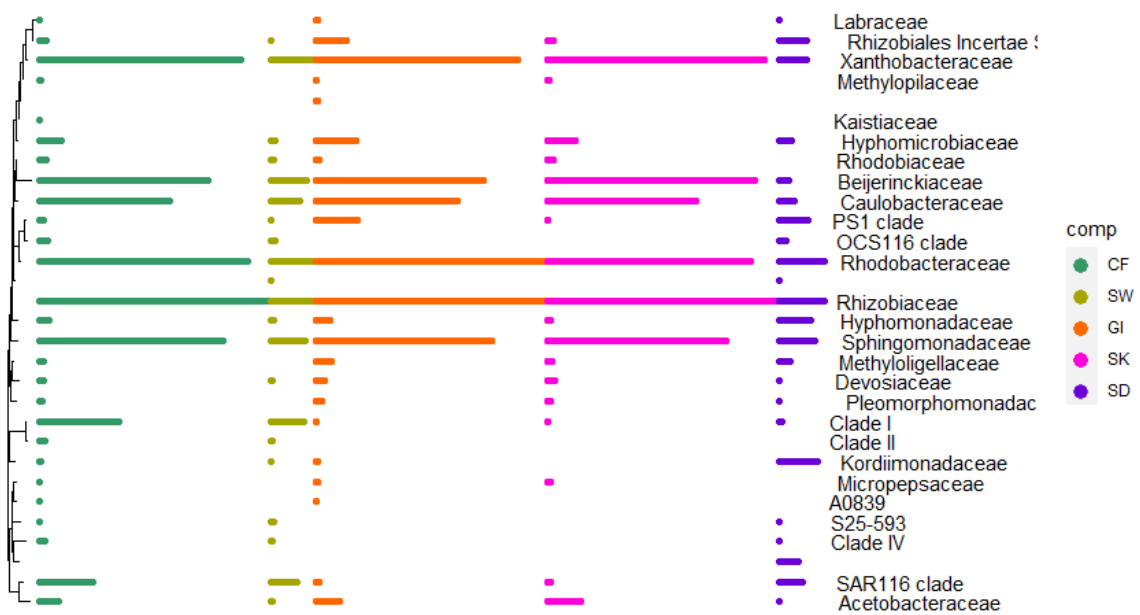
Suppl. fig. 3: nMDS for each anatomical compartment and for environment (Bray-Curtiss distance). B: coelomic microbiota (CF); C: gastro-intestinal content (GI); D: skin microbiota (SK); E: environmental samples. Code: SW = seawater, SD = sediment, bz = site of Brezellec, gl = Glenan Archipelago



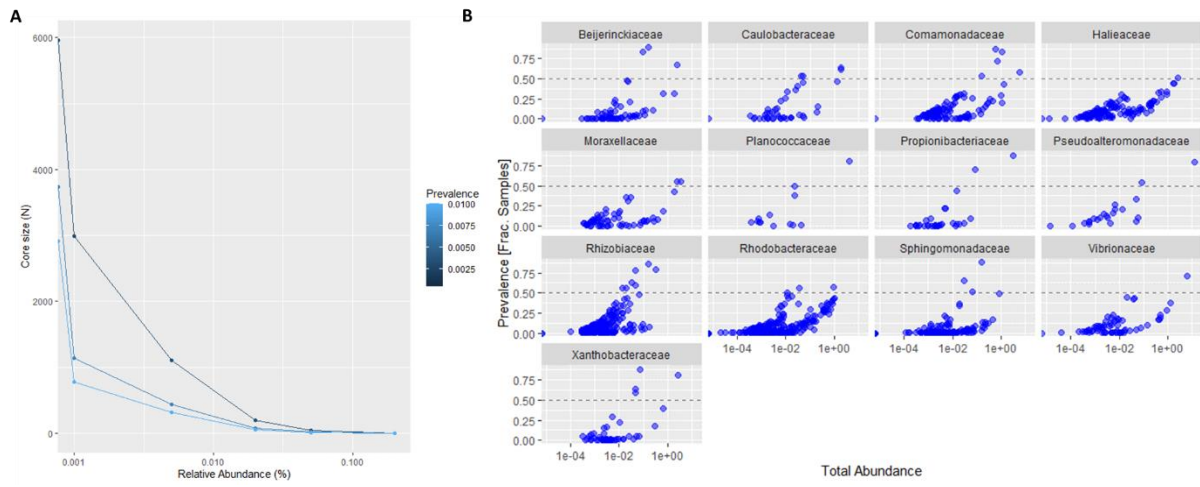
Suppl. fig. 4: Relative abundance of the 15 principal phyla present in each type of sample. Code: CF = Coelomic fluid, GI = Gastro-intestinal tract, SK = Skin, SW = Seawater, SD = Sediment.



Suppl. fig. 5: phylogenetic tree with the most abundant families, according to sample type. Code: CF = Coelomic fluid, GI = Gastro-intestinal tract, SK = Skin, SW = Seawater, SD = Sediment.



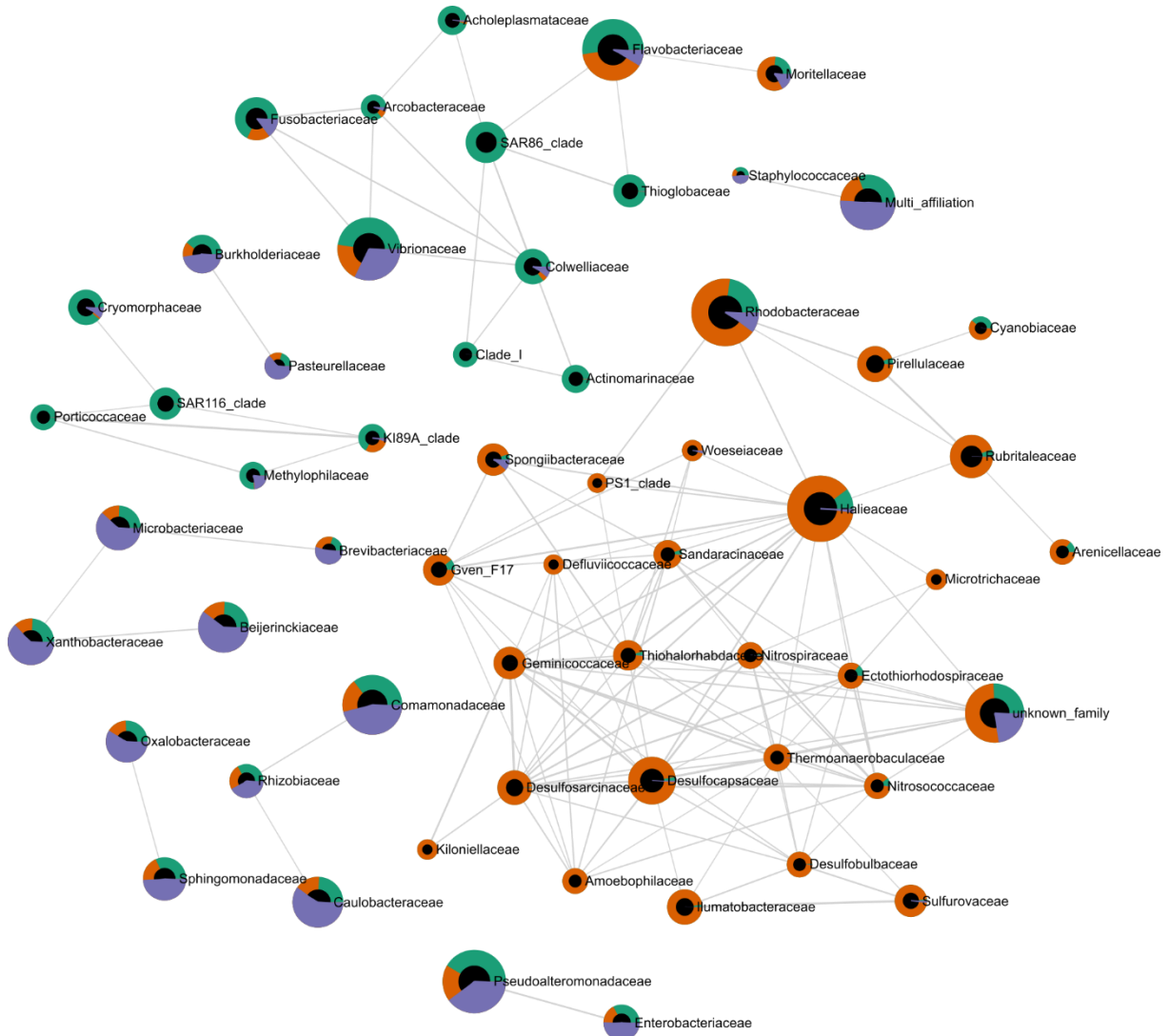
Suppl. fig. 6: detection of the core OTUs in *H. forskali* microbiota. A: core size and abundance. B: Core families and associated OTUs with a prevalence score.





Suppl. fig. 7: Correlation analysis between abundant taxa in the 3 anatomical microbiota, exhibited anatomical specificities (algorithm: Pearson's correlation, permutations = 100, *p-value*= 0.05, correlation threshold 0.3).

Color code: **green** = coelomic microbiota, **orange** = gastro-intestinal microbiota, **blue** = skin



Supp. Tab. 1: Result of preprocess with Frogs on sequencing data

Anatomical compartment	Preprocess	Total paire-ends assembled	Library size		After cleaning data	Affiliated	
			Mean	SD		sequences	OTUs
Coelomic fluid		19 253 237	211 574	78 364		3 004 996	3 576
Gastro-intest. tract		19 018 249	208 992	83 463		4 261 620	5 106
Skin		25 388 450	278 994	91 781		2 964 893	3 159
Seawater		4 193 777	232 988	66 101		783 567	1 658
Sediment		809 094	44 950	35 447		313 706	3 266
<b>Total</b>		<b>68 662 807</b>	<b>222 210</b>	<b>97 379</b>		<b>11 328 782</b>	<b>8 610</b>

Add. tab. 2: Alpha-diversity values. Code: CF = Coelomic fluid, GI = Gastro-intestinal tract, SK = Skin, SW = Seawater, SD = Sediment.

Type of sample	Observed richness		Chao1		Shannon		Inverse Simpson	
	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd
CF (n=91)	216.27	69.63	314.57	88.56	3.63	0.59	25.79	14.36
GI (n=91)	394.87	199.62	523.66	221.83	4.14	0.58	34.13	16.89
SK (n=89)	170.02	65.00	268.70	96.94	3.29	0.46	17.43	9.38
SW (n=18)	258.00	57.90	334.82	75.71	4.07	0.27	35.65	12.27
SD (n=18)	1072.39	297.50	1427.75	298.92	4.79	0.78	29.96	28.37

### 3.3 Conclusion du chapitre et perspectives

L'analyse des microbiotes de 3 compartiments anatomiques de *H. forskali*, l'épiderme, le contenu gastro-intestinal et le liquide coelomique, sur 2 sites pendant 2 années successives répond à la question de la spécificité du microbiote à l'échelle intra-anatomique.

Des microbiotes spécifiques et distincts sont associés à chacun des 3 compartiments anatomiques étudiés, argumentant en faveur d'une spécialisation anatomique.

Des variations spatio-temporelles des microbiotes ont été observées, cependant, une part des microbiotes s'est avérée prévalente, démontrant l'existence de core microbiotes anatomiques. La présence de ces core microbiotes et de taxons spécifiques pose la question du rôle des microbiotes chez l'holobionte, et de leur acquisition durant la vie de l'hôte.



## **Chapitre 3**

Évolution du microbiote de  
*H. forskali* au cours de  
son cycle de vie



## 4. Évolution du microbiote de *H. forskali* au cours de son cycle de vie

### 4.1 Préambule

Ce chapitre permet d'aborder le microbiote de *H. forskali* au cours des principaux stades de vie, récemment décrits (Laguerre et al., 2020). Comme l'ensemble des échinodermes, cette espèce possède des stades larvaires planctoniques caractéristiques (fig. 21).

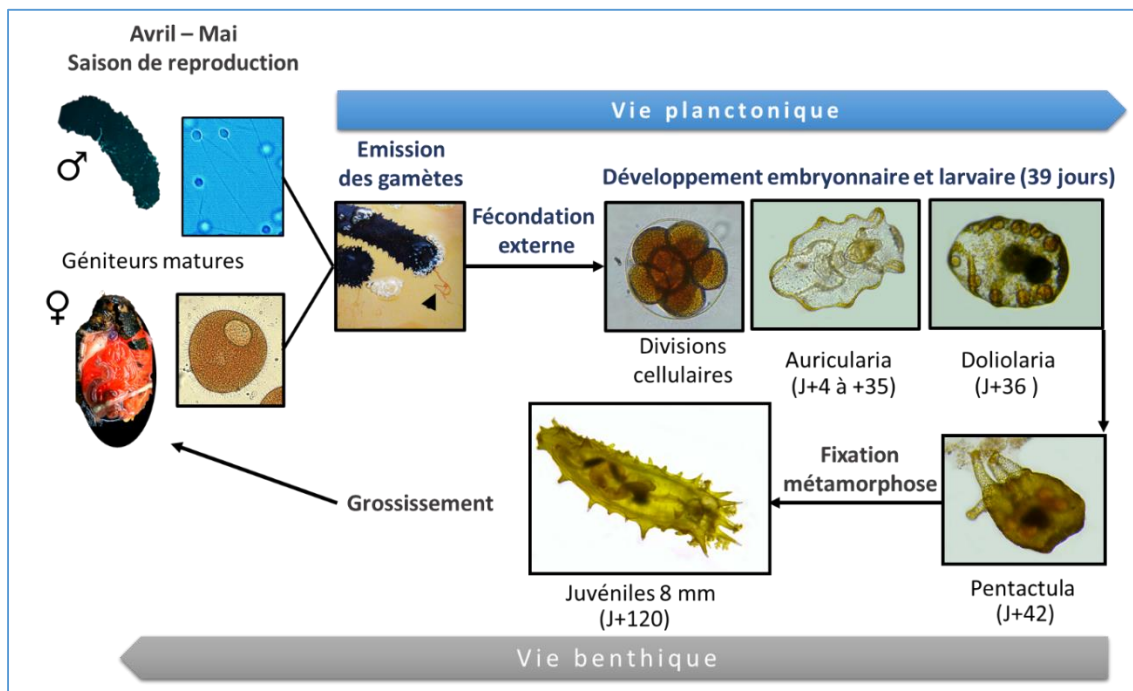


Fig. 21 : Cycle de vie de *Holothuria forskali* (modifié d'après : Laguerre et al., 2020).

Afin de comprendre comment évolue le microbiote depuis les premiers stades de vie jusqu'aux stades adultes, un cheptel a été suivi, depuis la collecte des géniteurs dans le milieu naturel, jusqu'à leur descendance. Ainsi, le microbiote des géniteurs issus du milieu naturel, microbiote du même lot de géniteurs après stabulation et reproduction en captivité, le microbiote des embryons, des larves et des juvéniles ont été étudiés. Les prélèvements d'embryons, larves et juvéniles ont été réalisés chez Agrocampus Ouest, porteur du projet HoloFarm.

Les résultats de ces travaux sont présentés sous la forme d'un manuscrit de publication à soumettre.

## 4.2 Publication 3 (Draft)

# Microbiota in aquaculture: diversity, transmission and plasticity of the microbiota among the life cycle of the sea cucumber *H. forskali* (Echinodermata, Holothuroidea)

Laguerre Hélène, N oel Cyril, Jegou Camille, Fleury Yannick, Le Chevalier Patrick

1. University of Brest, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, F-29334 Quimper, France
2. IFREMER-IRSI-Service de Bioinformatique (SeBiMER), 1625 Route de Sainte-Anne, 29280 Plouzané

### Summary

The microbiota played a key-role in host health, from the embryos to the larvae. Many studies have been carried out to explore the microbiota on larvae, on adult stages, but no known studies among a life cycle. Here we presented the first study on microbiota of a new targeted species, the sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea), throughout its life cycle, from the same wild broodstock herd. The microbiota of wild broodstock, housed broodstock, embryos, Auricularia larvae and juveniles were analysed by 16S Metabarcoding, as well as bacterial communities of their environment. The results exhibited a high diversity in all the microbiota, whatever the stage concerned, with the highest richness and diversity values for the coelomic microbiota of the broodstock, and the whole-body microbiota of the larvae. Moreover, the taxa composition and abundances in the microbiota of the different stages highlighted distinct bacterial communities between the microbiota of the earliest stages (embryos, larvae and juveniles), with higher abundances in Spirochaetales and Enterobacterales in embryos and in Burkholderiales in juveniles. Differences between the coelomic microbiota of wild and housed broodstock have also been demonstrated. This result suggested an impact of the captivity and a plasticity of the bacterial assemblages in the coelomic fluid. The bacterial composition also demonstrated that the earliest stages of *H. forskali* were linked to their environment with a high proportion of shared taxa, but contained nonetheless a part of unshared taxa. The presence of these unshared taxa and the differential abundances analyses hypothesized a functional and specific role of this microbiota in each life stage. This studies confirmed the existence of a microbiota throughout the life history of the echinoderms, and both demonstrated the transfer between the different microbiota and its environment, but also the presence of specific taxa associated to a life stage.

**Key-words:** aquaculture, juveniles, larvae, life cycle, captivity, Sea-cucumber, *Holothuria forskali*, microbiota, V4-16S metabarcoding,

## INTRODUCTION

The studies on the microbiota of domesticated species had exploded with the development of the NGS technologies (1–3), first on most commercially important species in agriculture (4) and in aquaculture (5) with penaeid cultivation (6), fish farming (7,8), shellfish farming (9–11), and in echinoderms production (12,13). These studies on housed-animals were focused on the gut microbiota, linked with growth performance and probiotics use (5,8,14–17). In aquaculture, the knowledge on microbiota composition could inform on feeding regime, on host health, or on a production area (7,8,18) and gave precious information to improve zootechnical process. However, variation of the microbiota among the different stage of the life cycle was little studied. The microbiota of larvae and its relationships with the environment were explored in insects (19,20), in marine invertebrates (9,21–23), in fish farming (24,25). These works demonstrated the links between the bacterial communities of the ambient environment - such as water and food - with the microbiota of larvae, revealing a horizontal transmission, and the shift on bacterial assemblages from non-feeding eggs and larvae to feeding and opened-mouth larvae. However, there was no studies on the microbiota of cultivated animals, among their life cycle, from the broodstock microbiota, to the larval and juvenile microbiota, as well as, studies on the impact of the captivity on wild animals. The Black Sea-Cucumber *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823) was targeted as a new interest species for the Asian market (26–28), and first domestication assays have been successful, in hatchery (26), broodstock ranching (29) and in integrated multi-trophic aquaculture (30). Analysis of the microbiota of wild broodstock of *H. forskali* has been carried out (31), and demonstrated a highly variable and specific composition, and a presence of culturable bacteria exhibiting an antibacterial activities (31,32). This work was built around the domestication assays conducted on *H. forskali* in Brittany (France), from a herd of wild broodstock, acclimated in captivity for reproduction. The wild broodstock, the acclimated broodstock, and its offspring - the embryos, larvae and juveniles – were sampling for microbiota analysis by Illumina MiSeq 16S rDNA sequencing. Thus, this study aimed to compare the microbiota composition and diversity among different stages of the life cycle of the sea-cucumber *H. forskali*, and between natural broodstock and housed-animals.



## MATERIAL AND METHODS

### Sampling collection and preparation

The study on microbiota was built around a herd of sea-cucumber broodstock, followed throughout its life cycle: from the broodstock collection in natural environment to their offspring produced in captivity (tab1).

Tab. 1: description of the samples collection of *H. forskali* specimens.

Sample type	Sample collection (n=)	Description
Broodstock_wild	15	microbiota from the liquid coelomic of wild broodstock coming from the Glenan Archipelago (April, 2019)
Broodstock_stab	30	microbiota from the liquid coelomic of 2 month and 7-month housed broodstock (same origin and collection as wild broodstock)
Embryos	3	whole-body microbiota of Morula and Gastrula embryos (24 hours post-fertilization)
Food	3	samples of foods for juveniles and for broodstock breeding
Juveniles	15	whole-body microbiota of 7-month juveniles
Larvae	3	whole-body microbiota of Auricularia Larvae (Day +7, 12 and 24 post fertilization)
Seawater	13	seawater from broodstock, juveniles and larval tanks

First, wild broodstock (n=80) of *H. forskali* were collected by scuba-diving in the Glenan Archipelago in April 2019 (Brittany, France, WGS84: 47°43'57.76''N and 04°00'50.99''W) (fig. 1A). A part of the broodstock was transferred to the experimental hatchery of Agrocampus-Ouest (Fouesnant, France) for the breeding experiment, and 15 specimen were directly sampled, by introducing a 25G needle fixed on a 2.5mL syringe through the body wall, in the ventral side into the coelomic cavity, to collect the coelomic microbiota. After 2 months and 7 months in captivity, the coelomic microbiota of broodstock were sampled again (n=9 and n=15). This herd reproduced in captivity, in April 2019, and 3 replicates of 24-day embryos (Morula 40% and Blastula 60%, fig. 1B) were collected in a 80µm sieve, twice rinsed with artificial sterilized seawater and transferred in a sterile micro centrifuged tubes. Then, 3 replicates of Auricularia larvae were also sampled (fig. 1C), aged from 7, 12 and 24 days post fertilization, and processed as embryos. Finally, 7-month juveniles (n=15) were removed from the tanks, and collected (fig. 1D). In parallel of the sampling, seawater and food were collected. Samples of coelomic fluid, embryos, larvae, seawater and food were centrifuges at 13,000 rpm for 10 minutes, and pellets were stored at -20°C until further analysis. Juveniles were directly frozen.

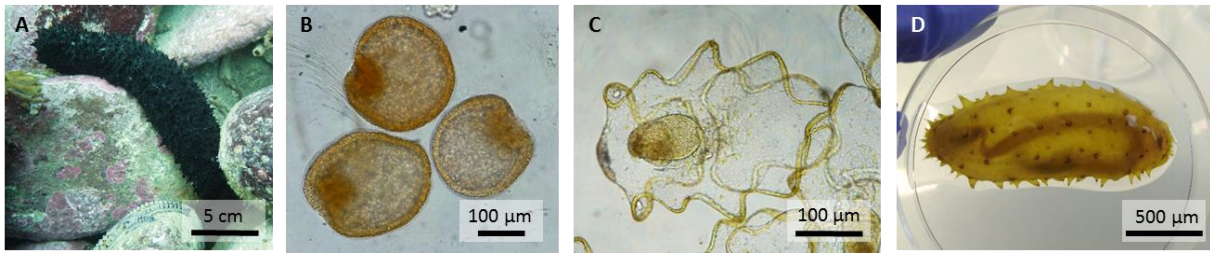


Fig. 1: the different sampled stages of the life cycle of *H. forskali*. A: Specimen in its natural habitat. B: Early gastrula. C: Mid-Auricularia. D: 7-month juvenile.

### DNA extraction and sequencing

Tubes containing juveniles were first put in liquid nitrogen for 30 seconds, and then, juveniles were cut separately in slices with a scalpel blade, before extraction methods (whole-body microbiota). Juveniles samples were incubated in 1,5 mL Inhibitex® buffer (from the Qiagen DNA Stool mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) at 95°C for 5 minutes. Tubes were then centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes and supernatant were used for extraction.

Then, bacterial DNA from all the sample types was extracted with the Qiagen DNA Stool mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions (protocol for pathogen detection, with an initial lysis step at 95°C). DNA products were then amplified at the AnaEE Platform (Grenoble, France), in 4 replicates by sample. Amplification was focused on the hypervariable region V4 of the 16S rDNA gene, using barcoded primers for Bacteria: Bact02F (5'-GCCAGCMGCCGCGGTAA -3') and rBact02R (5'-GGACTACCMGGTATCTAA -3') according to the Metafast protocol (33). Sequencing was finally performed by Fasteris facilities (Geneva, Switzerland), with an Illumina MiSeq 16S rDNA (2x250 pb).

### Pre-processing on microbiota data

Quality control and trimming of the sequencing data were carried out by Fasteris. Sequences were first assigned to samples with the ngsfilter from the Obitools (34). Assigned sequences were then processed using the 5 steps-pipeline of Frogs 3.1.0 (35,36) available in the Genouest Galaxy server: demultiplexing and merging process, the chimera removal with VSearch (37), the sequences clustering with Swarm (aggregation parameter: d=3) (36,38), the elimination of singletons with Frogs filter, and, finally, the taxonomical affiliation of the clusters in OTUs (Operational taxonomic Units) with Blast (39) and the SILVA 138.1 (pintail 100) database. The R-data was exported for statistical analysis.

### Statistical analysis

The R-data file was loaded on R (40) and samples replicates were merged with the package *phyloseq* (41). The Alpha diversity indices were calculated: the Observed richness and the Shannon's diversity indices with the R packages *phyloseq* and *ggplot2* (42). The alpha-diversity values were compared

according to the variables “sample type” with the non-parametric test of Kruskal-Wallis (p-value threshold 0.05). The composition plots were drawn in the web platform Microbiome Analyst (microbiomeanalyst.ca) (43,44). After compositional transformation of the OTUs table, the beta-diversity analysis based on the Jensen - Shannon Divergence metrics and the PCoA was plotted with phyloseq on R. A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA, n= 999 permutations) was done with the function Adonis2 (45,46) on this distance matrix to compare the variability of microbial composition with the R package Vegan (47), and an analysis of the sample dispersion to the group centroids was carried out with the function Betadisper, permutest (Permutation test for homogeneity of multivariate Dispersions, n= 999 permutations) and anova (48,49). After a total sum scaling of the OTUs table, a differential abundance analysis was conducted with DeSeq2 (p-value 0.05) (50) on the platform Microbiome Analyst to identify the related-abundance genus to the different early stages (embryos, larvae and juveniles). The phylogenetic trees of the most abundant families were plotted with the R package Ape4. Then, as the composition plot at the family level was built, as well as a Linear discriminant analysis (LDA) effect size (*LEfSe*) was conducted at the Genus rank on the platform Microbiome Analyst to identify the biomarker taxa between wild and housed broodstock of *H. forskali* (adjusted p-value cutoff: 0.05; log LDA score:2) (51,52). *LEfSe* was a tool comparing the relative abundance profiles, and performing Kruskal-Wallis sum rank test on differential abundances. The temporal core microbiote, associated with a life stage, was determined using a prevalence threshold of 3/3 samples for the embryos and larvae microbiota, and of 10/15 samples for juveniles microbiota, using the R package *microbiome* (53). Finally, the shared OTUs between the different microbiota with the environment or the previous life stages were compared using the OTUs table with Excel.

## RESULTS

The coelomic microbiota of different stages of the life cycle of *H. forskali* has been analysed (n= 60 samples), as well as bacterial communities of its direct environment (n=16).

### Sequencing results

After the trimming and the merging process, 11,631,706 paired-ends were assembled, distributed as follow: 10,247,977 for the microbiota samples of *H. forskali* and 1,383,729 for environmental samples (tab. 2). Finally, 4,049,429 sequences were clustered and affiliated in 8,630 OTUs.

Tab. 2: Results of preprocess on sequencing data

Sample type	n	Preprocess	Cleaning, clustering, affiliating process	
		Paired-ends assembled	Sequences	OTUs
broostock_stab	24	3 924 519	1 576 707	4 352
broostock_wild	15	2 123 588	852 356	1 628
embryos	3	220 162	87 414	749
larvae	3	394 535	149 380	1 159
juvenile	15	3 585 173	903 325	1 637
food	3	118 761	49 233	454
seawater	13	1 264 968	431 014	2 832
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>11 631 706</b>	<b>4 049 429</b>	<b>8 630</b>

### Alpha-diversity analysis

The analysis of alpha-diversity exhibited significant differences according to the sample type, in term of richness (Kruskal-Wallis test, chi-squared = 19.367, df = 5, *p-value* = 0.001642) and diversity (Kruskal-Wallis test on Shannon's diversity indices, chi-squared = 22.738, df = 5, *p-value* = 0.0003788) (fig. 2, tab; 3). The highest richness were observed for the samples of coelomic microbiota of the housed-broodstock, the embryos and the larvae, and the worst for juvenile whole-body microbiota. The diversity was highly variable, between and inside the sample types (suppl. fig. 1). The larvae microbiota showed the highest values of the Shannon's diversity index, with the coelomic microbiota of the broodstock (fig. 2, tab. 3). Thereby, the microbiota of wild broodstock and larvae were constituted by a higher number of different taxa proportionally to the observed richness.

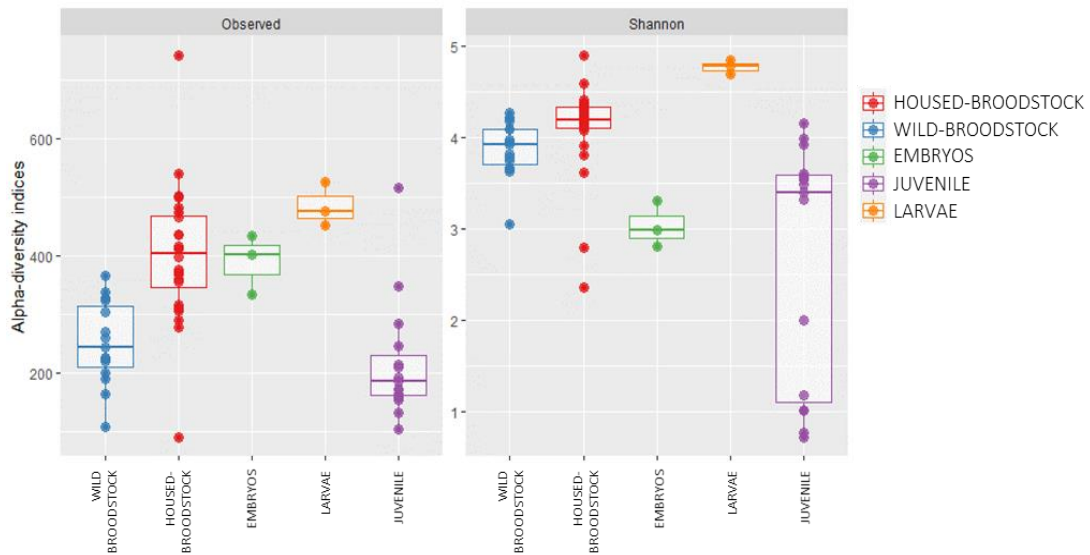


Fig. 2: Alpha diversity plot. Observed richness in OTUs, and Shannon’s diversity index value per sample type.

Tab. 3: Alpha-diversity indices values on the different microbiota samples.

Sample type	Observed richness (OTUs)	Shannon's diversity index
	(mean ± sd)	(mean ± sd)
broodstock_stab	427 ± 98	4.11 ± 0.51
broodstock_wild	250 ± 72	3.87 ± 0.31
embryos	289 ± 206	3.35 ± 1.36
food	271 ± 61	3.32 ± 0.03
juvenile	217 ± 103	2.64 ± 1.34
larvae	380 ± 28	4.29 ± 0.10
seawater	409 ± 133	3.55 ± 1.07

### Beta-diversity

The beta-diversity analysis was built with the Jensen - Shannon Divergence metric and visualized with a principal coordinate analysis (PCoA) (fig. 3). The plot exhibited different bacterial composition between the sample types. All the samples from a same type were grouped together (betadisper analysis, Permutest results: Mean Sq. = 0.12957, F = 16.257, *p-value* = 0.001), and significantly distinct from the other groups (Permanova: R<sup>2</sup> = 0.28838, F = 5.6734, *p-value* = 0.001). The microbiota of 3 early stages of *H. forskali* were different, as well as the coelomic microbiota of wild and housed-broodstock (fig. 3), suggesting an impact of the captivity on the coelomic microbiota.

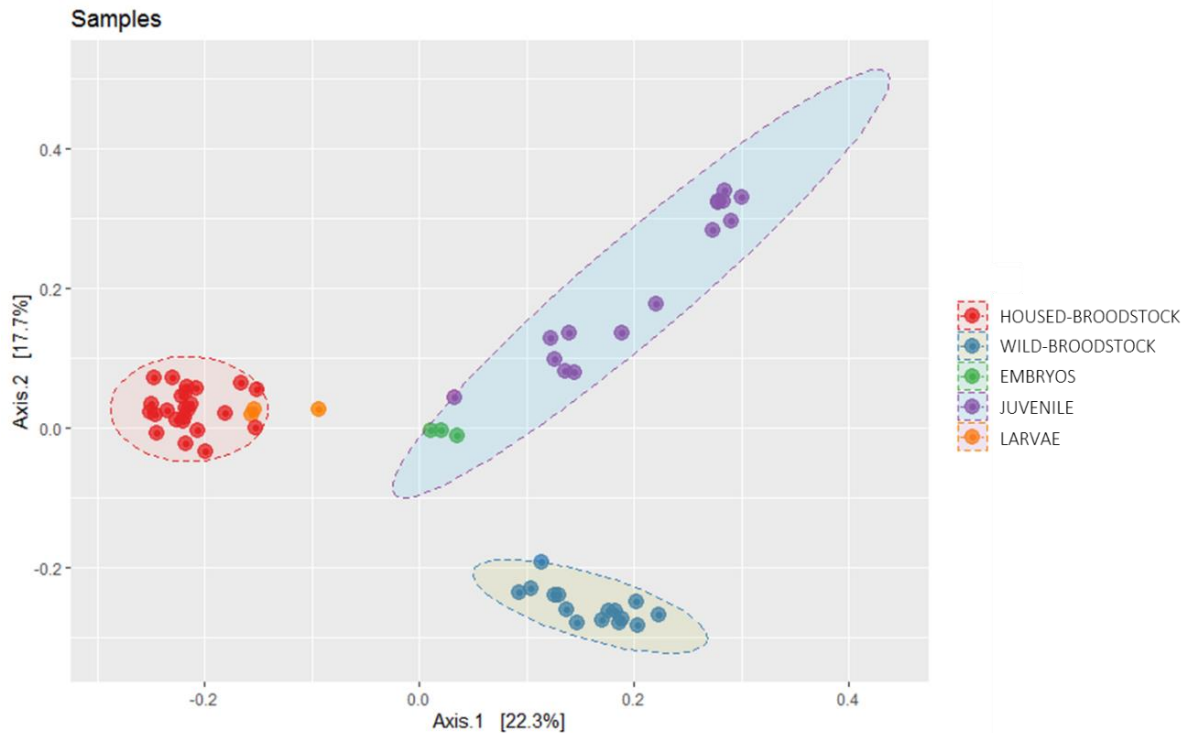


Fig. 3: PCoA of the samples of sea-cucumber microbiota. Ordination based on the Jensen - Shannon Divergence metric with 95 interval confidence ellipses.

### Composition of bacterial communities

The composition of the bacterial communities of environmental samples and of Sea-cucumber microbiota has also been explored (supp. Fig. 2). At the rank phylum, the Proteobacteria dominated all the samples composition and represented more than a half of the total abundance (fig. 4A). However, the compositional analysis showed differences between sample type, with a highest abundance of the Firmicutes in food samples, of the Campylobacterota in embryos microbiota and of the Spirochaetota in the whole-body microbiota of juveniles and in seawater (fig.4A) The Actinobacteria were more represented in larvae and in broodstock microbiota. More precisely, differences were accentuated at the rank order, and bacterial patterns highlighted between samples (fig. 4B), validating the previous analysis (fig. 3). First, the bacterial assemblages between wild and housed *H. forskali* were different, with dominating orders such as the Flavobacteriales, the Rhodobacterales and the Pseudomonadales in microbiota of wild sea-cucumber. In the earliest life stages of *H. forskali*, compositions were also contrasted, with a dominance of the Enterobacterales and the Campylobacterales in embryos microbiota, and of the Burkholderiales in juvenile microbiota. The most abundant families were analysed and plotted as a tree of the main 30 families (supp. Fig. 3,4,5).

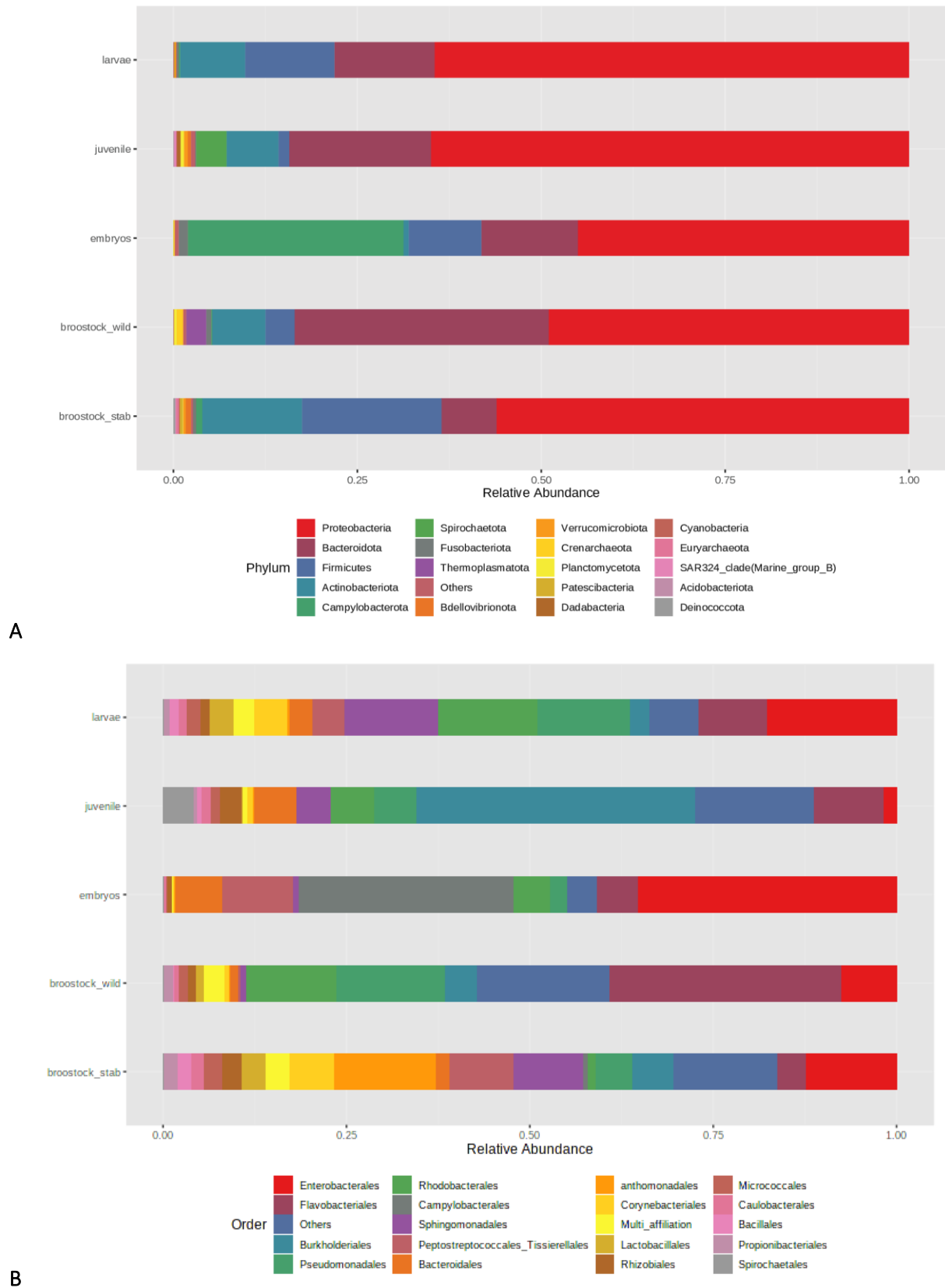


Fig. 4: Composition of 20 most abundant taxa in the microbiota of *H. forskali*, according to the life stage. A: most abundant phyla. B: most abundant orders.

Differential abundance analysis on first stages

The analysis conducted with DESeq2 highlighted 11 genera and 12 OTUs with a significant differential abundance between the earliest life stages of *H. forskali* (fig. 5, tab. 4). The genera *Roseovarius* and *Schlegelella* were associated to the microbiota of the juveniles and the larvae, the genera *Marimicrobium* and *Shimia* linked to juveniles, the genera *Fusibacter* and *Lutibacter* were highly abundant in embryos microbiota (fig. 5, tab. 4).

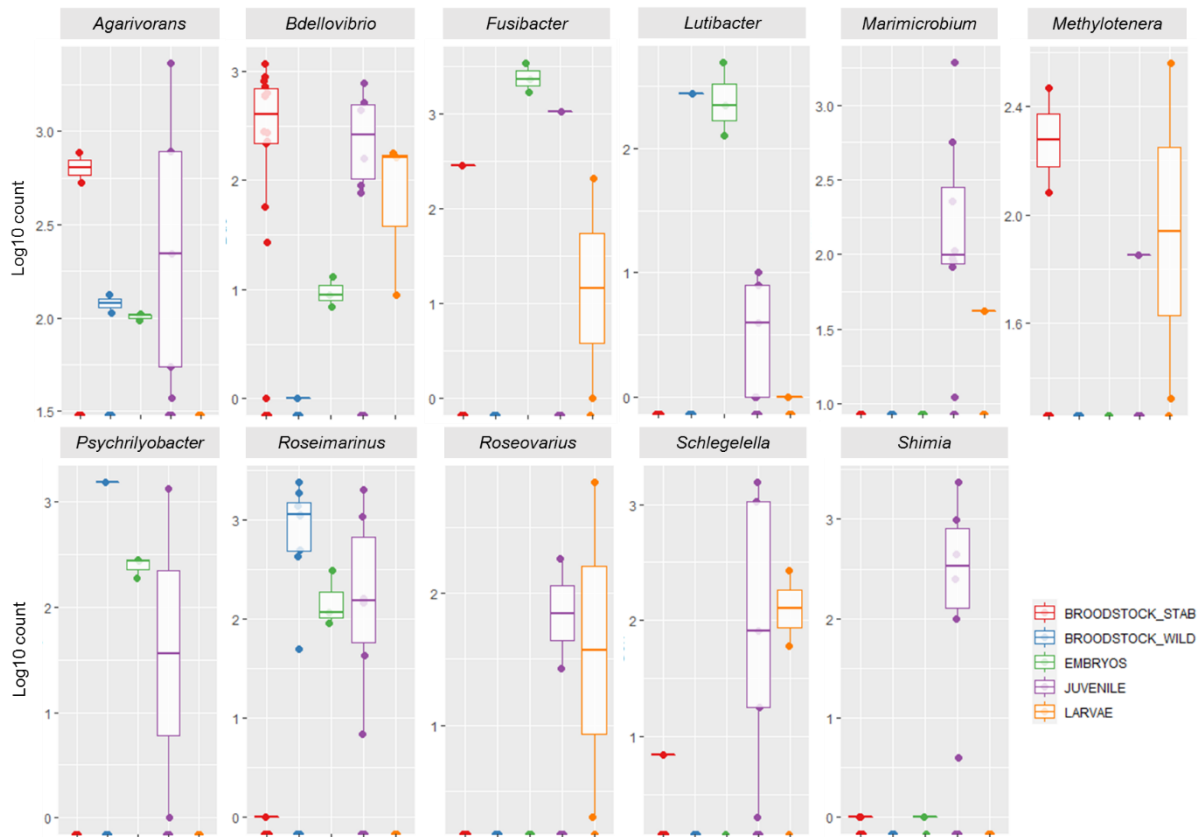


Fig. 5: Log10 transform count of the 11 genera exhibited differential abundance in the microbiota of the earliest stages of *H. forskali* (p-value cutoff 0.05).

Tab. 4: Statistical values associated with the DESeq2 Analysis on the microbiota of the earliest life stages of *H. forskali*

Genus	log2FC	lfcSE	p-values	FDR
<i>Agarivorans</i>	-25.999	4.6563	2.36E-08	3.17E-06
<i>Bdellovibrio</i>	-21.812	5.1217	2.06E-05	0.0013833
<i>Fusibacter</i>	-14.863	4.55	0.0010886	0.029283
<i>Lutibacter</i>	-11.684	3.7845	0.0020192	0.049379
<i>Marimicrobium</i>	16.181	4.41	0.0002434	0.0072734
<i>Methylothera</i>	20.997	5.5253	0.0001446	0.0055581
<i>Psychrilyobacter</i>	-26.976	5.4664	8.02E-07	7.19E-05
<i>Roseimarinus</i>	-26.37	4.2775	7.05E-10	1.90E-07
<i>Roseovarius</i>	21.281	5.5251	0.0001173	0.0055581
<i>Schlegelella</i>	18.683	4.8827	0.0001301	0.0055581
<i>Shimia</i>	-18.123	4.8868	0.0002084	0.007007



### A temporal core microbiota associated with a life stage

The temporal core microbiota, associated to the earliest life stages of *H. forskali* were determined (tab. 5). For the embryos, 68 genera and 94 OTUs constituted the embryos core microbiota, found in all the embryos samples (tab. 5), representing 39% of the total abundance, and the first 15 most abundant genera represented 32.9% of the abundance. The larvae core microbiota, prevalent at 100%, was composed by 27 genera and 44 OTUs, and with a total abundance of 23.4%, and an abundance of 21% for the first 15 genera. Finally, the juvenile core microbiota was composed by 15 genera and 21 OTUs that represented 15.4% of the total abundance (tab. 5).

Tab. 5: 15 most abundant genera of the temporal core microbiota associated with the earliest life stages of *H. forskali*

EMBRYOS		LARVAE		JUVENILES	
Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)
<i>Vibrio</i>	9.5%	<i>Sphingobium</i>	6.9%	<i>Algibacter</i>	0.5%
<i>Fusibacter</i>	8.6%	<i>Corynebacterium</i>	2.8%	<i>alpha cluster</i>	0.0%
<i>Labilibacter</i>	2.8%	<i>Acinetobacter</i>	1.8%	<i>Bacteroides</i>	3.8%
<i>Carboxylicivirga</i>	2.6%	<i>Peptostreptococcus</i>	1.5%	<i>Bradyrhizobium</i>	0.3%
<i>Winogradskyella</i>	1.5%	<i>Neptuniibacter</i>	1.2%	<i>Caulobacter</i>	0.4%
<i>Thalassotalea</i>	1.3%	<i>Streptococcus</i>	0.9%	<i>Cutibacterium</i>	0.2%
<i>Polaribacter</i>	1.1%	<i>Sphingomonas</i>	0.9%	<i>Dinoroseobacter</i>	0.2%
<i>Lutibacter</i>	0.9%	<i>Anaerococcus</i>	0.8%	<i>Lysinibacillus</i>	0.6%
<i>Psychrilyobacter</i>	0.8%	<i>Prevotella</i>	0.7%	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	1.0%
<i>Maribacter</i>	0.8%	<i>Porticoccus</i>	0.7%	<i>Phyllobacterium</i>	0.2%
<i>Pseudoalteromonas</i>	0.7%	<i>Pseudomonas</i>	0.6%	<i>Polaribacter</i>	5.1%
<i>Shewanella</i>	0.7%	<i>Anoxybacillus</i>	0.6%	<i>Ruegeria</i>	0.6%
<i>Profundimonas</i>	0.6%	<i>Finegoldia</i>	0.6%	<i>Sphaerochaeta</i>	1.5%
<i>Roseimarinus</i>	0.6%	<i>Novosphingobium</i>	0.6%	<i>Sphingomonas</i>	1.2%
<i>Neptuniibacter</i>	0.5%	<i>Flavobacterium</i>	0.5%	<i>Tropicimonas</i>	0.0%
<b>Cumul. abundance</b>	<b>32.9%</b>	<b>Cumul. abundance</b>	<b>21.0%</b>	<b>Cumul. abundance</b>	<b>15.4%</b>

### Horizontal and vertical transmission: shared OTUs

To study the vertical and the horizontal transmission of bacterial communities, the number of shared OTUs in the different microbiota was compared with the previous microbiota of *H. forskali* stages and with the direct environment (fig. 7). Thus, the coelomic microbiota of housed broodstock shared 12% of their OTUs with the initial and wild broodstock, and shared 15% with the bacterial community of the seawater, and only 4% with the food (fig. 7). Concerning the microbiota of the earliest stages, the

embryos microbiota shared 46% of its OTUs with the seawater and 42% with its parents, the microbiota of the Auricularia, which was opened-mouth and feeding larvae, shared 35% of its OTUs with the seawater (containing microalgae), and 25% with the embryos. Finally, after the metamorphosis of the larvae, the juvenile microbiota shared 14% of the OTUs with the larvae, 9% with the bacterial communities of the seawater, and 4% with the food. The presence and abundance of shared OTUs between the microbiota of the different life stages validated the existence of a vertical transfer, as well as a horizontal transfer between the *H. forskali* microbiota and its direct environment, such as food or seawater, in different proportion according to its life development.

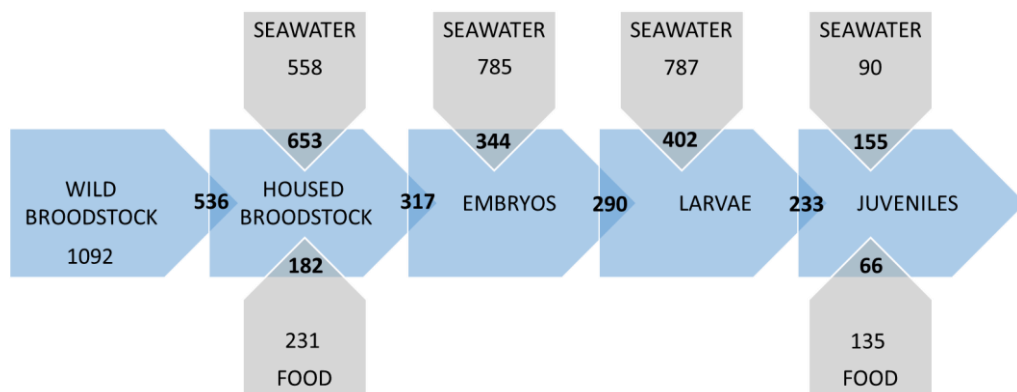


Fig. 7: Shared OTUs between the microbiota and the bacterial communities of the environment and the previous life stage.

### Effect of captivity in the composition of broodstock microbiota

The composition of microbiota differed from wild and housed- broodstock, and to a lesser extent between the captivity duration (newly- 2 month housed, and 7-month housed animals) (fig. 7). At the family level, wild microbiota were characterized by an important abundance of the *Flavobacteriaceae* and the *Rhodobacteraceae*, which highly decreased in microbiota of housed-animals. Then, newly-housed animals exhibited a microbiota with a high abundance of *Sphingomonadaceae*, shifted by the *Xanthomonadaceae* in 7-month housed broodstock.

The Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) validated the previous results and exhibited 58 genera and 167 OTUs as biomarkers of the coelomic microbiota in wild or housed *H. forskali* ( $p$ -value 0.05) (fig. 8). The genera identified as biomarker for the coelomic microbiota of wild broodstock were typical marine bacteria, such as the Marine Group NS4 and NS5, in opposition with the coelomic microbiota of housed broodstock. The analysis validated the plasticity of the coelomic microbiota of *H. forskali* broodstock, and thus the impact of captivity in the composition of the coelomic microbiota.

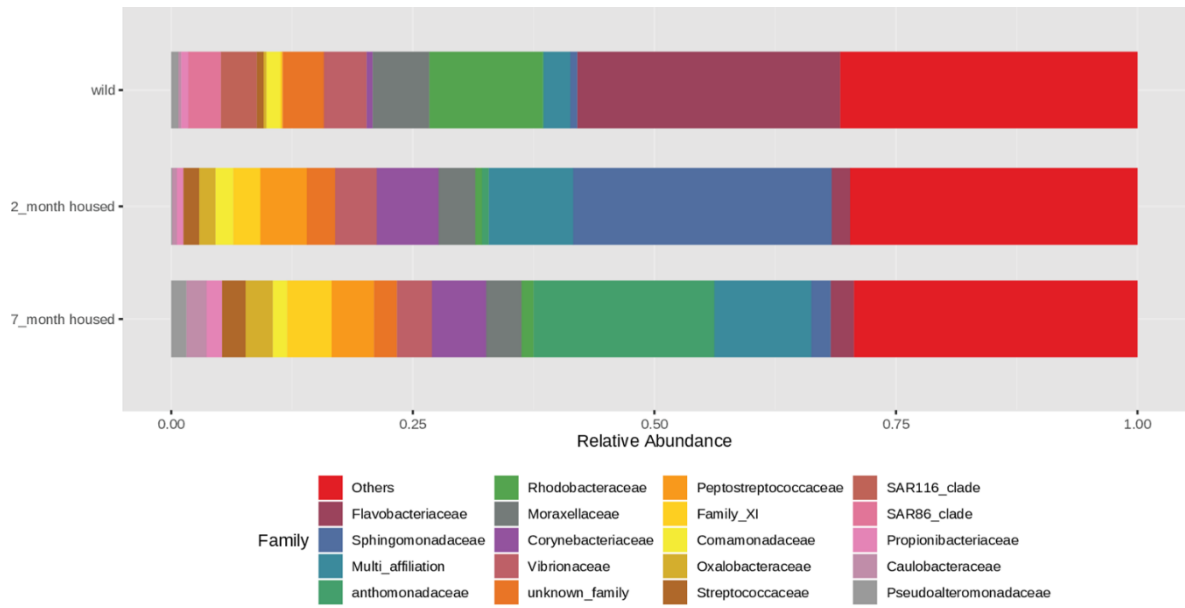


Fig. 8: Most abundant families in the wild and housed brostock microbiota

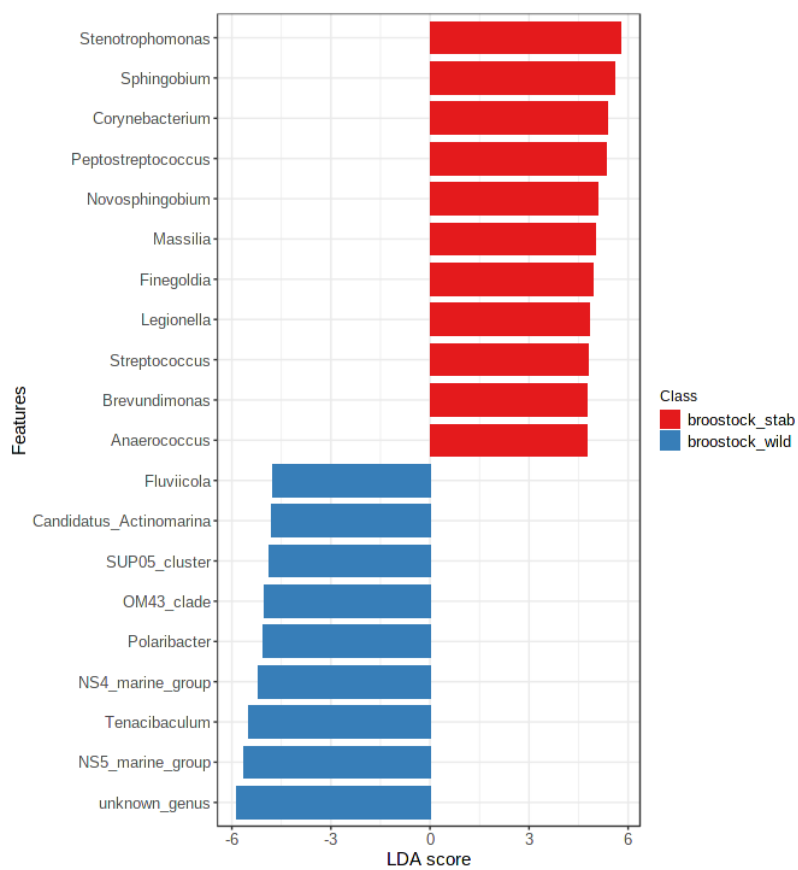


Fig. 9: Identification with LefSE of the biomarker genera of the coelomic microbiota in wild (in blue) or housed (in red) *H. forskali*

## DISCUSSION

### A diverse and distinct microbiota, from the embryos to the broodstock

The microbiota of wild broodstock, housed-broodstock, embryos, Auricularia larvae and juveniles from a herd of sea-cucumbers *H. forskali* were analysed, as well as bacterial communities of their environment (food, seawater). The results highlighted the presence of a microbiota, from the broodstock to its offspring. The importance of the microbiota on the host development throughout its life history was previously demonstrated, especially in marine invertebrates (21–23), in fish (24,54) or in insects(19). The alpha diversity measures exhibited significantly means between the different microbiota, with the highest diversity according to the Shannon index for the larvae and the broodstock. Moreover, the comparison of the contrast of abundance in the bacterial communities of the different microbiota, with the Jensen-Shannon divergence metric, showed the existence of specific bacterial assemblages and abundances between the different microbiota according to the life stages. The analysis of the composition of these microbiota validated the beta-diversity analysis, the most abundant taxa assemblages were different between the microbiota.

### Horizontal and vertical transfer

The analysis of shared OTUs between the different microbiota and the bacterial communities of their environment validated partial transfer of bacteria from the food and the seawater, qualified as horizontal transfer (19,34). The embryos and the larvae shared an important part of their OTUs with the rearing seawater. The embryos microbiota was an external microbiota that could be considered as a skin microbiota, and the gut microbiota, a semi-internal microbiota, probably begun its constitution with the first opened-mouth larvae stage, when larvae started to feed, during the late-gastrula and early Auricularia (22). The juveniles shared more OTUs with the bacterial communities of the seawater in comparison with the food, this observation was already described in the tilapia rearing (25).

Horizontal transfers were already described in marine hatchery, such as in Echinoidea larvae (22) where the zootechnical performance (growth and survival) were linked with the bacterial environment, or in fish hatchery (25) where the gut microbiota of tilapia larvae were correlated with the bacterial communities of seawater, more than with the food. Horizontal transfer in the microbiota of adult stages were frequently studied in Vertebrates, especially with the coprophagy (54–57) that promoted the gut microbiota, and with artificial horizontal transfer with the fecal transplantation (58). The juveniles and the broodstock of *H. forskali* have been found to eat their faeces (data not shown), probably to stimulated their gut microbiota and for the nutrient reabsorption.

Otherwise, the microbiota of the embryos shared 42 % of their OTUs with the broodstock microbiota, evocating a potential vertical transfer. However, this observation was probably do to the aquaculture facilities: spawning and fertilization occurred in the broodstock tank, and the external membrane of the embryos were linked to the broodstock and the seawater of the broodstock tank. This type of vertical transfer between the broostock and its offspring was facilitated in aquaculture because of the closed-system, but probably limited or impossible in the nature for marine invertebrates (59) with an external fertilization. All these exchanges permitted to diversify the microbiota, or to specialize the microbiota among the life cycle.

### Specialization of the microbiota correlated with the life cycle

The result of the differential abundance analysis conducted on the microbiota of the earliest life stages highlighted 11 genera. Among them, the genus *Agarivorans*, constituted by Gram-negative and strictly aerobic rods and requiring salt, could also be found in the intestine of marine invertebrates, where it was able to hydrolyse the Agar, and exhibited other enzymatic activities (60,61). This genus was differentially found in the juveniles microbiota, and its presence could be linked to digestive activities, to hydrolyse seaweed detritus (62,63). Moreover, presence of the genus *Shimia* in juvenile microbiota were also probably correlated with digestive activities, it was first described in marine sediment and capable of numerous hydrolysis especially on gelatin, chitin, xylan or starch (64). These observations validated the presence of functional OTUs in the juvenile microbiota, and the feeding regime of *H. forskali* (62,63). Otherwise, the core microbiota associated with these earliest life stages, that could be considered as temporal core microbiota (65), was determined, based on high prevalence. These temporal core microbiota were characterized by a highly abundant taxa, suggesting a primordial role in the host (4,65,66).

### The captivity influenced the coelomic microbiota of *H. forskali*

The effect of captivity on animal microbiota was little studied on marine invertebrates, but in Vertebrates, modification of the gut microbiota was observe in lizards (67,68), in birds (69), or in primates (70,71), and newly in sea-cucumbers (72) sometimes associated with a decrease in microbiota diversity. But the impact of captivity in Echinoderms microbiota remained unknown. In this study, the microbiota of the considered as innermost anatomical compartment of *H. forskali*, the coelomic fluid, was explored in wild animals, and before several months of captivity. This anatomical compartment was considered as the key of immunity in Echinoderms (73–75). The bacterial communities of coelomic microbiota were significantly different, in terms of composition and taxa abundance, between the wild and the housed Sea-cucumbers *H. forskali*. The coelomic microbiota exhibited a plasticity, already described in other Echinoderms and linked with environmental parameters (76–78), or with host health

(73,75,79,80). Therefore, a decrease of the typical marine bacteria (Marine Group) was observed in profit to more general taxa. These observations, auditioned by the number of shared OTUs between the coelomic microbiota and the bacteria of the seawater, hypothesized an exchange between the coelomic fluid and the seawater.

## Conclusion

The analysis of the microbiota of *H. forskali* among its life cycle highlighted the existence of distinct bacterial communities, characterized by different bacterial assemblage and taxa abundance. Presence of abundant shared taxa between the microbiota of the earliest life stages validated the principle of horizontal transfer, and the probably first acquisition of the gut microbiota in the first feeding larval stage. Moreover, effect of the captivity on the coelomic microbiota of wild broodstock of *H. forskali* has been demonstrated and confirmed the plasticity of this microbiota.

## Acknowledgements and funds

This work was funded by European maritime and fisheries Fund in France (HOLOFARM project, FEAMP - Innovative Aquaculture). Hélène Laguerre was supported by a “Quimper-Bretagne Occidentale” grant for PhD thesis. Thanks to the experimental hatchery of Agrocampus-Ouest (Fouesnant, France) and its team, Grégory Raymond, Morgane Nédélec, Lionel Jardin, Julien Delaporte-Blanc and Aline Brosset, for the supply of larvae and juveniles. Thanks you to Cyril Noël (Sebimer, Ifremer), Christian Miquel and Stéphane Lobreaux (Alpine Ecology Laboratory - LECA, Grenoble Alpes University) for their advice on bioinformatics.

## REFERENCES

1. Baird DJ, Hajibabaei M. 2012. Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Mol Ecol* 21:2039–2044.
2. Bush A, Compson ZG, Monk WA, Porter TM, Steeves R, Emilson E, Gagne N, Hajibabaei M, Roy M, Baird DJ. 2019. Studying Ecosystems With DNA Metabarcoding: Lessons From Biomonitoring of Aquatic Macroinvertebrates. *Front Ecol Evol* 7:434.
3. Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob Ecol Conserv* 17:e00547.
4. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH. 2012. Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *BMC Microbiol* 12:20.
5. Limborg MT, Alberdi A, Kodama M, Roggenbuck M, Kristiansen K, Gilbert MTP. 2018. Applied Hologenomics: Feasibility and Potential in Aquaculture. *Trends Biotechnol* 36:252–264.
6. Tzuc JT, Escalante DR, Rojas Herrera R, Gaxiola Cortés G, Ortiz MLA. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus* 3:280.
7. Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP. 2018. The Gut Microbiota of Marine Fish. *Front Microbiol* 9:873.
8. Butt RL, Volkoff H. 2019. Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Front Endocrinol* 10:9.
9. Asmani K, Petton B, Le Grand J, Mounier J, Robert R, Nicolas J-L. 2016. Establishment of microbiota in larval culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 464:434–444.
10. Clerissi C, Lorgeril J de, Petton B, Lucasson A, Escoubas J-M, Gueguen Y, Mitta G, Toulza E. 2018. Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters. *bioRxiv* 378125.
11. Offret C, Paulino S, Gauthier O, Château K, Bidault A, Corporeau C, Miner P, Petton B, Pernet F, Fabioux C, Paillard C, Blay GL. 2020. The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 96:fiia078.
12. Ye S, Liu M, Wang L, Li R, Li Q. 2018. Composition and Diversity of Intestinal Microbiota of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* from Different Habitats. *Int J Agric Biol* 20:5.
13. Bogatyrenko EA, Buzoleva LS. 2016. Characterization of the gut bacterial community of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Microbiology* 85:116–123.
14. Adewole D, Akinyemi F. 2021. Gut Microbiota Dynamics, Growth Performance, and Gut Morphology in Broiler Chickens Fed Diets Varying in Energy Density with or without Bacitracin Methylene Disalicylate (BMD). *Microorganisms* 9:787.
15. Chi C, Liu J-Y, Fei S-Z, Zhang C, Chang Y-Q, Liu X-L, Wang G-X. 2014. Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of *A. japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 38:367–373.

16. Wu Y-T, Yang W-Y, Samuel Wu Y-H, Chen J-W, Chen Y-C. 2020. Modulations of growth performance, gut microbiota, and inflammatory cytokines by trehalose on *Salmonella Typhimurium*-challenged broilers. *Poult Sci* 99:4034–4043.
17. Vieira F do N, Buglione Neto CC, Mouriño JLP, Jatobá A, Ramirez C, Martins ML, Barracco MAAM, Vinatea LA. 2008. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesqui Agropecuária Bras* 43:763–769.
18. Kim T-Y, Lee J-J, Kim B-S, Choi SH. 2017. Whole-Body Microbiota of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) from South Korea for Improved Seafood Management. *J Microbiol Biotechnol* 27:1753–1762.
19. Zhao Y, Wang W, Zhu F, Wang X, Wang X, Lei C. 2017. The gut microbiota in larvae of the housefly *Musca domestica* and their horizontal transfer through feeding. *AMB Express* 7:147.
20. Bruno D, Bonelli M, De Filippis F, Di Lelio I, Tettamanti G, Casartelli M, Ercolini D, Caccia S. The Intestinal Microbiota of *Hermetia illucens* Larvae Is Affected by Diet and Shows a Diverse Composition in the Different Midgut Regions. *Appl Environ Microbiol* 85:e01864-18.
21. Carrier TJ, Beaulieu SE, Mills SW, Mullineaux LS, Reitzel AM. 2021. Larvae of Deep-Sea Invertebrates Harbor Low-Diversity Bacterial Communities. *Biol Bull* 241:65–76.
22. Carrier TJ, Macrander J, Reitzel AM. 2017. A microbial perspective on the life-history evolution of marine invertebrate larvae: if, where, and when to feed <https://doi.org/10.1101/210989>.
23. Carrier TJ, Reitzel AM. 2020. Symbiotic Life of Echinoderm Larvae. *Front Ecol Evol* 7:509.
24. Olafsen JA. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200:223–247.
25. Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, Heilig H, Benvenuti G, Verreth J, Verdegem M. 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci Rep* 5:18206.
26. Laguerre H, Raymond G, Plan P, Améziane N, Bailly X, Le Chevalier P. 2020. First description of embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea), a new species for aquaculture in the north-eastern Atlantic. *Aquaculture* 521:734961.
27. Santos R, Dias S, Pinteus S, Silva J, Alves C, Tecelão C, Pedrosa R, Pombo A. 2015. Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. *Aquac Res* 47:2307–2323.
28. González-Wangüemert M. 2018. The fast development of sea cucumber fisheries in the Mediterranean and NE Atlantic waters: From a new marine resource to its over-exploitation. *Coast Manag* 13.
29. Sousa J, Félix P, Brito A, Venâncio E, Azevedo E Silva F, Simões T, Raposo A, Neves M, Narciso L, Melo R, Pombo A. 2020. The effects of stocking density on physiological traits in *Holothuria forskali* broodstock. *Aquac Res* 52.
30. MacDonald CLE, Stead SM, Slater MJ. 2013. Consumption and remediation of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) waste by the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Aquac Int* 21:1279–1290.



31. León-Palmero E, Joglar V, Álvarez PA, Martín-Platero A, Llamas I, Reche I. 2018. Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PLOS ONE* 13:e0196178.
32. Offret C, Jégou C, Mounier J, Fleury Y, Chevalier PL. 2019. New insights into the haemo- and coelo-microbiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. *J Appl Microbiol* 126:1023–1031.
33. Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press.
34. Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2015. OBITools: a Unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour* 10.1111/1755-0998.12428.
35. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294.
36. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2:e593.
37. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584.
38. Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461.
39. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421.
40. R Core Team. 2021. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
41. McMurdie PJ, Holmes S. 2013. *phyloseq*: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8:e61217.
42. Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed. Springer International Publishing.
43. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. 2017. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res* 45:W180–W188.
44. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. 2020. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc* 15:799–821.
45. Anderson MJ. 2017. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA), p. 1–15. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. American Cancer Society.
46. Anderson MJ, Ellingsen KE, McArdle BH. 2006. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecol Lett* 9:683–693.
47. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2019. *vegan: Community Ecology Package*.

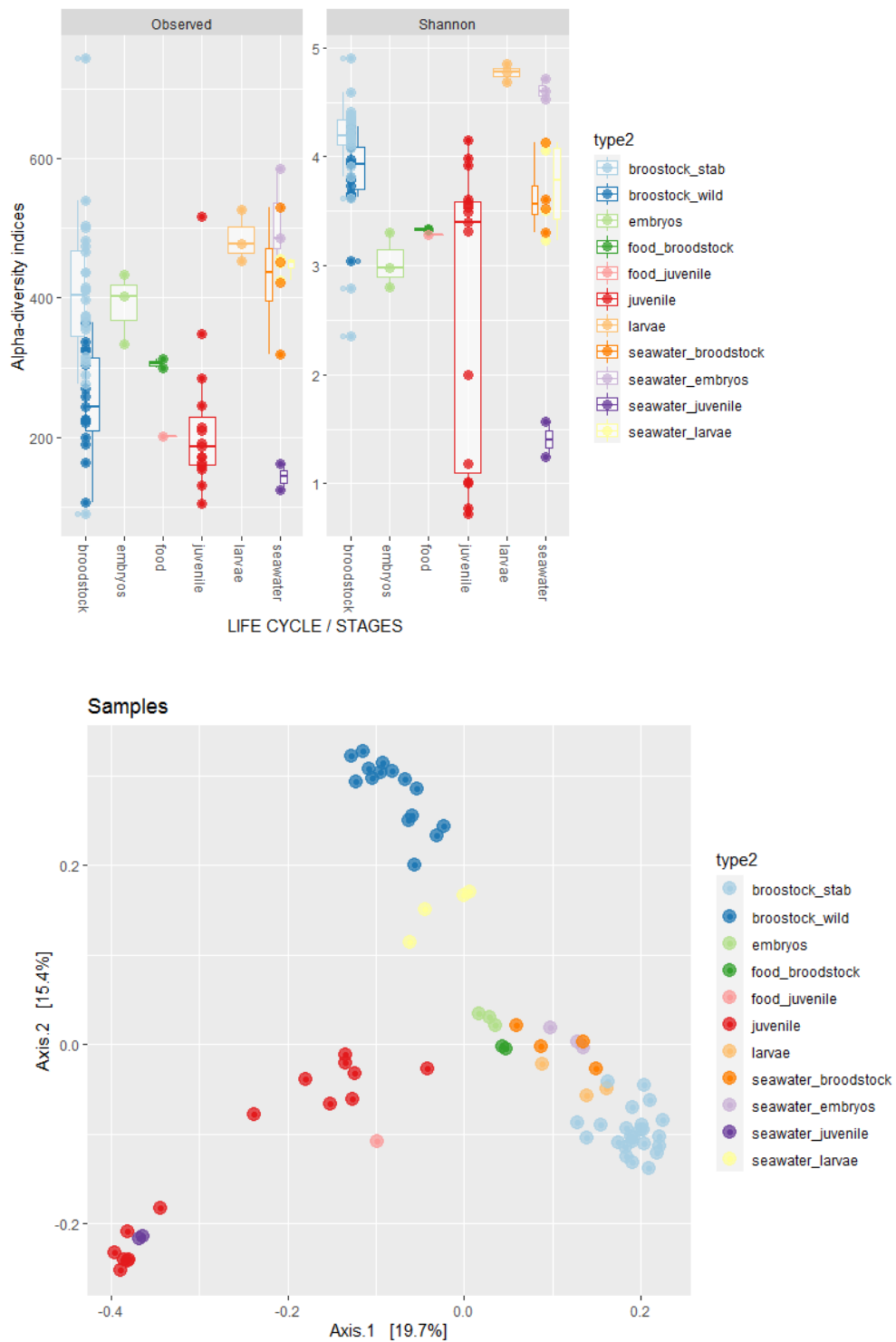
48. O'Neill M, Mathews K. 2002. Theory & Methods: A Weighted Least Squares Approach to Levene's Test of Homogeneity of Variance. *Aust N Z J Stat* 42:81–100.
49. Stier AC, Geange SW, Hanson KM, Bolker BM. 2013. Predator density and timing of arrival affect reef fish community assembly. *Ecology* 94:1057–1068.
50. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with *DESeq2*. *Genome Biol* 15:550.
51. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12:R60.
52. Saito K, Koido S, Odamaki T, Kajihara M, Kato K, Horiuchi S, Adachi S, Arakawa H, Yoshida S, Akasu T, Ito Z, Uchiyama K, Saruta M, Xiao J, Sato N, Ohkusa T. 2019. Metagenomic analyses of the gut microbiota associated with colorectal adenoma. *PLOS ONE* 14:e0212406.
53. Shetty SA, Hugenholtz F, Lahti L, Smidt H, de Vos WM. 2017. Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. *FEMS Microbiol Rev* 41:182–199.
54. Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Forberg T, Olsen Y, Verdegem M, Giatsis C, Skjermo J, Aasen IM, Gatesoupe F-J, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. 2018. Managing the Microbial Community of Marine Fish Larvae: A Holistic Perspective for Larviculture. *Front Microbiol* 9:1820.
55. KOBAYASHI A, TSUCHIDA S, UEDA A, YAMADA T, MURATA K, NAKAMURA H, USHIDA K. 2019. Role of coprophagy in the cecal microbiome development of an herbivorous bird Japanese rock ptarmigan. *J Vet Med Sci* 81:1389–1399.
56. Bo T-B, Zhang X-Y, Kohl KD, Wen J, Tian S-J, Wang D-H. 2020. Coprophagy prevention alters microbiome, metabolism, neurochemistry, and cognitive behavior in a small mammal. *ISME J* 14:2625–2645.
57. Giovannetti PM. 1982. Effect of coprophagy on nutrition. *Nutr Res* 2:335–349.
58. Guo W, Ren K, Ning R, Li C, Zhang H, Li D, Xu L, Sun F, Dai M. 2020. Fecal microbiota transplantation provides new insight into wildlife conservation. *Glob Ecol Conserv* 24:e01234.
59. Björk JR, Díez-Vives C, Astudillo-García C, Archie EA, Montoya JM. 2019. Vertical transmission of sponge microbiota is inconsistent and unfaithful. *Nat Ecol Evol* 3:1172–1183.
60. Kurahashi M, Yokota A 2004. *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a  $\gamma$ -proteobacterium isolated from marine animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:693–697.
61. Park S, Park J-M, Jung Y-T, Yoon J-H. 2014. *Agarivorans litoreus* sp. nov., a novel gammaproteobacterium isolated from seawater and emended description of the genus *Agarivorans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:1041–1047.
62. Boncagni P, Rakaj A, Fianchini A, Vizzini S. 2019. Preferential assimilation of seagrass detritus by two coexisting Mediterranean sea cucumbers: *Holothuria polii* and *Holothuria tubulosa*. *Estuar Coast Shelf Sci* 231:106464.
63. David F, Hubas C, Laguerre H, Badou A, Herault G, Bordelet T, Ameziane N. 2020. Food sources, digestive efficiency and resource allocation in the sea cucumber *Holothuria forskali*

- (Echinodermata: Holothuroidea): Insights from pigments and fatty acids. *Aquac Nutr* 26:1568–1583.
64. Nogi Y, Mori K, Uchida H, Hatada Y. 2015. *Shimia sagamensis* sp. nov., a marine bacterium isolated from cold-seep sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:2786–2790.
  65. Risely A. 2020. Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *J Anim Ecol* 89:1549–1558.
  66. Lemanceau P, Blouin M, Muller D, Moëgne-Loccoz Y. 2017. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci* 22:583–595.
  67. Tang G-S, Liang X-X, Yang M-Y, Wang T-T, Chen J-P, Du W-G, Li H, Sun B-J. 2020. Captivity Influences Gut Microbiota in Crocodile Lizards (*Shinisaurus crocodilurus*). *Front Microbiol* 11:550.
  68. Zhou J, Zhao Y-T, Dai Y-Y, Jiang Y-J, Lin L-H, Li H, Li P, Qu Y-F, Ji X. 2020. Captivity affects diversity, abundance, and functional pathways of gut microbiota in the northern grass lizard *Takydromus septentrionalis*. *MicrobiologyOpen* 9:e1095.
  69. San Juan PA, Castro I, Dhimi MK. 2021. Captivity reduces diversity and shifts composition of the Brown Kiwi microbiome. *Anim Microbiome* 3:48.
  70. Clayton JB, Vangay P, Huang H, Ward T, Hillmann BM, Al-Ghalith GA, Travis DA, Long HT, Tuan BV, Minh VV, Cabana F, Nadler T, Toddes B, Murphy T, Glander KE, Johnson TJ, Knights D. 2016. Captivity humanizes the primate microbiome. *Proc Natl Acad Sci* 113:10376–10381.
  71. Quiroga-González C, Cardenas LAC, Ramírez M, Reyes A, González C, Stevenson PR. 2021. Monitoring the variation in the gut microbiota of captive woolly monkeys related to changes in diet during a reintroduction process. *Sci Rep* 11:6522.
  72. Pagán-Jiménez M, Ruiz-Calderón JF, Dominguez-Bello MG, García-Arrarás JE. 2019. Characterization of the intestinal microbiota of the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *PLOS ONE* 14:e0208011.
  73. Smith LC, Ghosh J, Buckley KM, Clow LA, Dheilly NM, Haug T, Henson JH, Li C, Lun CM, Majeske AJ, Matranga V, Nair SV, Rast JP, Raftos DA, Roth M, Sacchi S, Schrankel CS, Stensvåg K. 2010. Echinoderm Immunity, p. 260–301. In Söderhäll, K (ed.), *Invertebrate Immunity*. Springer US, Boston, MA.
  74. Chen M, Wang F, Xing K, Zhu A, Zhang S. 2015. Immunology and Diseases, p. 257–287. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier.
  75. Smith LC, Arizza V, Barela Hudgell MA, Barone G, Bodnar AG, Buckley KM, Cunsolo V, Dheilly NM, Franchi N, Fugmann SD, Furukawa R, Garcia-Arraras J, Henson JH, Hibino T, Irons ZH, Li C, Lun CM, Majeske AJ, Oren M, Pagliara P, Pinsino A, Raftos DA, Rast JP, Samasa B, Schillaci D, Schrankel CS, Stabili L, Stensvåg K, Sutton E. 2018. Echinodermata: The Complex Immune System in Echinoderms, p. 409–501. In Cooper, EL (ed.), *Advances in Comparative Immunology*. Springer International Publishing, Cham.
  76. Faddetta T, Ardizzone F, Faillaci F, Reina C, Palazzotto E, Strati F, De Filippo C, Spinelli G, Puglia AM, Gallo G, Cavalieri V. 2020. Composition and geographic variation of the bacterial microbiota associated with the coelomic fluid of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Sci Rep* 10:21443.

77. Jackson EW, Pepe-Ranney C, Debenport SJ, Buckley DH, Hewson I. 2018. The Microbial Landscape of Sea Stars and the Anatomical and Interspecies Variability of Their Microbiome. *Front Microbiol* 9:1829.
78. Nakagawa S, Saito H, Tame A, Hirai M, Yamaguchi H, Sunata T, Aida M, Muto H, Sawayama S, Takaki Y. 2017. Microbiota in the coelomic fluid of two common coastal starfish species and characterization of an abundant *Helicobacter*-related taxon. *Sci Rep* 7:8764.
79. Lloyd MM, Pespeni MH. 2018. Microbiome shifts with onset and progression of Sea Star Wasting Disease revealed through time course sampling. *Sci Rep* 8.
80. Delroisse J, Van Wayneberghe K, Flammang P, Gillan D, Gerbaux P, Opina N, Todinanahary GGB, Eeckhaut I. 2020. Epidemiology of a SKin Ulceration Disease (SKUD) in the sea cucumber *Holothuria scabra* with a review on the SKUDs in Holothuroidea (Echinodermata). *Sci Rep* 10:22150.

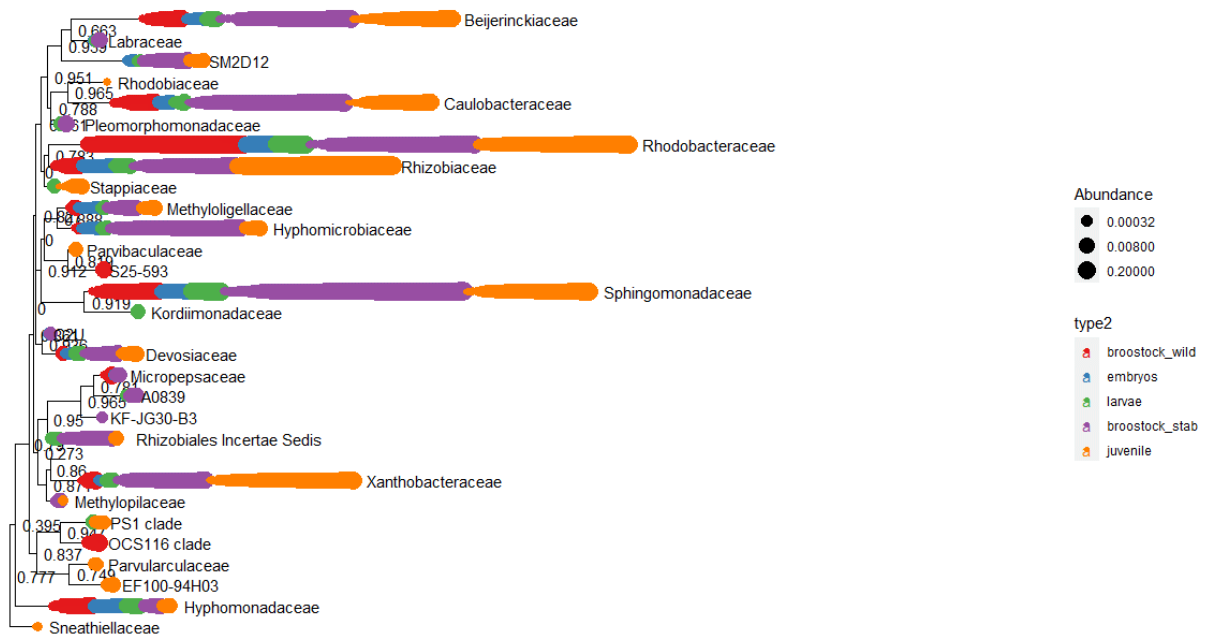
Supplementary materials

Supp. Fig. 1: Alpha-diversity et beta-diversity in the bacterial communities of the environmental samples

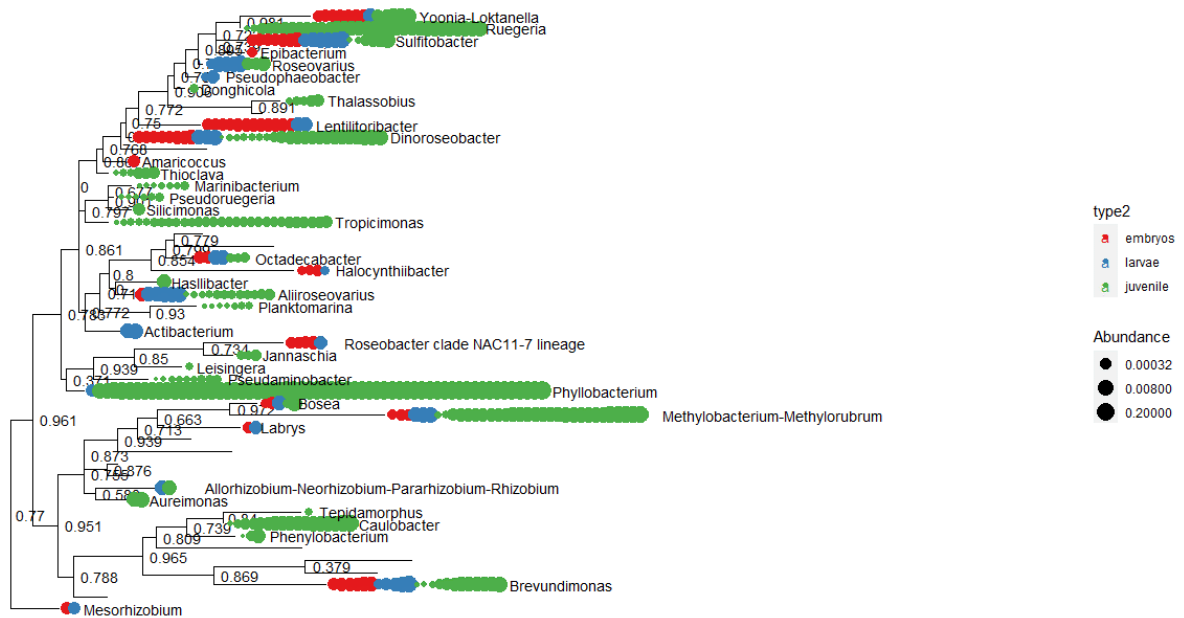




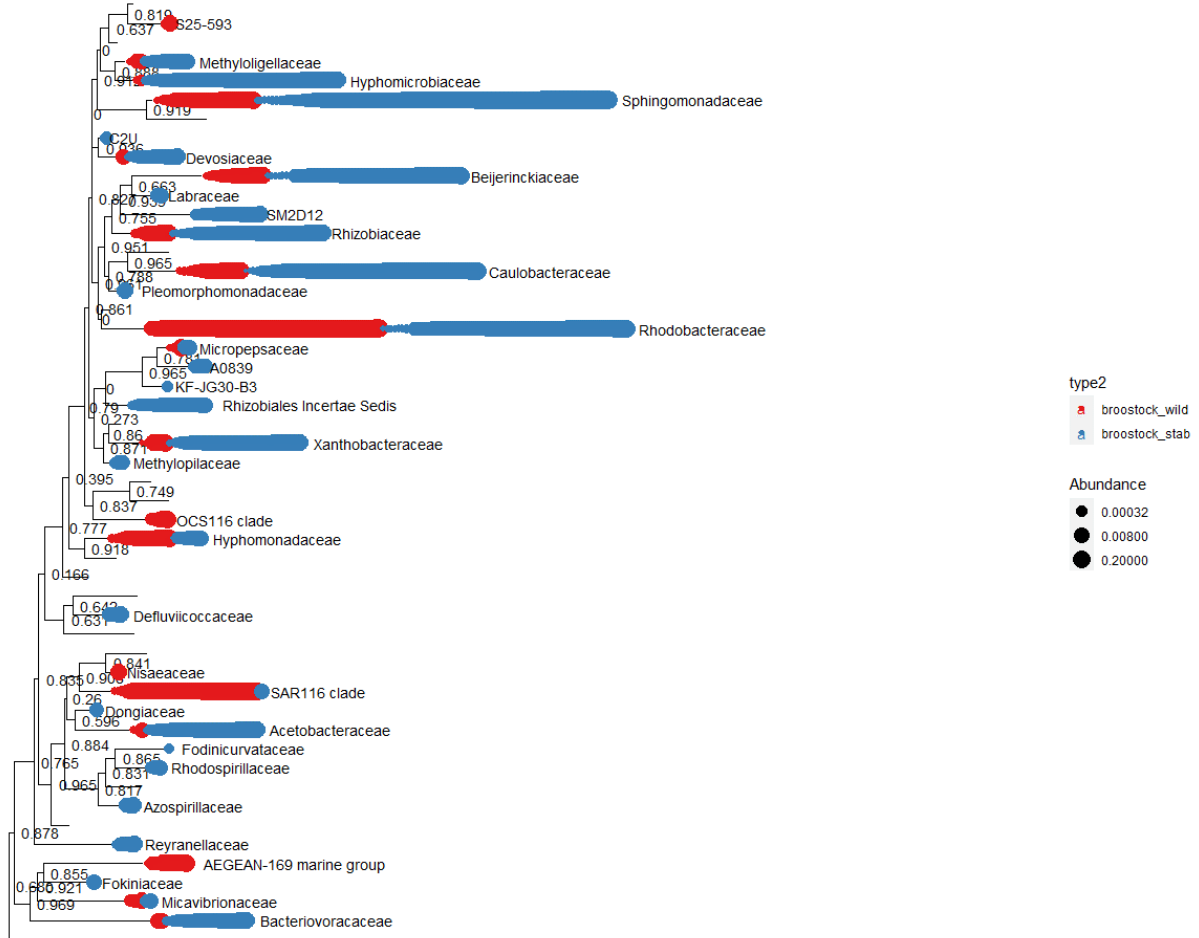
Supp. Fig. 3: 30 most abundant families in the microbiota of the different life stages of *H. forskali*



Supp. Fig. 4: 50 most abundant genera in the microbiota of the earliest life stages of *H. forskali*



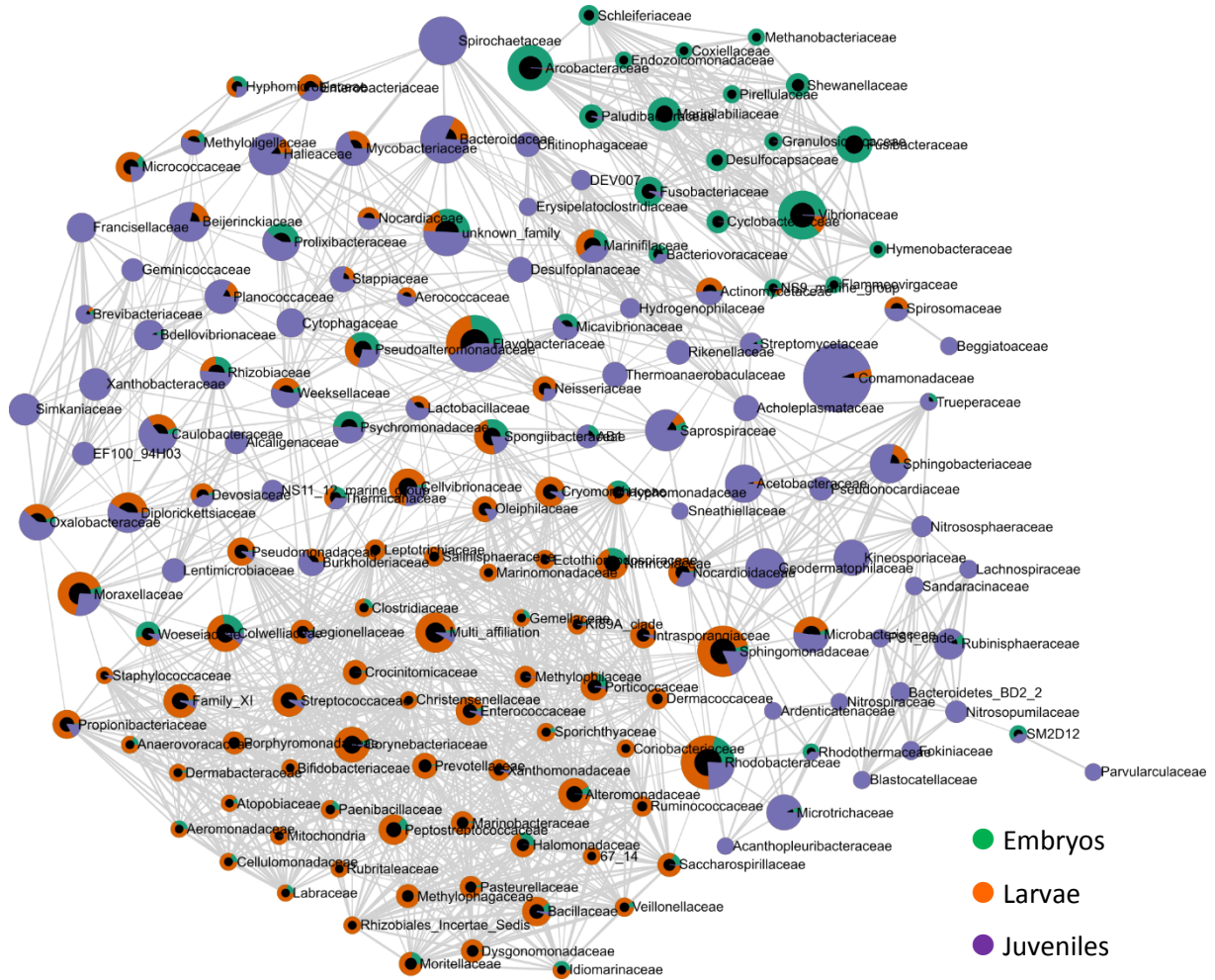
Supp. Fig. 5: 50 most abundant genera in the microbiota of the wild and housed- broodstock of *H. forskali*



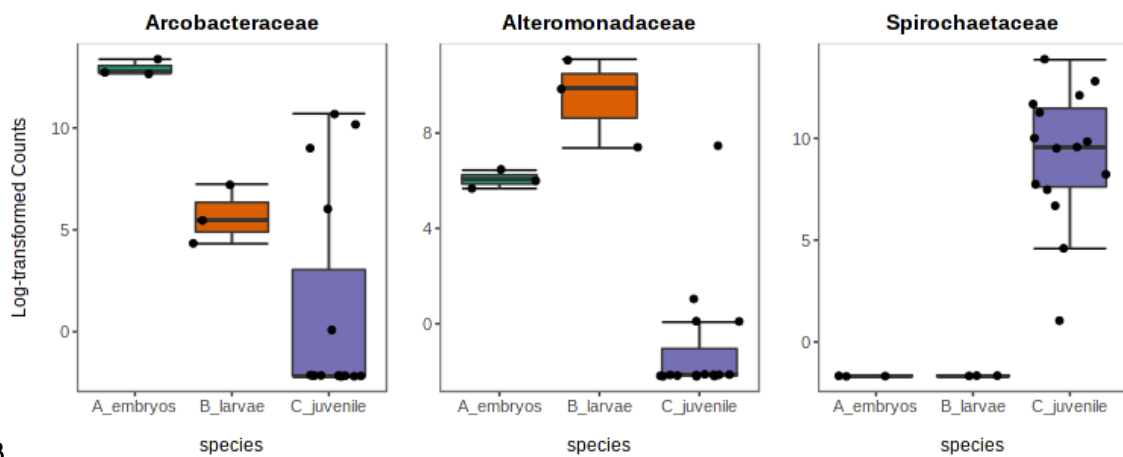


Suppl. fig 6: Correlation analysis, between taxa among the earliest life stages. A: correlogram, B: boxplot of taxa exhibited differential abundances

A



B



### 4.3 Conclusion du chapitre et perspectives

L'analyse du microbiote de *H. forskali* durant des phases clés de son cycle de vie par metabarcoding 16S prouve l'existence de microbiotes distincts et spécialisés. La présence d'un microbiote dès les premiers stades embryonnaires est montrée, probablement acquis en partie par imprégnation avec l'environnement (transmission horizontale), du fait de la présence de nombreux taxons communs avec l'eau de mer. Au stade Auricularia, la larve débute son alimentation, et son microbiote est distinct de celui du stade précédent et des communautés bactériennes de l'eau de mer. Nous pouvons considérer qu'il s'agit de la première étape d'implantation d'un microbiote gastro-intestinal, qui évoluera avec le développement de l'hôte, notamment avec la métamorphose. En effet, le microbiote total des juvéniles, benthiques et détritivores - dépositivores, présente des assemblages bactériens différents des stades planctoniques pré-métamorphose. La présence de souches bactériennes décrites comme dégradant l'agarose et la chitine à ce stade pose la question du rôle de ce microbiote dans les fonctions digestives de l'hôte.

Par ailleurs, les microbiotes cœlomiques de géniteurs sauvages et de géniteurs captifs sont différents. Ces résultats montrent à nouveau de la plasticité de ce compartiment et de son microbiote, en réponse à des modifications de l'environnement.

Une modulation des microbiotes de l'hôte existe donc, en fonction (i) de l'hôte lui-même, et notamment de son stade de vie, mais aussi en fonction (ii) de son environnement, et (iii) du microbiote lui-même très probablement.



## **Chapitre 4**

Impact du régime alimentaire sur les performances de croissance et le microbiote gastro-intestinal de juvéniles de *H. forskali* en milieu contrôlé



## 5. Impact du régime alimentaire sur les performances de croissance et le microbiote gastro-intestinal de juvéniles de *H. forskali* en milieu contrôlé

### 5.1 Préambule

En aquaculture, l'amélioration des performances zootechniques est une préoccupation majeure, et notamment la mise au point d'un aliment compatible avec le mode de production et le régime de l'animal. De fait, maîtriser l'alimentation des holothuries en captivité constitue la première étape indispensable à leur domestication. De plus, le régime alimentaire et le microbiote gastro-intestinal sont intimement liés.

Ainsi, dans ce chapitre, nous avons appliqué les techniques de metabarcoding 16S sur les microbiotes de juvéniles de concombres de mer, à des finalités aquacoles. Les expérimentations ont été conduites chez l'entreprise aquacole AQUA B (Lesconil, France), partenaire du LBCM dans le projet Holofarm.

Des juvéniles de *H. forskali* ont été alimentés à partir de différentes mixtures d'algues maturées et/ou à partir d'une alimentation fécale. Ces régimes alimentaires ont été choisis suite à des observations réalisées en captivité. En effet, il a été observé que des holothuries pouvaient réingérer leurs fèces, et d'autre part que les premières études conduites sur *H. forskali* et des espèces proches supposent une alimentation à base de détritux algaux (Boncagni et al., 2019; David et al., 2020).

L'objectif de l'étude est de déterminer l'aliment qui permettra des meilleures croissances et survies chez les juvéniles, mais également de corrélérer ces résultats avec la composition du microbiote gastro-intestinal des juvéniles.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un manuscrit qui devrait être soumis prochainement pour publication au journal Aquaculture.

## 5.2 Publication 4 (Draft)

### Impact of detrital feeding regimes with green algae on growth performance and microbiota diversity in juveniles of *H. forskali* (*Echinodermata, Holothuroidea*)

Laguerre Hélène, Grys Julien, Néel Cyril, Jegou Camille, Fleury Y., Le Chevalier P.

1. University of Brest, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, F-29334 Quimper, France
2. AQUA-B, Lesconil, France
3. IFREMER-IRSI-Service de Bioinformatique (SeBIMER), 1625 Route de Sainte-Anne, 29280 Plouzané

---

#### Summary

To domesticate a new species in aquaculture, the study of the feeding regime was essential. In this study, four detrital feeding regimes based on *Ulva spp.* or faeces mixtures were compared for the growth of juveniles from *H. forskali*. A 3-month experiment was carried out in indoor tanks to follow the growth performance and explore the whole-body microbiota of the juveniles. The feeding regime based on a mixture of juvenile faeces exhibited the higher growth rate and weight gain during all the experiment, a low mortality, with an important production of faeces revealing an efficient food intake. Moreover, the exploration of the juvenile whole-body microbiota validated the zootechnical results, the juveniles fed with a faecal-based food presented a richer and diverse microbiota, with the presence a high proportion of specific and biomarkers OTUs. Moreover, exploration of microbiota data demonstrated the link between the food and the microbiota, revealing a horizontal transfer. This work highlighted the detritivorous feeding behaviour of the juveniles of *H. forskali*, based on seaweed detritus and the recycling of organic matter by feeding on Sea-cucumber faeces.

**Key-words:** aquaculture, juveniles, experiment, Sea-cucumber, *Holothuria forskali*, growth performance, microbiota, V4-16S metabarcoding, feeding regime, *Ulva spp.*

## Introduction

Sea-cucumber farming was an important aquaculture sector worldwide, with the highest production areas located from the Western Indian Ocean to the Japan Seas (1,2). The main cultivated and harvested species was *Apostichopus japonicus*, with an annual production around 8 000 tonnes (dry weight) (1–3). The demand for “trepang” in Asia market was constantly increasing, linked with collapse of natural stocks due to an intensive fishing. In Europe, development of sea cucumber aquaculture was more recent and constituted a real opportunities for aquaculture diversification (3,4). European targeted species were *Holothuria mammata*, *H. arguinensis* (5,6), *H. poli* (7,8), *H. tubulosa* (9), and finally *H. forskali* (10,11) and first breeding experiments have been successful in hatchery (12). *H. forskali* (Delle Chiaie, 1823) was a temperate sea-cucumber distributed from the North-East Atlantic to the Mediterranean Sea, with the specificity to produce Cuvierian tubules. Its reproductive biology was recently described (10,11,13) as well as its feeding regime (14,15). Broodstock of *H. forskali* were mainly found on vertical walls in rocky beds, where they fed on sedimentary deposit and seaweed detritus, such as other Mediterranean species (16). Studies on other species of sea-cucumbers have demonstrated that the sediment ingested contributed to the diversity of the gastro-intestinal microbiota (17,18). Moreover, the relationship between the microbiota composition and the health of the host in aquaculture has been demonstrated (19–21), and more specifically between the gut microbiota and the growth performance in agriculture (22) or in aquaculture (23–26). However, studies on horizontal and vertical transfer of the gut microbiota in the earliest stages of the life cycle was anecdotal (27–29). In *H. forskali*, existence of a gut microbiota has recently been described (30). In the natural environment, juveniles of *H. forskali* has never been observed, and their feeding behaviour was suggested to be the same as the broodstock. For the development of a new aquaculture, knowledge on each stage of the life cycle was necessary to improve breeding procedure, and especially on early stages such as juveniles. Understand the interactions between the microbiota, the feeding regime and the growth performance were key elements to successful the juvenile rearing (31,32).

The aim of this study was first to compare the growth rate of cultivated juveniles of sea-cucumbers according to four detrital feeding regimes, and then, to identify the feeding regimes that promoted the diversity of the juvenile microbiota. Thereby, four food combinations, based on the green algae *Ulva spp.*, were compared in the experiment: dehydrated or fresh maturing *Ulva spp.*, and a faecal or non-faecal food.



## Material and methods

### Juveniles experiments

#### Juveniles rearing

One-year old juveniles of *H. forskali* (n=400) coming from the experimental hatchery of Agrocampus-Ouest (Fouesnant, France) were used for the growth and microbiota assays in the AQUA-B production site (Lesconil, France). Two identical raceways of 250 litres were filled with 5 µm-filtered seawater and constituted two experiments replicates (fig. 1A). In each raceway, four sieves of 0.25m<sup>2</sup> (21 µm mesh), corresponding to the four feeding regimes, were disposed and connected with the water tank by an airlift system, contributing to the seawater renewal and aeration (fig. 1A-B). 50 juveniles were put in each sieve (fig. 1B). The seawater temperature was maintained in these closed systems at 20± 1 °C with an immersion heater, and total water changes were made twice a week. The experiment were carried out in the dark (24h/24h, 7j/7), and manipulations were made under a red light to not disturb the juveniles. Temperature, dissolved oxygen and pH were daily followed.

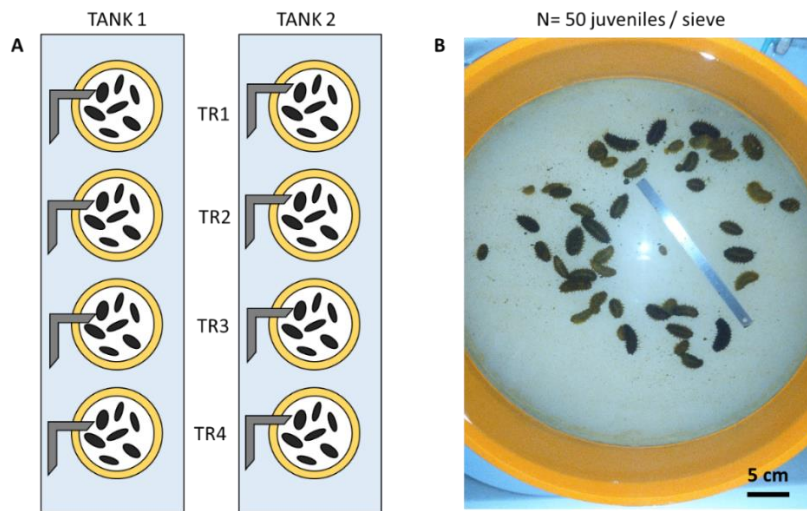


Fig. 1: Juveniles experiments. A. The two tanks replicates with a sieve by feeding regime, linked to the tank by an airlift system. B. Photo of a sieve contained the 50 juveniles.

#### Feeding regimes

In this experiment, four detrital feeding regimes were tested (tab. 1): two regimes with mature *Ulva spp.*, and two regimes based on faeces coming from juveniles. In the first condition (TR1), the food mixture was prepared with a flakes of dehydrated *Ulva spp.* (21-300µm), produced by the AQUA-B facilities (Lesconil, France), that were rehydrated for 24h, mixed and homogenised, and incubated at room temperature for a week, to “mature” the mixture. The third food (TR3) followed the same protocol, with fresh *Ulva spp.* produced by the AQUA-B facilities as raw material. In the second and

fourth conditions, juveniles were fed with a mixture of homogenised faeces from juveniles of the first and second conditions (tab. 1). Juveniles were fed between 2 and 3 times a week, the distribution was adapted according to their feeding consumption and juvenile biomass (tab. 1).

Tab. 1: parameters of the four feeding regimes in the juveniles experiments.

Conditions	Feeding regimes	Food rationing (in g food / g biomass)	Distribution
TR1	Dehydrated and maturing <i>Ulva spp.</i> (21-300 µm)	31	2 /week
TR2	Faeces of juveniles fed with TR1	58	3 /week
TR3	Fresh and maturing <i>Ulva spp.</i> (21-300 µm)	31	2 /week
TR4	Faeces of juveniles fed with TR3	70	3 /week

### Growth measurements

Because juveniles of *H. forskali* could be defined as easily stressed animals, which could already expulse their Cuvierian tubes or made auto-evisceration (33–35), growth measurements were carried out monthly, for a total of four measures: in Day 0, Day 27, Day 55 and the final in Day 82 (weight error:  $\pm 0.01\text{g}$ ). The experiment begun on the 9th of April 2020 and finished on the 30th of June 2020. The total duration of the experiment was 82 days (~3 month).

### Biological sampling

At the end of the experiment, samples of juveniles (n=15 per condition), seawater, faeces and food (n=1 per condition) were collected for the microbiota analysis. Juveniles were rinsed with artificial sterilized seawater, put in 15 mL sterile tubes and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Samples of food, seawater and faeces were centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes and pellets stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### Microbiota analysis

#### DNA extraction and sequencing

Tubes containing juveniles were first put in liquid nitrogen for 30 seconds, and then, juveniles were cut separately in slices with a scalpel blade. Juveniles samples were then incubated in 1,5 mL Inhibitex® buffer (from the Qiagen DNA Stool mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. Tubes were then centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes and supernatant were used for extraction. Then, bacterial DNA from all samples was extracted with the Qiagen DNA Stool mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions (protocol for pathogen detection, with an initial lysis step at  $95^{\circ}\text{C}$ ). DNA products were then amplified at the AnaEE Platform (Grenoble, France), in 4 replicates by sample. Amplification was focused on the hypervariable region V4 of the 16S rDNA gene, using barcoded primers for Bacteria: Bact02F (5'-GCCAGCMGCCGCGGTAA -3') and rBact02R (5'-

GGACTACCMGGGTATCTAA -3') according to the Metafast protocol (36). Sequencing was finally performed by Fasteris facilities (Geneva, Switzerland), with an Illumina MiSeq (2x250 pb).

#### Pre-processing on microbiota data

Data on the format fastq.gz were first trimmed and controlled, and sequences were assigned to samples with ngsfilter from the Obitools (37). Assigned sequences were then processed using Frogs 3.1.0 (38,39) in the Genouest Galaxy server. The Frogs pipeline was constituting by 5 steps as follow: the demultiplexing and merging process, the chimera removal with VSearch (40,41), the sequences clustering with Swarm (aggregation parameter: d=3) (39), the elimination of singletons with Frogs filter, and, finally, the taxonomical affiliation of the clusters in OTUs (Operational taxonomic Units) with Blast (42) and the SILVA 138.1 (pintail 100) database. For further statistical analysis, an R-data file was generated.

#### Statistical analysis

The R-data file was loaded on R (43) and samples replicates were merged. The Alpha diversity indices were calculated: the Observed richness, Chao1, ACE, Inverse Simpson, Shannon's diversity indices with the R packages *phyloseq* (44) and *ggplot2* (45). The alpha-diversity values were compared according to the variables "food type" with the non-parametric test of Kruskal-Wallis (p-value threshold 0.05). The rarefaction curves were generated with the R package *vegan* (46). Composition plots were drawn in the web platform Microbiome Analyst (microbiomeanalyst.ca) (47,48). After compositional transformation of the OTU table, the beta-diversity analysis based on the Shannon-Jensen Divergence metrics and the PCoA was plotted with *phyloseq* (44). A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA, n= 999 permutations) was done with the function *Adonis* (49) of the R package *vegan* on this distance matrix to compare the variability of microbial composition, and the homogeneity of dispersion among group of samples was test with the functions *betadisper*, *permutest* (Permutation test for homogeneity of multivariate Dispersions, n= 999 permutations) and ANOVA with the package *vegan* (46,49–52). After a total sum scaling of the data, a correlation analysis was performed at the family level, between faecal and non-faecal regimes (algorithm: pearson's correlation, permutations = 100, p-value= 0.05, correlation threshold 0.3) and, then a Linear discriminant analysis (LDA) effect size (*LEfSe*) was conducted at the genus rank on the platform Microbiome Analyst to identify key taxa (adjusted p-value cutoff: 0.05; log LDA score:2) (48,53,54). A Venn diagram was build by comparing shared and specific OTUs in the microbiota of the four herd of juveniles.

## RESULTS

This study aimed to compare the growth performance of *H. forskali* juveniles according to the feeding regime, and to analyse their microbiota. Four feeding regimes have been compared, and the whole-body microbiota of 15 juveniles per condition (n=60).

### Feeding behaviour and growth performance

#### Growth performance

The experiments began on April 2020 with juveniles from 0.14 to 0.66 g (fig. 2, tab. 2). During the experiment, the mean biomass increased regularly in each measure, with a growth rate between 0.83 and 1.04 g per month for the feeding regimes TR2, TR3 and TR4, and a lower growth was observed for the juveniles fed with the mixture TR1 (fig. 2, tab. 2). The most important weight gain was observed for the same feeding regimes, TR2, TR3, and TR4, with a weight gain comprised from 2.48 to 3.12g, and the final biomass was between 5 and 20 times higher than their initial biomass. On the contrary, the feeding regime TR1 exhibited the worst growth performances. The observed mortality was low for all the feeding regimes, with higher value for the feeding on seaweed mixture without faeces (8%). After the 3-month experiment, whatever the growth indicator, the more interesting feeding regimes were the food TR2 and TR4, constituted by faeces of juveniles fed with the mature mixture of *Ulva spp.* (tab. 2).

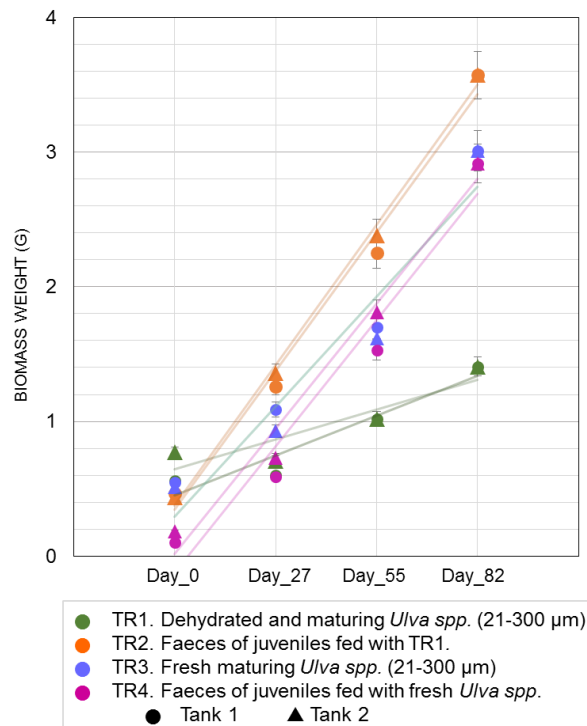


Fig. 2: Growth performance of juveniles according to their feeding regime

Tab. 2: Summary of growth performance by feeding regimes.

Feeding regime	TR1. dehydrated <i>Ulva spp.</i>	TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated <i>Ulva spp.</i>	TR3. fresh <i>Ulva spp.</i>	TR4. faeces of juveniles fed with fresh <i>Ulva spp.</i>
<i>n</i> =	100	100	100	100
Day_0	0.66	0.45	0.53	0.14
<b>Biomass weight (g)</b>				
Day_27	0.65	1.31	1.01	0.66
Day_55	1.02	2.31	1.66	1.67
Day_82	1.41	3.57	3.01	2.92
<b>Weight gain (g)</b>	<b>+ 0.74</b>	<b>+ 3.12</b>	<b>+ 2.48</b>	<b>+ 2.77</b>
<b>Gain ratio</b>	<b>x 2.1</b>	<b>x 7.9</b>	<b>x 5.6</b>	<b>x 20.2</b>
<b>Growth rate (g/month)</b>	<b>0.25</b>	<b>1.04</b>	<b>0.83</b>	<b>0.92</b>
<b>Total mortality (%)</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>2</b>

### Feeding behaviour

Otherwise, observations were conducted daily during the experiments, such as food intake, production of faeces, adhesion to the wall and mobility. These observations exhibited first a best food intake and production of faeces in the two feeding regimes TR2 and TR4, based on faecal mixture. Then, adhesion to the wall and mobility were also higher in conditions TR2 and TR4, suggesting a most active feeding in these conditions.

### Diversity analysis of the whole-body microbiota of the juveniles

#### Alpha-diversity

The alpha-diversity analysis of the whole-body microbiota of the four groups of juveniles exhibited differences in richness and diversity (fig. 3, tab.3). The highest values of both richness and diversity in microbiota were observed for juveniles from conditions TR2 and TR4 (faecal mixture) compared to microbiota of juveniles fed with the mixture of maturing seaweed (TR1, TR3). The microbiota of juveniles fed with the regime TR1 showed the lowest value of alpha-diversity indices. The results of the statistical test of Kruskal-Wallis validated significant differences of microbiota diversity (tab. 3), according the feeding regime, and more precisely between faecal food (TR2, TR4) and seaweed mixture (TR1, TR3). The difference between fresh or dehydrated *Ulva spp.* as raw material wasn't relevant (tab. 3). Alpha-diversity analysis of the food demonstrated a higher microbial diversity and richness in faecal foods TR2 and TR4 compared to the foods TR1 and TR3 (supplementary fig. 1).

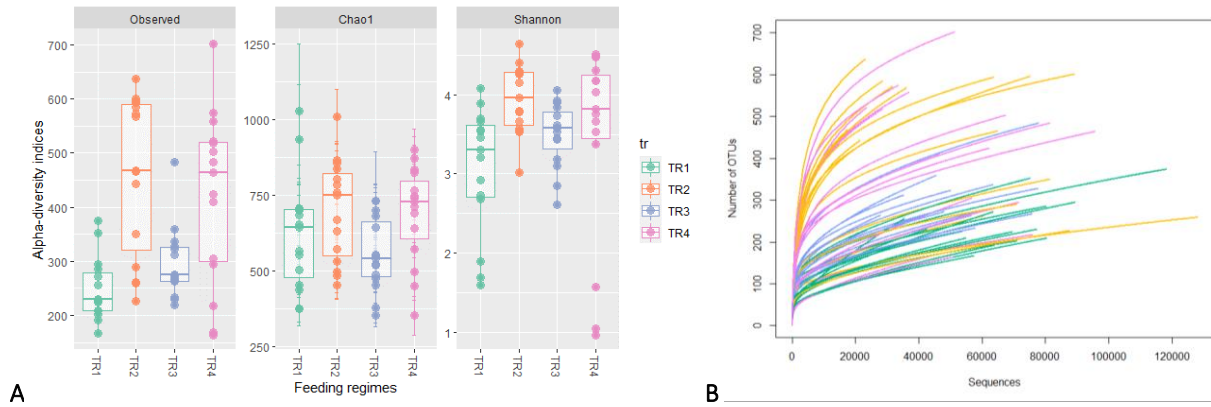


Fig. 3 Alpha-diversity analysis on juvenile microbiota. A: Comparison of 3 alpha-diversity indices according to the feeding regime. B: Rarefaction curves. Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva spp.*; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva spp.*; TR3. fresh *Ulva spp.*; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva spp.*

Tab. 3: Mean and statistical analysis of the alpha-diversity indices for the whole-body microbiota of the juveniles (Kruskal-Wallis test, p-value threshold 0.05)

Feeding regimes	Observed richness (OTUs)		Chao1 index		Shannon's diversity index	
	mean	± sd	mean	± sd	mean	± sd
TR1 (n=15) Dehydrated and maturing <i>Ulva spp.</i>	<b>248.13</b>	58.26	<b>620.17</b>	187.91	<b>3.06</b>	0.80
TR2 (n=15) Faeces of juveniles fed with TR1	<b>461.13</b>	147.05	<b>699.31</b>	166.46	<b>3.95</b>	0.44
TR3 (n=15) Fresh and maturing <i>Ulva spp.</i>	<b>296.07</b>	66.36	<b>553.47</b>	120.08	<b>3.50</b>	0.41
TR4 (n=15) Faeces of juveniles fed with TR3	<b>420.53</b>	159.03	<b>687.35</b>	158.92	<b>3.46</b>	1.23
Variables	chi-squared	p-value	chi-squared	p-value	chi-squared	p-value
TR1-2 vs. 3-4 <i>Ulva</i> fresh vs. <i>Ulva</i> dehydrated (df=1)	0.25272	<b>0.6152</b>	0.52481	<b>0.4688</b>	0.0078689	<b>0.9293</b>
TR2-4 vs. 1-3 Faeces vs non-faecal food (df=1)	16.413	5.09E-05	7.32	0.00682	10.676	0.00109
TR1,2,3,4 Feeding regime (df=3)	19.457	0.00022	8.2122	0.04182	12.534	0.00576

Beta-diversity

Beta-diversity analysis of the juvenile microbiota built with the Shannon-Jensen Divergence metric, exhibited two distinct groups: a group with the microbiota of the juveniles fed with a faecal food (TR2, TR4) and a second group with the microbiota of the juveniles fed with the *Ulva* mixture (TR1, TR3) (fig. 4). Statistics on the distance matrix validated differences between the different microbiota, according to the feeding regime (Tab.4). Moreover, the variable faecal / non faecal food was the most important to explain the divergence between microbiota validated by both the PERMANOVA analysis on the distance matrix (PERMANOVA: R<sup>2</sup>=0.24799, p-value 0.001; tab. 4) and the analysis of homogeneity of dispersion among group samples and the group centroid (tab. 4).

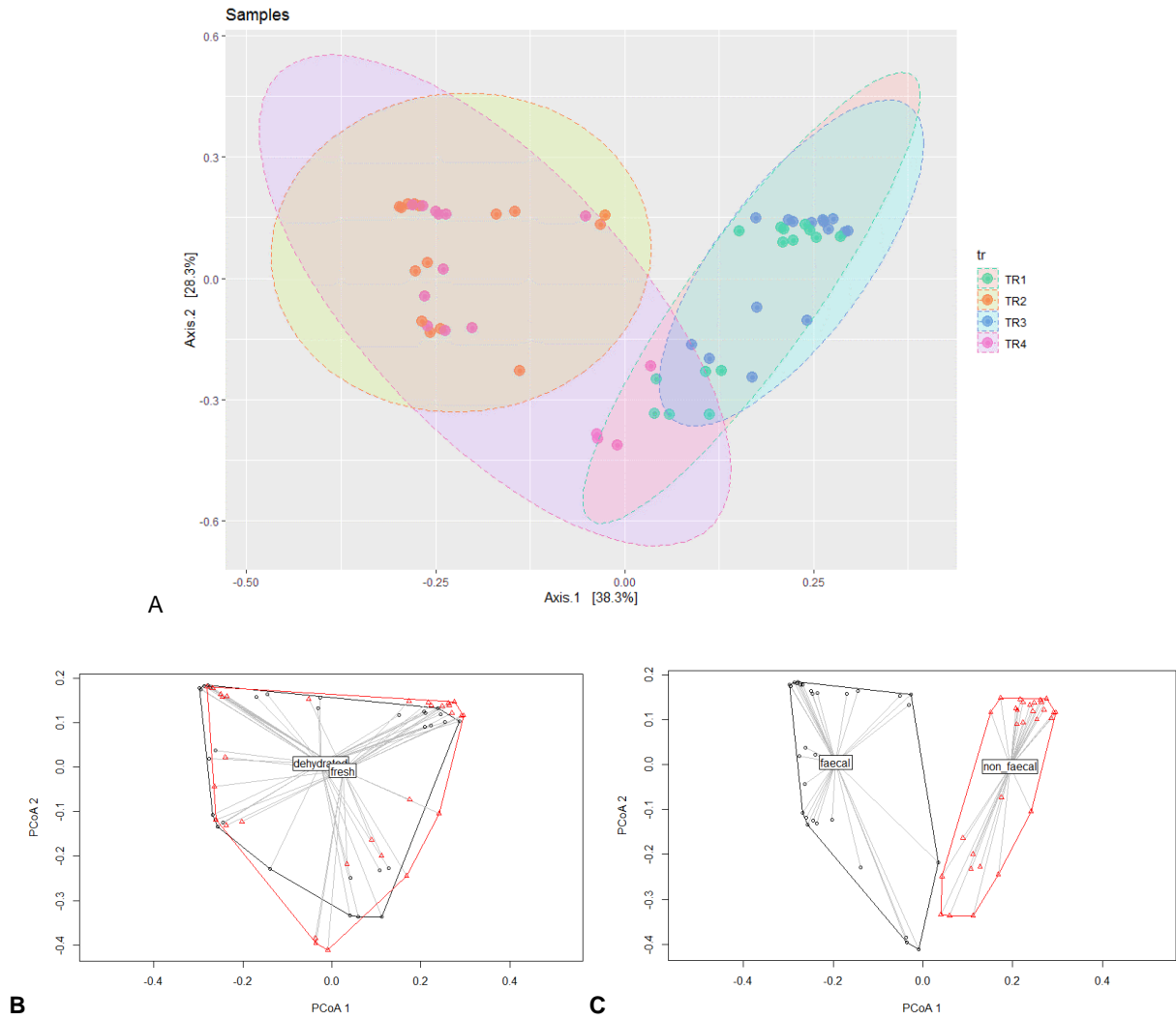


Fig. 4: Principal coordinates analysis (PCoA) plots of the juvenile microbiota based on the Shannon-Jensen Divergence metric. A. PCoA of the samples according to the feeding regime. B-C: PCoA with the function betadisper, distances to group centroid according to the seaweed raw material (B) or the faecal or non-faecal origin (C). Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva spp.*; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva spp.*; TR3. fresh *Ulva spp.*; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva spp.*

Tab. 4: Statistics results on beta-diversity metric (Permanova, permutations=999, p-value threshold 0.05).

Permanova (Adonis 2)							
Variables		Observations (n=)	Df	R <sup>2</sup>	F	p-value	
TR1-2 vs. 3-4	Ulva fresh vs. Ulva dehydrated	60	1	0.05097	3.7595	0.005	
TR2-4 vs. 1-3	Feces vs non-faecal food	60	1	0.24799	23.084	0.001	
TR1,2,3,4	Feeding regime	60	3	0.35719	12.595	0.001	
Betadisper		Anova and Permutest		Anova		Permutest	
Variables		Observations (n=)	Df	F	p-value	F	p-value
TR1-2 vs. 3-4	Ulva fresh vs. Ulva dehydrated	60	1	2.8632	0.09599	2.8632	0.1
TR2-4 vs. 1-3	Feces vs non-faecal food	60	1	4.5328	0.03751	4.5328	0.03
TR1,2,3,4	Feeding regime	60	3	4.7916	0.004844	3.7453	0.01

Composition of the microbial communities of the samples

At the rank phylum, the Proteobacteria and the Bacteroidota dominated the composition of juvenile the microbiota and accumulated more than 75% of the total abundance (suppl. fig. 2). The juvenile microbiota fed with the regime TR1 exhibited highest abundances of Actinobacteria, of Planctomycetota for the juveniles fed with TR2, of Spirochaetota for juveniles fed with TR3, and finally of Desulfobacterota and Deinococcota for the microbiota of juveniles fed with TR4.

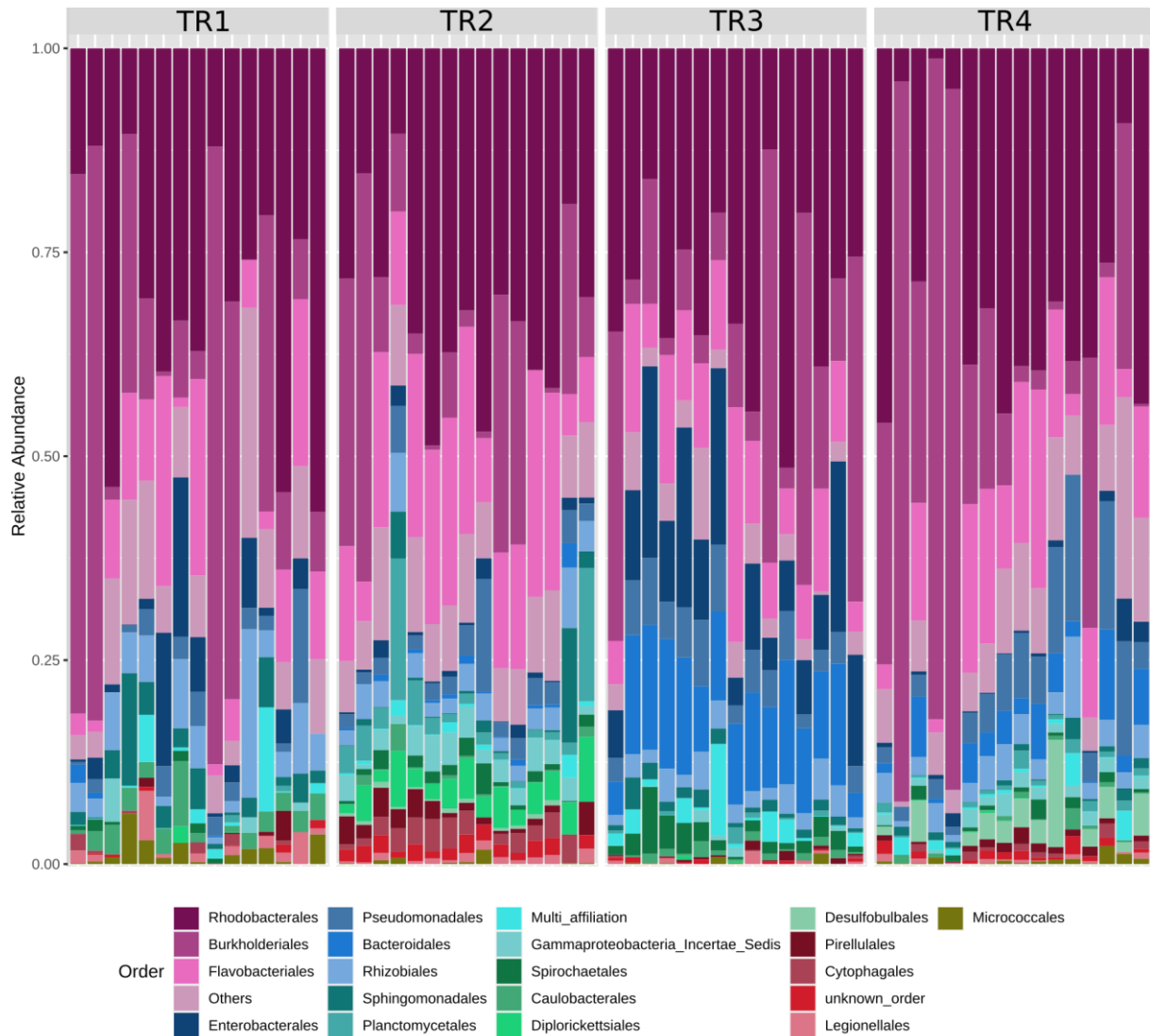


Fig. 5: Relative abundance of the 20 most abundant orders in the juvenile microbiota according to feeding regime (n=15 juveniles per feeding regime). Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva spp.*; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva spp.*; TR3. fresh *Ulva spp.*; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva spp.*

At the rank Order, the bacterial assemblages in juvenile microbiota differed between food regimes (fig. 5). The 4 main abundant orders were the Rhodobacterales (28.7%) the Burkholderiales (22.1%) and the Flavobacteriales (10.8%) and the Pseudomonadales (4.7%) (fig. 5). According to the feeding regimes, some taxa were sur-abundant, such as the Enterobacterales (11%) and the Bacteroidales (11.1%) in



microbiota from juveniles fed with the mixture of fresh maturing *Ulva* spp. (TR3), of Cytophagales (1.95%) and Diplorickettsiales (3.9%) in microbiota from the condition TR2, in Micrococcales (1.5%) in microbiota from condition TR1, and Desulfobulbales (3%) and Bacteroidales (3.67%) in microbiota from juveniles TR4 fed with faeces of juveniles from TR3 conditions. Moreover, the microbiota of juveniles from the condition TR4 exhibited similarities with the microbiota from the other juveniles fed with faeces (orders Pirellulales) and with microbiota from juveniles from the condition TR3 (Pseudomonadales and Bacteroidales), whose faeces were harvested to feed the juveniles TR4. Bacterial composition of other sample types were put in annex (suppl. fig. 3 and 4).

Correlation analysis

The Pearson’s correlation analysis exhibited differences in relative abundance between taxa in the 2 groups, the microbiote of juveniles fed with a non-faecal regime (TR1, TR3), and the microbiota of juveniles fed with the faecal regimes (TR2, TR4) (fig. 6, suppl. Fig 5).

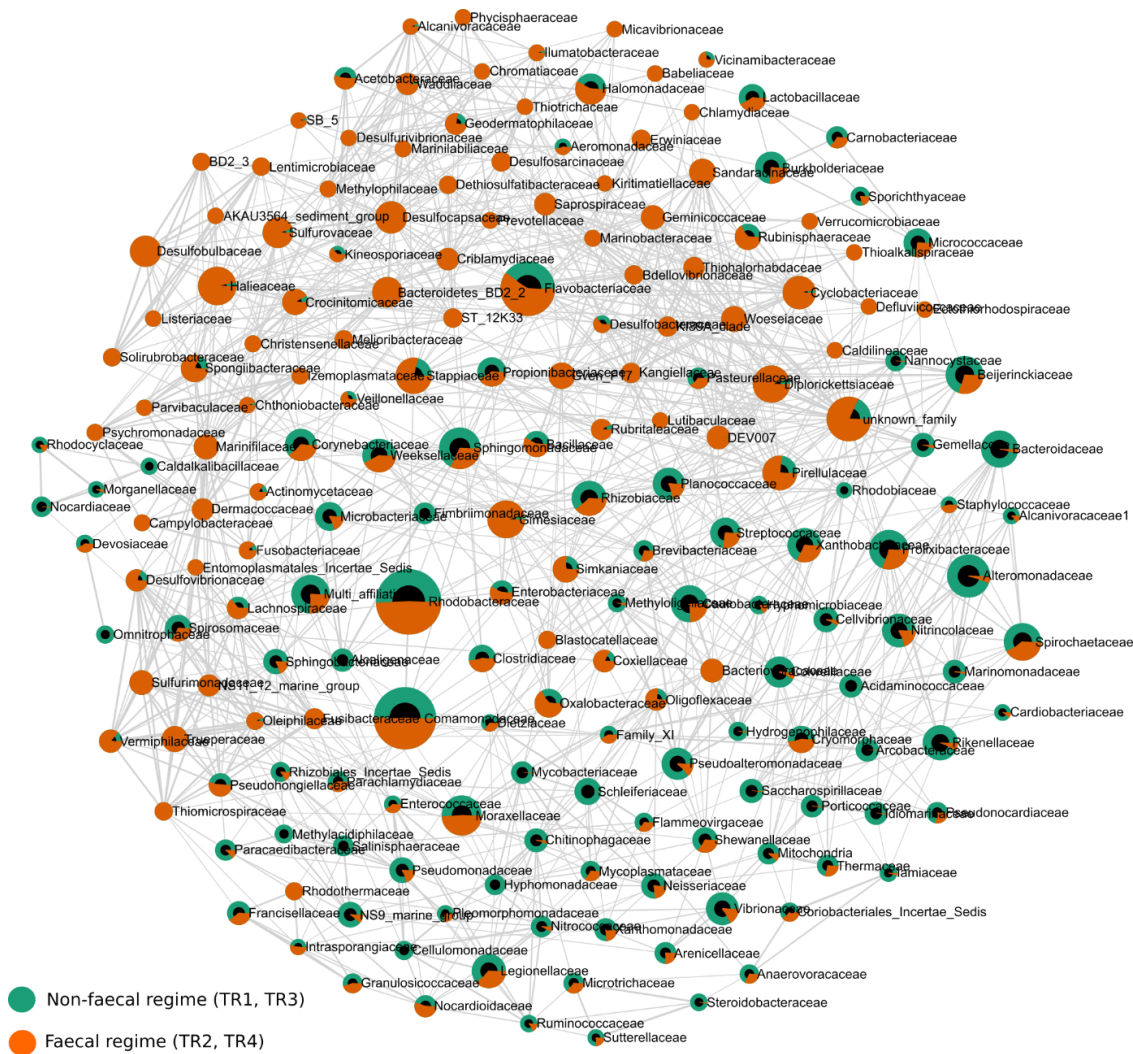


Fig. 6: Correlation analysis according to faecal or non-faecal regimes. MD-index: -0.9103

The most abundant families present in microbiota of the juveniles fed with a faecal regime were highly correlated between them, and on the contrary, abundant families linked with the non-faecal regimes were correlated between them. Patterns in families' abundances and correlations highlighted between the 2 feeding regimes. Families such *Haliaceae*, *Bacteriovoracaceae* and *Desulfobulbaceae* were linked together and correlated with a faecal regime, and the families *Alteromonadaceae*, *Bacteroidaceae* and *Idiomarinaceae* correlated with a non-faecal regime.

### Enrichment analysis of genus according to the feeding regime

The Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) exhibited genera considered as biomarker from each feeding condition. 415 OTUs and 132 genera were considered as biomarker to characterize the microbiota of juveniles fed with faecal or non-faecal food (fig. 7A). The genera such as *Aestuariimonas*, *Ruegeria* or *Lutimonas* were biomarkers for microbiota of juveniles fed with feces (TR2-4). Otherwise, 25 genera and 51 OTUs were designed as biomarker between microbiota of juveniles fed directly or indirectly with dehydrated or fresh *Ulva* (fig. 7B), constituted by marine bacteria for the microbiota of juveniles fed with the regime of fresh maturing *Ulva* mixture TR3-4, or by more common and ubiquitous bacteria for juveniles fed with the regime TR1-2, and referred to the protocol of rehydration of seaweed, such as *Aquicella* or *Lacticaseibacillus*.

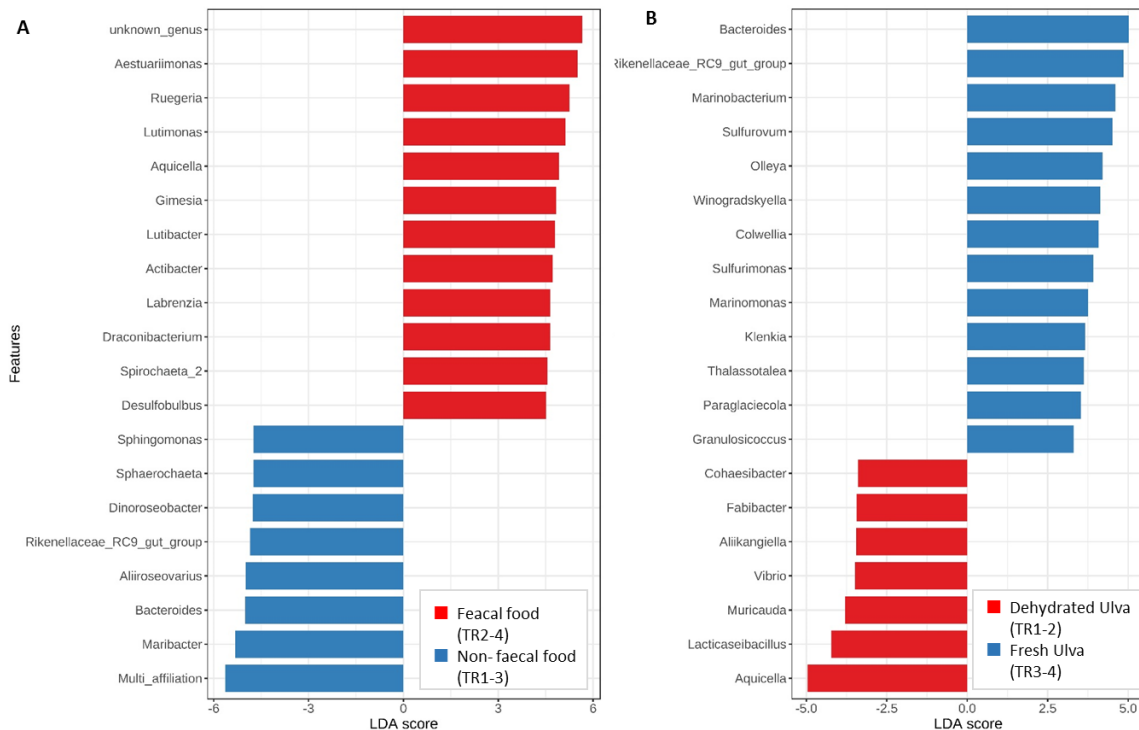


Fig. 7: Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) of juvenile microbiota. 20 most relevant genus. A: Analysis between faecal and non-faecal food (TR2-4 vs. TR 1-3). B: Analysis between dehydrated *Ulva* and fresh *Ulva* as raw material (TR1-2 vs. TR3-4)

### Specificities of the microbiota linked to their feeding regime

Analysis of shared and specific OTUs showed a similar proportion of specific OTUs in each juvenile microbiota (between 29% and 33%), whatever the feeding regime concerned (fig. 8). However, the number of total OTUs and specific OTUs was higher for the juvenile microbiota corresponding to the faecal feeding regime (TR2 and TR4). The total of shared OTUs was 6.5% of the total OTUs observed in all juvenile microbiota (336/5190 OTUs). The highest proportion of shared OTUs was observed for juvenile microbiota of feeding regimes TR2-4 (faecal regimes, 595 common OTUs), and to a lesser extent between feeding regimes TR1 and TR3 (seaweed mixture, 336 common OTUs), validated the previous results.

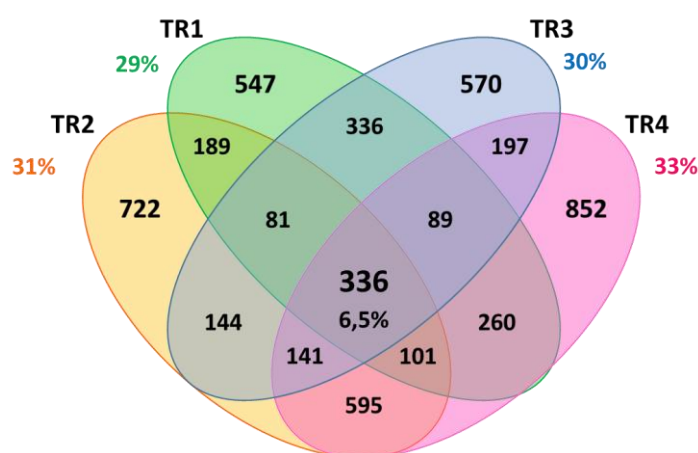


Fig. 8: Venn diagram of shared and specific OTUs. Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva spp.*; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva spp.*; TR3. fresh *Ulva spp.*; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva spp.*

Moreover, comparison of shared OTUs between the juvenile microbiota and the bacterial communities of their environment (tab. 5) showed that the juveniles shared taxa with the 3 environmental compartment that were food, faeces and seawater, validated the horizontal transfer of bacteria.

Tab. 5: Shared OTUs between the juveniles microbiota and their environment. Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva spp.*; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva spp.*; TR3. fresh *Ulva spp.*; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva spp.*

Shared OTUs (number / percentage of juvenile microbiota)	Juvenile TR1 N = 1939 OTUs	Juvenile TR2 N = 2309 OTUs	Juvenile TR3 N = 1894 OTUs	Juvenile TR4 N = 2571 OTUs
Food	26 / 1.3%	223 / 9.7%	56 / 3 %	230 / 8.9%
Faeces	233 / 12%	440 / 19.1%	201 / 10.6%	370 / 14.4%
Seawater	205 / 10.6%	196 / 8.5%	205 / 10.8%	220 / 8.6%

## DISCUSSION

In this study, the feeding regime of juveniles of *H. forskali* was explored. 4 detrital feeding regimes were compared in a 3 month-experiment, based on broostock feeding behaviour, formulated from green algae mixtures or faeces mixtures. A first food was constituted by a mixture of rehydrated *Ulva spp.*, matured for a week (TR1), a second with fesh *Ulva spp.* matured for a week (TR3), a third mixture (TR2) with faeces from juveniles fed with TR1, and the last feeding regime (TR4) with faeces from juveniles TR3. The aim of this work was first to determine a food for the juvenile production of *H. forskali*, on which there was no data, based on the growth experiment, and in a second time, to identify the impact of the feeding regime on juvenile microbiota. A duplicate of 50 juveniles per feeding regime was followed, and finally, 15 juveniles per conditions were sampled for microbiota analysis.

### A detritivorous-based feeding regime for the juveniles of *H. forskali*

First, all the feeding regimes increased the initial biomass weight, with higher growth performances for the juveniles fed with the faecal food (TR2 and TR4), according to the different indicators of growth performance, such as growth rate, weight gain and gain ratio, even if the matured mixture of fresh *Ulva* enhanced good results. The feeding regime TR1, based on matured dehydrated *Ulva sp.* exhibited the worst results. Moreover, the food intake and the production of faeces were better for juveniles fed with a faecal food. These results confirmed first the detritivorous behaviour of *H. forskali* juvenile, like the broodstock that fed on seaweed detritus and other sedimentary deposit (14,16), and faeces of other marine organisms in fish farming (15,55). As deposit feeders, sea-cucumbers were good candidates in integrated multitrophic aquaculture (56–58).

### Distinct microbial compositions

The bacterial composition of the whole-body microbiota of the juveniles varied according to feeding regimes whatever the taxonomic rank chosen, even if the most abundant taxa were the same, such as Proteobacteria, and Rhodobacterales, Burkholderales, Flavobacteriales and Pseudomonadales. The orders Enterobacterales, Bacteroidales, Cytophagales, Diplorickettsiales, Micrococcales, Desulfobulbales and Bacteroidales were the more variable between the different regimes. The differences were more important between juveniles fed with faecal and non-faecal regimes. The correlation analysis validated these observations at the family level.

### A microbiota diversity linked with the feeding regime

The diversity and richness of microbiota varied significantly according to the feeding regimes. Indeed, the higher richness and diversity were observed in microbiota from juveniles fed with a faecal-based

regime, and bacterial communities of juvenile microbiota were different between juveniles fed with a faecal-based food (TR2-4) compared to juveniles fed with the matured seaweed mixtures (TR1-3). Furthermore, the Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) highlighted 415 OTUs as specific biomarker discriminating for microbiota of juveniles fed with a faecal or non-faecal food. Thereby, the zootechnical performances registered were correlated with the feeding regime and the microbiota composition and diversity (19,22), and the best feeding regime were faecal-based food.

### Horizontal transfer of microbiota from food

Thus, the analysis of the whole-body microbiota of the juveniles revealed an exchange between the food source and the microbiota, which could be qualified as horizontal transfer (59). The impact of the source food and the ambient environment (sediment, seawater) influenced the microbiota composition, and mainly the gut microbiota (17,22,32). The bad results in terms of growth performance and of microbiota diversity for juveniles fed with a mixture of matured re-hydrated *Ulva spp.*, compared to fresh *Ulva spp.*, could be explain by the seaweed raw material and the dehydration process. Fresh seaweed contributed to the microbial environmental enrichment, by its own microbiota (60,61), and to the juveniles microbiota by feeding action. The influence of the seaweed microbiota has already been demonstrated on gut microbiota in human (62,63), and on growth performances or digestibility by producing prebiotic compounds (64–66). In the same way, consummation of faeces as food source contributed to the gut microbiota enrichment by microbial horizontal transfer and by transmission of specific bacteria linked to the digestibility and other biological activities (14), as observed in Abalone Farming (67). The growth performance and the microbiota diversity registered for juveniles fed with a faecal-based food validated this hypothesis.

Finally, this preliminary study on feeding behaviour of *H. forskali* juveniles validated the detrital food source of them, promoting growth and microbiota diversity, and probably contributing to the health of the host. To develop a Sea-cucumber farming based on *H. forskali*, a long work on the food have to be done, to optimize the feeding regime, to increase the conversion index and, then, to normalize the process of food production for an semi-industrial farming.

### Acknowledgements and founds

This work was funded by European maritime and fisheries Fund in France (HOLOFARM project, FEAMP - Innovative Aquaculture). Hélène Laguerre was supported by a “Quimper-Bretagne Occidentale” grant for PhD thesis. Thanks to the experimental hatchery of Agrocampus-Ouest (Fouesnant, France) and its team, Grégory Raymond, Morgane Nédélec, Lionel Jardin, Julien Delaporte-Blanc and Aline Brosset, for the supply of larvae and juveniles. Thanks you to Cyril Noël (Sebimer, Ifremer), Christian Miquel and Stéphane Lobreaux (Alpine Ecology Laboratory - LECA, Grenoble Alpes University) for their advice on bioinformatics.

## References

1. Purcell SW, Samyn Y, Conand C. 2012. Commercially important Sea Cucumbers of the World. FAO, Rome.
2. Conand C, Byrne M. 1993. A Review of Recent Developments in the World Sea Cucumber Fisheries. *Mar Fish Rev* 55.
3. Xu D, Su L, Zhao P. 2015. Chapter 21 - *Apostichopus japonicus* in the Worldwide Production and Trade of Sea Cucumbers, p. 383–398. In Yang, H, Hamel, J-F, Mercier, A (eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier.
4. González-Wangüemert M, Domínguez-Godino JA, Cánovas F. 2018. The fast development of sea cucumber fisheries in the Mediterranean and NE Atlantic waters: From a new marine resource to its over-exploitation. *Ocean Coast Manag* 151:165–177.
5. Domínguez-Godino JA, Slater MJ, Hannon C, González-Wangüemert M. 2015. A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: Breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. *Aquaculture* 438:122–128.
6. Marquet N, Conand C, Power DM, Canário AVM, González-Wangüemert M. 2017. Sea cucumbers, *Holothuria arguinensis* and *H. mammata*, from the southern Iberian Peninsula: Variation in reproductive activity between populations from different habitats. *Fish Res* 191:120–130.
7. Rakaj A, Fianchini A, Boncagni P, Scardi M, Cataudella S. 2019. Artificial reproduction of *Holothuria polii*: A new candidate for aquaculture. *Aquaculture* 498:444–453.
8. Boncagni P, Rakaj A, Fianchini A, Vizzini S. 2019. Preferential assimilation of seagrass detritus by two coexisting Mediterranean sea cucumbers: *Holothuria polii* and *Holothuria tubulosa*. *Estuar Coast Shelf Sci* 231:106464.
9. Rakaj A, Fianchini A, Boncagni P, Lovatelli A, Scardi M, Cataudella S. 2018. Spawning and rearing of *Holothuria tubulosa* : A new candidate for aquaculture in the Mediterranean region. *Aquac Res* 49:557–568.
10. Laguerre H, Raymond G, Plan P, Améziane N, Bailly X, Le Chevalier P. 2020. First description of embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea), a new species for aquaculture in the north-eastern Atlantic. *Aquaculture* 521:734961.
11. Santos R, Dias S, Pinteus S, Silva J, Alves C, Tecelão C, Pedrosa R, Pombo A. 2015. Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. *Aquac Res* 47:2307–2323.
12. Roberts J, Jamie J, Cheever E. 2020. Sea Cucumbers 2013-2020 Bibliography <https://doi.org/10.25923/nebs-2p41>.
13. Tuwo A, Conand C. 1992. Reproductive biology of the holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). *J Mar Biol Assoc U K* 72:745–758.
14. David F, Hubas C, Laguerre H, Badou A, Herault G, Bordelet T, Ameziane N. 2020. Food sources, digestive efficiency and resource allocation in the sea cucumber *Holothuria forskali*



- (Echinodermata: Holothuroidea): Insights from pigments and fatty acids. *Aquac Nutr* 26:1568–1583.
15. MacDonald CLE, Stead SM, Slater MJ. 2013. Consumption and remediation of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) waste by the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Aquac Int* 21:1279–1290.
  16. Boncagni P, Rakaj A, Fianchini A, Vizzini S. 2019. Preferential assimilation of seagrass detritus by two coexisting Mediterranean sea cucumbers: *Holothuria polii* and *Holothuria tubulosa*. *Estuar Coast Shelf Sci* 231:106464.
  17. Gao F, Li F, Tan J, Yan J, Sun H. 2014. Bacterial Community Composition in the Gut Content and Ambient Sediment of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Revealed by 16S rRNA Gene Pyrosequencing. *PLoS ONE* 9:e100092.
  18. Plotieau T, Lavitra T, Gillan D, Eeckhaut I. 2013. Bacterial diversity of the sediments transiting through the gut of *Holothuria scabra* (Holothuroidea; Echinodermata). *Mar Biol* 160.
  19. Limborg MT, Alberdi A, Kodama M, Roggenbuck M, Kristiansen K, Gilbert MTP. 2018. Applied Hologenomics: Feasibility and Potential in Aquaculture. *Trends Biotechnol* 36:252–264.
  20. Theis KR. 2018. Hologenomics: Systems-Level Host Biology. *mSystems* 3:e00164-17, /msystems/3/2/msys.00164-17.atom.
  21. Clerissi C, de Lorgeril J, Petton B, Lucasson A, Escoubas J-M, Gueguen Y, Dégremont L, Mitta G, Toulza E. 2020. Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Front Microbiol* 11.
  22. Adewole D, Akinyemi F. 2021. Gut Microbiota Dynamics, Growth Performance, and Gut Morphology in Broiler Chickens Fed Diets Varying in Energy Density with or without Bacitracin Methylene Disalicylate (BMD). *Microorganisms* 9:787.
  23. Butt RL, Volkoff H. 2019. Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Front Endocrinol* 10:9.
  24. Wang AR, Ran C, Ringø E, Zhou ZG. 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev Aquac* 10:626–640.
  25. Sha Y, Liu M, Wang B, Jiang K, Sun G, Wang L. 2016. Gut bacterial diversity of farmed sea cucumbers *Apostichopus japonicus* with different growth rates. *Microbiology* 85:109–115.
  26. Keating C, Bolton-Warberg M, Hinchcliffe J, Davies R, Whelan S, Wan AHL, Fitzgerald RD, Davies SJ, Ijaz UZ, Smith CJ. 2021. Temporal changes in the gut microbiota in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) outweigh the response to diet supplementation with macroalgae. *Anim Microbiome* 3:7.
  27. Schmitt S, Weisz JB, Lindquist N, Hentschel U. 2007. Vertical Transmission of a Phylogenetically Complex Microbial Consortium in the Viviparous Sponge *Ircinia felix*. *Appl Environ Microbiol* 73:2067–2078.
  28. Carrier TJ, Macrander J, Reitzel AM. 2018. A microbial perspective on the life-history evolution of marine invertebrate larvae: If, where and when to feed. *Mar Ecol* 39.
  29. Carrier TJ, Reitzel AM. 2020. Symbiotic Life of Echinoderm Larvae. *Front Ecol Evol* 7:509.

30. León-Palmero E, Joglar V, Álvarez PA, Martín-Platero A, Llamas I, Reche I. 2018. Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PLOS ONE* 13:e0196178.
31. Altamirano JP, Recente CP, Rodriguez JC. 2017. Substrate preference for burying and feeding of sandfish *Holothuria scabra* juveniles. *Fish Res* 186:514–523.
32. Simon CJ, Truong HH, Noble TH, Osborne SA, Wynne JW, Wade NM. 2020. Microbial biomass, marine invertebrate meals and feed restriction influence the biological and gut microbiota response of shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 520:734679.
33. Demeuldre M, Chinh Ngo T, Hennebert E, Wattiez R, Leclère P, Flammang P. 2014. Instantaneous adhesion of Cuvierian tubules in the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Biointerphases* 9:029016.
34. Vandenspiegel D, Jangoux M. 1987. Cuvierian tubules of the holothuroid *Holothuria forskali* (Echinodermata): a morphofunctional study. *Mar Biol* 96:263–275.
35. Astall CM, Jones MB. 1991. Respiration and biometry in the sea cucumber *Holothuria forskali*. *J Mar Biol Assoc U K* 71:73–81.
36. Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press.
37. Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2015. OBITools: a Unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour* 10.1111/1755-0998.12428.
38. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294.
39. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2:e593.
40. Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461.
41. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584.
42. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421.
43. R Core Team. 2021. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
44. McMurdie PJ, Holmes S. 2013. *phyloseq*: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8:e61217.
45. Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed. Springer International Publishing.
46. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2019. *vegan*: Community Ecology Package.

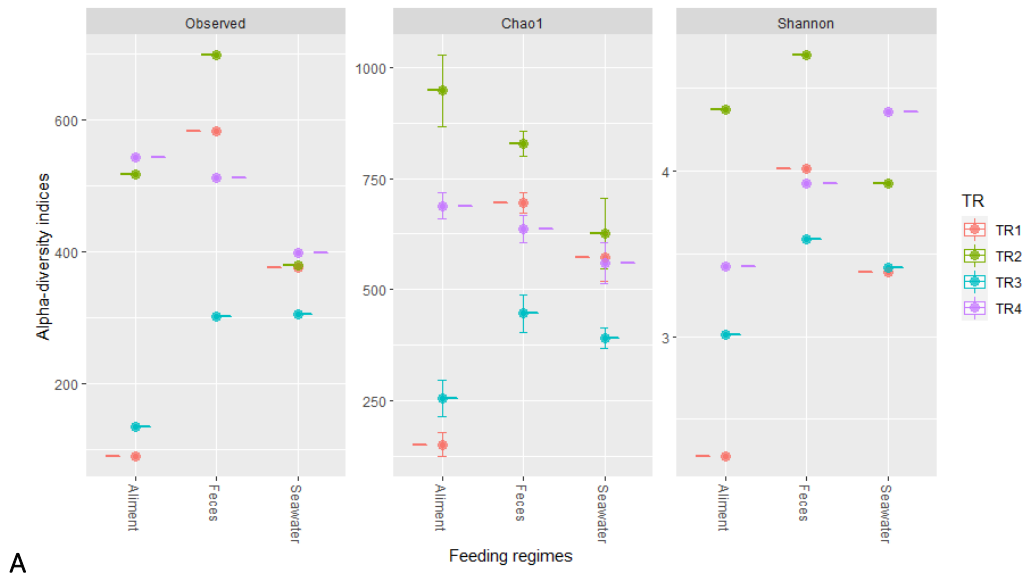


47. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. 2020. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc* 15:799–821.
48. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. 2017. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res* 45:W180–W188.
49. Anderson MJ. 2017. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA), p. 1–15. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. American Cancer Society.
50. Anderson MJ, Ellingsen KE, McArdle BH. 2006. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecol Lett* 9:683–693.
51. O’Neill M, Mathews K. 2002. Theory & Methods: A Weighted Least Squares Approach to Levene’s Test of Homogeneity of Variance. *Aust N Z J Stat* 42:81–100.
52. Stier AC, Geange SW, Hanson KM, Bolker BM. 2013. Predator density and timing of arrival affect reef fish community assembly. *Ecology* 94:1057–1068.
53. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12:R60.
54. Saito K, Koido S, Odamaki T, Kajihara M, Kato K, Horiuchi S, Adachi S, Arakawa H, Yoshida S, Akasu T, Ito Z, Uchiyama K, Saruta M, Xiao J, Sato N, Ohkusa T. 2019. Metagenomic analyses of the gut microbiota associated with colorectal adenoma. *PLOS ONE* 14:e0212406.
55. Li M, Callier MD, Blancheton J-P, Galès A, Nahon S, Triplet S, Geoffroy T, Menniti C, Fouilland E, Roque d’orbcastel E. 2019. Bioremediation of fishpond effluent and production of microalgae for an oyster farm in an innovative recirculating integrated multi-trophic aquaculture system. *Aquaculture* 504:314–325.
56. Grosso L, Rakaj A, Fianchini A, Morroni L, Cataudella S, Scardi M. 2021. Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system combining the sea urchin *Paracentrotus lividus*, as primary species, and the sea cucumber *Holothuria tubulosa* as extractive species. *Aquaculture* 534:736268.
57. Barrington K, Chopin T, Robinson S. 2009. Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters, p. 7–46. In *Integrated Mariculture: A Global Review*.
58. Zamora L, Yuan X, Carton A, Slater M. 2016. Role of deposit-feeding sea cucumbers in integrated multitrophic aquaculture: Progress, problems, potential and future challenges. *Rev Aquac* 10:57–74.
59. Sylvain, FÉ., Derome, N. Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Sci Rep* 7, 5263 (2017).
60. Bonthond G, Bayer T, Krueger-Hadfield SA, Barboza FR, Nakaoka M, Valero M, Wang G, Künzel S, Weinberger F. 2020. How do microbiota associated with an invasive seaweed vary across scales? *Mol Ecol* 29:2094–2108.
61. Ghaderiardakani F, Quartino ML, Wichard T. 2020. Microbiome-Dependent Adaptation of Seaweeds Under Environmental Stresses: A Perspective. *Front Mar Sci* 7:1111.
62. Shannon E, Conlon M, Hayes M. 2021. Seaweed Components as Potential Modulators of the Gut Microbiota. *7. Mar Drugs* 19:358.

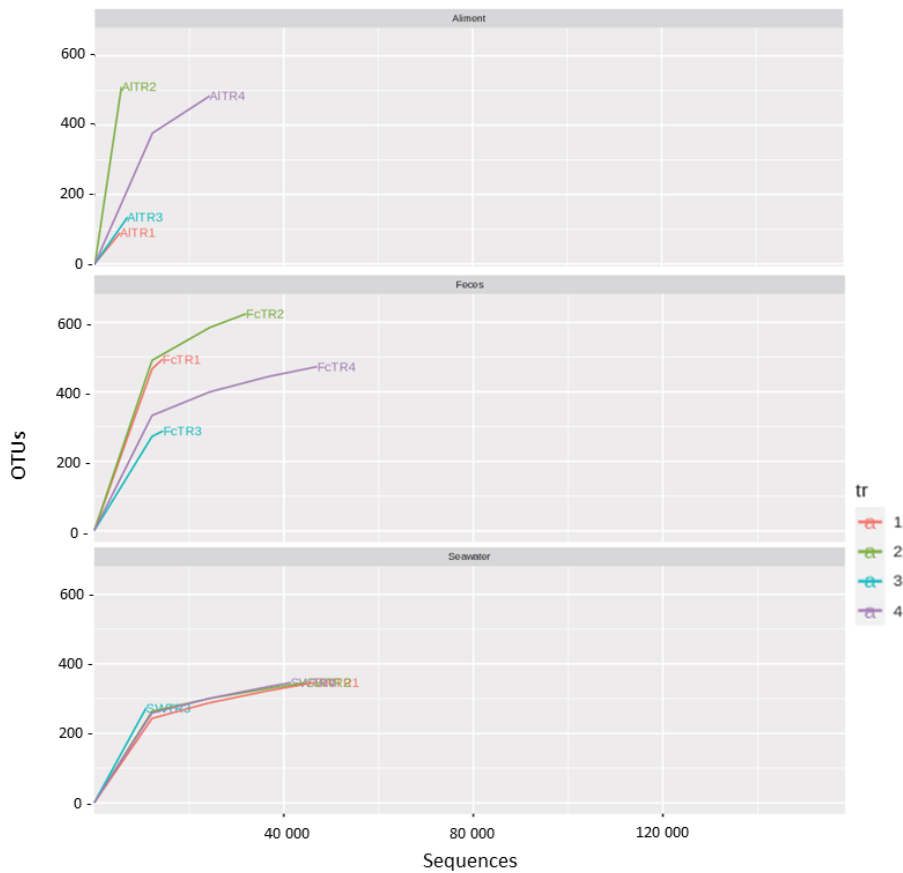
63. Pudlo NA, Pereira GV, Parnami J, Cid M, Markert S, Tingley JP, Unfried F, Ali A, Campbell A, Urs K, Xiao Y, Adams R, Martin D, Bolam DN, Becher D, Schmidt TM, Abbott DW, Schweder T, Hehemann JH, Martens EC. 2020. Extensive transfer of genes for edible seaweed digestion from marine to human gut bacteria.
64. Lopez-Santamarina A, Miranda JM, Mondragon A del C, Lamas A, Cardelle-Cobas A, Franco CM, Cepeda A. 2020. Potential Use of Marine Seaweeds as Prebiotics: A Review. *Molecules* 25:1004.
65. Charoensiddhi S, Abraham RE, Su P, Zhang W. 2020. Seaweed and seaweed-derived metabolites as prebiotics. *Adv Food Nutr Res* 91:97–156.
66. Reilly P, O'Doherty JV, Pierce KM, Callan JJ, O'Sullivan JT, Sweeney T. 2008. The effects of seaweed extract inclusion on gut morphology, selected intestinal microbiota, nutrient digestibility, volatile fatty acid concentrations and the immune status of the weaned pig. *animal* 2:1465–1473.
67. Gobet A, Mest L, Perennou M, Dittami SM, Caralp C, Coulombet C, Huchette S, Roussel S, Michel G, Leblanc C. 2018. Seasonal and algal diet-driven patterns of the digestive microbiota of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a generalist marine herbivore. *Microbiome* 6:60.

Supplementary materials

Suppl. fig 1: Alpha-diversity analysis of the bacterial communities in food, seawater faeces, according to feeding regimes. A: Alpha diversity indices. B: Rarefaction curves. Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva spp.*; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva spp.*; TR3. fresh *Ulva spp.*; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva spp.*

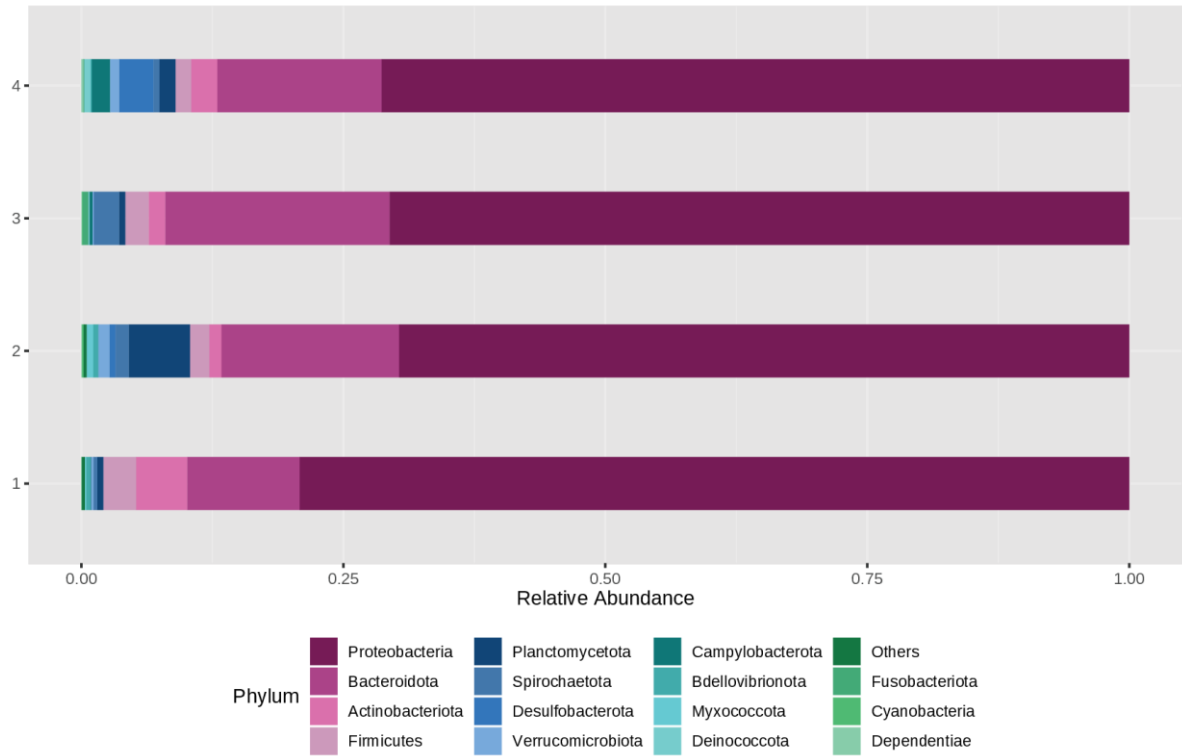


A

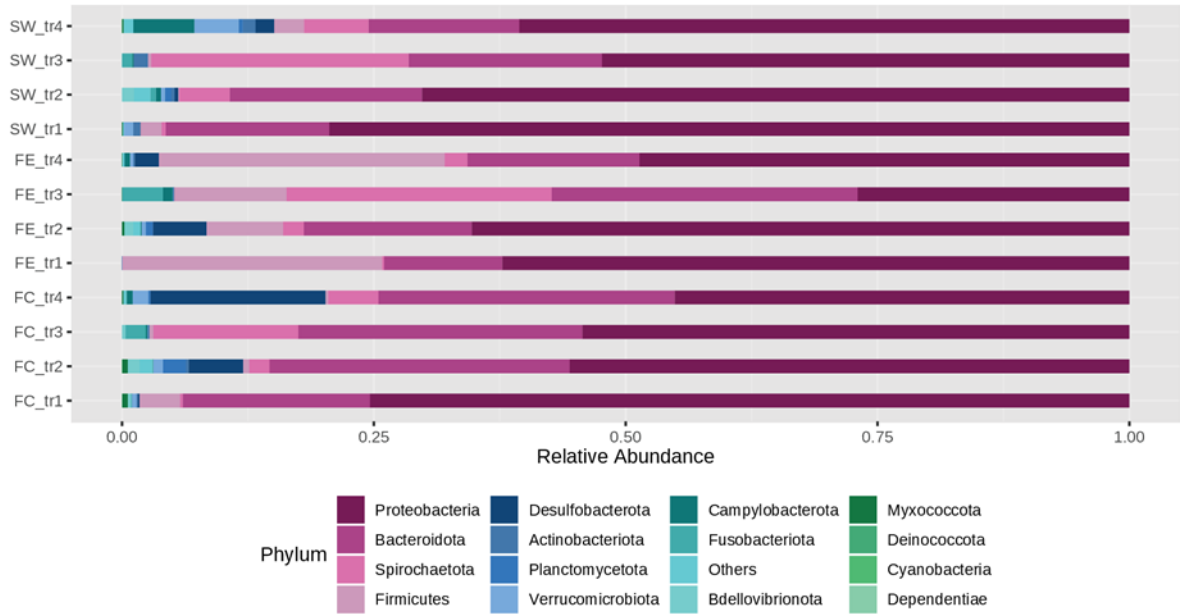


B

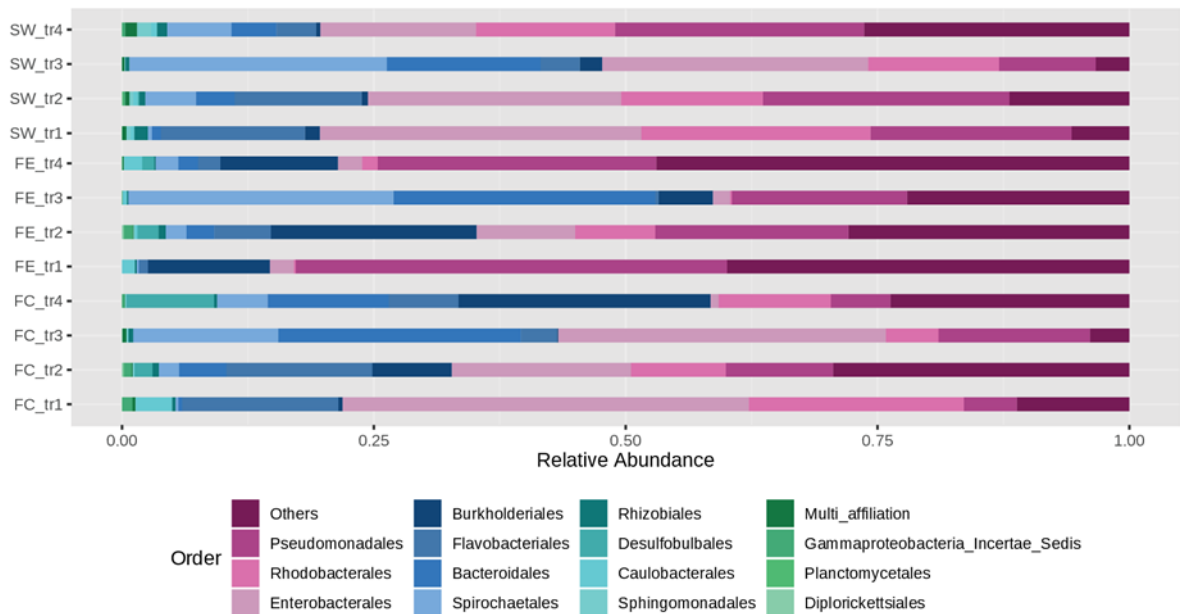
Suppl. fig 2: Relative abundance of the 16 most abundant phyla in the juvenile microbiota according to feeding regime. Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva* spp.; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva* spp.; TR3. fresh *Ulva* spp.; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva* spp.



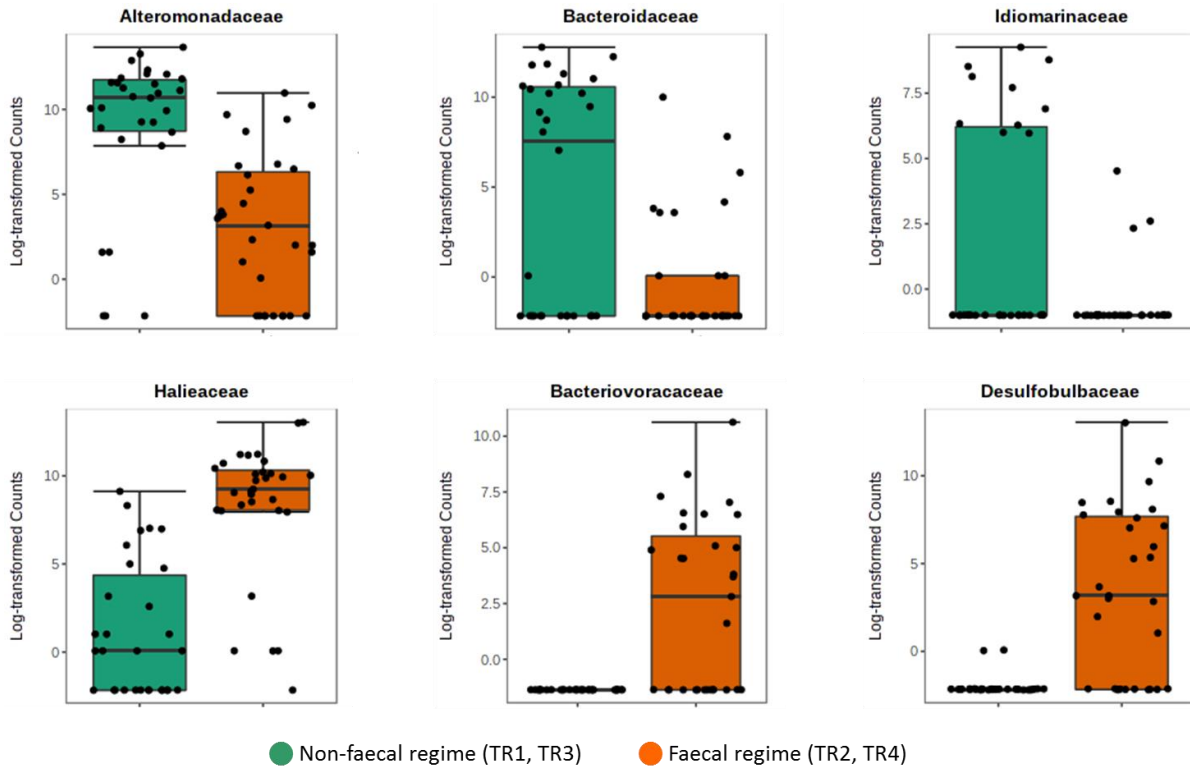
Suppl. fig 3: Relative abundance of the 16 most abundant phyla of the bacterial communities in food, seawater faeces, according to feeding regimes. Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva* spp.; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva* spp.; TR3. fresh *Ulva* spp.; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva* spp.



Suppl. fig 4: Relative abundance of the 16 most abundant orders of the bacterial communities in food, seawater faeces, according to feeding regimes. Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva* spp.; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva* spp.; TR3. fresh *Ulva* spp.; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva* spp.



Suppl. fig 3: Relative abundance of Families correlated with a faecal or non-faecal regime. Experiment code: TR1. dehydrated *Ulva* spp.; TR2. faeces of juveniles fed with dehydrated *Ulva* spp.; TR3. fresh *Ulva* spp.; TR4. faeces of juveniles fed with fresh *Ulva* spp.



## 5.3 Conclusion du chapitre et perspectives

*H. forskali* est une espèce dont le régime alimentaire est décrit comme dépositivore-détritivore chez les stades adultes. La comparaison du microbiote total et des performances de croissance de juvéniles de *H. forskali* soumis à différents régimes alimentaires a permis d'obtenir des informations quant au comportement alimentaire de ceux-ci. Il avait été observé en captivité que des holothuries pouvaient ré-ingérer leurs fèces, ce qui a été confirmé également chez les juvéniles. Les régimes alimentaires à base de détritrus algaux et de fèces ont donné de bons résultats zootechniques, avec toutefois des meilleures croissances chez les juvéniles alimentés à partir de fèces de juvéniles eux-mêmes nourris avec des algues maturées. Ces résultats se sont également traduits par des modifications des microbiotes en fonction des régimes alimentaires testés, et par la présence de taxons spécifiques.

Les résultats montrent donc la plasticité du microbiote chez les juvéniles, et l'existence d'une transmission horizontale par coprophagie.

Des nouveaux tests devront être conduits afin de valider et affiner ces résultats, mais également pour normaliser l'aliment choisi dans un objectif de développement aquacole.

## **Chapitre 5**

Composition du microbiote de *H. forskali* présentant des symptômes apparentés au SKUD (Skin Ulceration Disease)





## 6. Composition du microbiote de *H. forskali* présentant des symptômes apparentés au SKUD (Skin Ulceration Disease)

### 6.1 Préambule

En aquaculture, la détection et l'identification des agents pathogènes est une priorité. La connaissance de ceux-ci et des maladies associées permet de mettre en place des protocoles de prophylaxie, et ainsi, garantir une sécurité zoosanitaire aux élevages.

Chez les holothuries, de nombreuses maladies et parasites ont été décrites chez les espèces élevées et commercialisées en Indo-Pacifique. La plus importante d'entre elles est le syndrome SKUD (syndrom of skin ulceration disease), qui se caractérise par l'apparition de points blancs sur le derme évoluant vers des plaies nécrosantes et la mort de l'animal.

Dans le cadre de la domestication d'une nouvelle espèce, il est nécessaire d'anticiper et de rechercher des candidats pathogènes.

Dans ce chapitre, nous avons tenté d'étudier, par Metabarcoding 16S, le microbiote d'individus de *H. forskali* présentant des symptômes apparentés au SKUD, et d'identifier de potentiels candidats pathogènes.

Lors de constatation de l'apparition de nécroses sur l'épiderme des holothuries, des prélèvements ont été opérés chez les partenaires du projet Holofarm (Agrocampus Ouest, Muséum National d'Histoire Naturelle / Station de Concarneau, AQUA-B).

Il s'agit d'un chapitre prospectif sur la recherche de candidats pathogènes, décrit sous la forme d'un draft de publication.

## 6.2 Publication 5 (Draft)

### Microbiota composition of *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea) exhibiting signs of Skin Ulceration

Laguerre Hélène<sup>1</sup>, Noël Cyril<sup>2</sup>, Jegou Camille<sup>1</sup>, Fleury Y. <sup>1</sup>, Le Chevalier P. <sup>1</sup>

1. University of Brest, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, F-29334 Quimper, France
2. IFREMER-IRSI-Service de Bioinformatique (SeBiMER), 1625 Route de Sainte-Anne, 29280 Plouzané

---

#### Summary

The detection of emergent pathogenic agents was an important step for domestication of new species. The European sea-cucumber *H. forskali* was a new targeted species and first breeding assays in captivity revealed the emergence of disease, revealed by the development of depigmented area in the skin, skin ulcers and necrosis, linked with a decrease of the animal activity and an anormal production of mucus. These symptoms were associated with the Skin Ulceration Syndrome Disease (SKUD) of the sea-cucumber. The 16S Metabarcoding analysis realised on the microbiota of healthy and diseased animals highlighted a relevant modification of the composition and diversity in both the coelomic and the skin microbiota of *H. forskali* broodstock and also of the whole body microbiota of juveniles. The disease provoked an increase of the Proteobacteria, and more precisely of the Comamonadaceae, the Xanthomonadaceae and the Flavobacteriaceae. The bacterial communities of the sick samples of microbiota were less diverse linked with a dysbiosis and the development of pathogenic and opportunistic bacteria. The exploration of the taxa with differential abundances analysis and prevalent parameters exhibited several abundant genera such as genus *Psychrobium*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Shewanella* and *Tenacibaculum*. The genus *Tenacibaculum*, responsible for massive mortality in fish farming, was present and abundant in the direct environment and the microbiota of sick animals, and thus constituted the principal potential pathogenic candidate for the SKUD in *H. forskali*. This first study on *H. forskali* disease validated the 16S metabarcoding approach as prospective tool for detection of emergent disease in aquaculture.

**Key-words:** Microbiota, *Holothuria forskali*, Echinodermata, sea-cucumber, 16S metabarcoding, pathogenic bacteria, skin ulceration syndrome disease (SKUD), aquaculture, *Tenacibaculum*.

## INTRODUCTION

In aquaculture, the prophylaxis was a major and increasing concern linked with the domestication of new species of with the intensive production. The infectious episodes could lead to massive mortality in aquaculture farming, and thus significant reductions in production generating economic losses (1–3). Several pathogenic agents were at the origin of epizootics, mainly bacteria, fungi, viruses or protozoa. Among them, the ubiquitous genus *Vibrio* was often associated with disease in aquaculture (4), such as *Vibrio splendidus*, *Vibrio harveyi* (5,6), *Vibrio aestuarianus* (7), or *Vibrio tapetis* (8,9) responsible for epizootics in shellfish farming, or *Vibrio salmonicida* in salmon farming (10), causing hemorrhagic septicemia, *Vibrio anguillarum* in fish farming(11,12), and *Vibrio parahaemolyticus* (13) incriminated in diverse production and recently in shrimp production as causative agent of the hepatopancreatic necrosis disease. Another pathogenic genus was *Yersinia*, responsible for the Enteric redmouth disease causing massive fish mortalities in salmonid farming (14,15), or the genus *Flavobacterium* (16,17). Otherwise, development of the NGS technologies and indeed of the microbiota studies made it possible to understand the link between microbiota dysbiosis and disease, first in human (18,19) in agriculture species (20), and more recently in echinoderms, were bacteria responsible for the sea-star Wasting Disease were identified, especially the genera *Polaribacter* and *Phaeobacter* (21). In sea-cucumber farming, identification of pathogenic agents was already explored in the most commercially important species such as *Apostichopus japonicus* or *Holothuria scabra* (22,23), and more recently in European species (24,25). The skin ulceration syndrome disease (SKUD) was the most reported pathology in sea-cucumber farming (26), which was manifested by skin dermatosis and appearance of white spots on the animal dermis, leading to a septicemia and the death of the animals. Several pathogenic bacteria were incriminated, among them the genera and species *Pseudoalteromonas sp.* and *Pseudoalteromonas tetradonis* (27), *Vibrio splendidus*, *V. harveyi*, *Flavobacterium spp.*, or *Tenacibaculum spp.* (28,29). In Europe, sea-cucumber aquaculture was developing rapidly (30–32), with new interest species such as *H. forskali*. Few studies have focused on this species, in aquaculture studies (30,33,34), feeding regimes (35), biology (36–39) or in its microbiota (40). First domestication assays in captivity succeed, but there were still many important missing knowledge, especially on disease in this temperate species of Sea-cucumber. In this study we aimed to identify pathogenic bacteria potentially responsible for disease in *H. forskali*, by metabarcoding 16S technology. A focus on anatomical compartments linked with the disease or with immunity has been chosen: the skin, exhibiting signs of SKUD, and the coelomic fluid, key compartment of immunity in echinoderms (3,41,42). Thereby, sick animals, presenting skin dermatosis, were sampled in aquaculture structures, as well as environmental samples and healthy samples, and analysed using Illumina MiSeq technologies.

## Material and methods

### Samples collection

A collection of samples from healthy and sick animals were constituted (n= 37 samples). Different anatomical and environmental compartment were sampled (tab. 1). A collection was constituted with healthy and sick broodstock from the experimental station of the National Museum of Natural History (MNHN, Concarneau, France), where individuals exhibited signs of the skin ulceration disease (SKUD) (fig. 1).

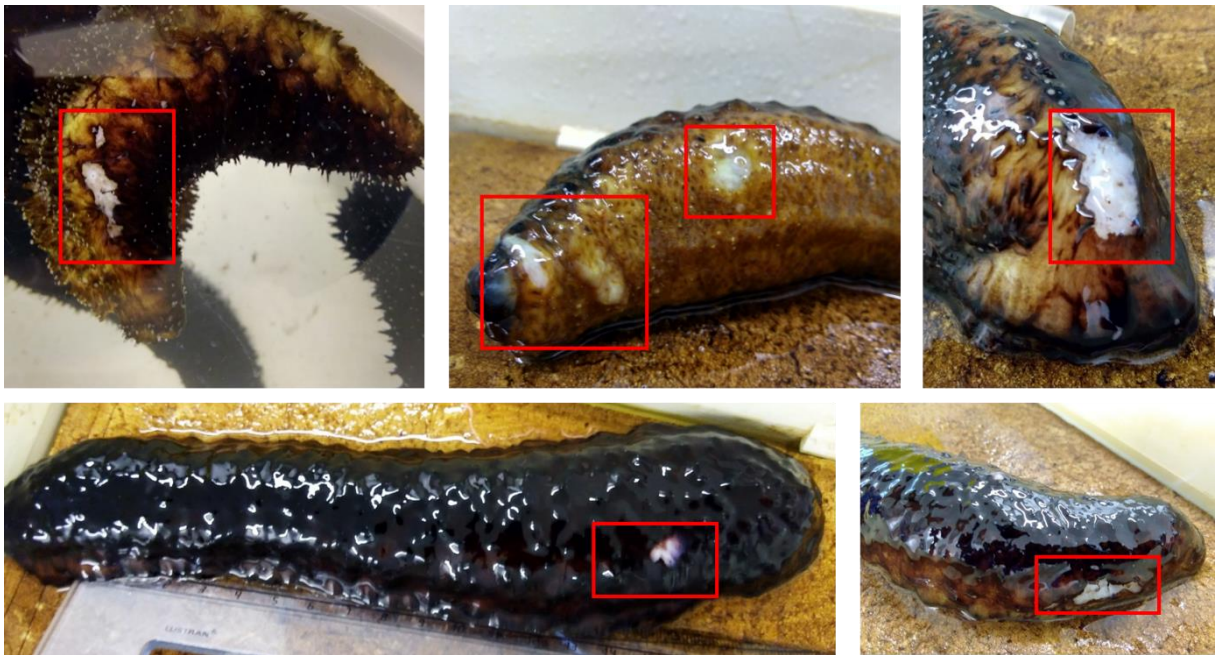


Fig. 1: individuals of *H. forskali* exhibited signs of SKUD. Ulcers were signaled with a red square.

Then, a collection of housed-juveniles were composed with healthy and sick juveniles presenting an epidermal depigmentation, breeding in the SME AQUA-B (Lesconil, France). Finally, wild broodstock, considered as healthy, were collected by scuba diving in the Port of Brezellec (WGS84: 48°4'15.48''N and 04°39'44.98''W), located at the Western tip of Brittany (France). The skin microbiota, the mucosal secretions found in proximity to the sick animals, and the tank biofilm were sampled with a sterile swab. The seawater was directly collected with a 15 mL centrifuge tube. The coelomic microbiota was collected with a 25G needle and a 2.5mL sterile syringe by insertion through the body wall in the ventral side of the sea-cucumber. Finally, juveniles were twice rinsed with artificial sterilized seawater, transferred in 15 mL centrifuge tube and directly frozen. All the samples were stored on ice before processing. All the samples, except juveniles, were then centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes. Supernatants were removed and the pellets were then stored at -20°C before further analysis.

Tab. 1: description of the samples collection of sick sea-cucumbers.

Collection	Health status	Date	Description	Samples (n= 37)
MNHN Broodstock	sick	November, 2019	Herd of housed broodstock presenting the skin ulceration syndrome disease	Tank biofilm (n=3), coelomic (n=3) and skin (n=6) microbiota, mucosal secretions (n=2), seawater (n=4)
Captivity	healthy	June, 2019	Herd of housed broodstock considered as healthy	coelomic microbiota (n=5), seawater (n=2)
AQUA-B, Juveniles	sick	June, 2020	Dying juveniles (one-year old) exhibited epidermal depigmentation	whole-body microbiota (n=2)
Captivity	healthy		Healthy juveniles (one-year old)	whole-body microbiota (n=5)
Brezellec Wild Broodstock	healthy	April, 2019	Healthy broodstock	Skin microbiota (n=5)

### Genomic DNA extraction and sequencing

Tubes containing juveniles were first put in liquid nitrogen for 30 seconds, and then, juveniles were cut separately in slices with a scalpel blade. Juveniles samples were then incubated in 1.5 mL Inhibitex® buffer (from the Qiagen DNA Stool mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) at 95°C for 5 minutes. Tubes were then centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes and supernatant were used for extraction.

Genomic DNA from all the samples was extracted with the Qiagen DNA Stool mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with minor modifications (an initial step at 95°C to improve lysis of Gram-positive bacteria). Samples of DNA were then amplified at the AnaEE Platform (Grenoble, France) in 4 replicates and negative controls were added for the randomised PCR. The barcoded primers used for amplification were Bact02F (5'-GCCAGCMGCCGCGTAA -3') and rBact02R (5'-GGACTACCMGGGTATCTAA -3') targeting the V4 Region of the 16S rDNA gene, according to the Metafast protocol (43). Sequencing was then performed with the technology Illumina MiSeq (2x250 pb) by Fasteris (Geneva, Switzerland).

### Pre-processing on sequencing data

After quality control and trimming on sequences, sequences were assigned to samples with ngsfilter from the ObiTools (44) and then processed using Frogs 3.1.0 (45,46) available in the Galaxy server Genouest: R1 and R2 sequences were merged by pairs, chimera were removed with VSearch (47,48), and sequences were clustered with Swarm (with a distance for aggregation of 3) (46). Finally, singletons and low abundance sequences (minimum abundance threshold <106) were filtered and removed from data and remaining sequences were taxonomically assigned as OTUs (Operational taxonomic Units) with

BLAST (49) and the SILVA 138 (pintail 100) database. Contaminant OTUs present in control samples (blanks, DNA extraction kit and lab reagents) were filtered and removed, if their relative abundance reached more than 1% (50).

### Statistical analysis

The data (count table, OTUs table and samples data) were loaded in R (51) as a *phyloseq* object to analyse and compare the bacterial communities of the healthy and sick samples of *H. forskali* with the packages *phyloseq* (52). Alpha diversity indices were first calculated (observed richness and Shannon's diversity indices) and the means were compared according to the variable "health status" with the non-parametric test of Kruskal-Wallis (p-value threshold 0.05). After compositional transformation of the OTUs table, the beta-diversity analysis based on the Jensen - Shannon Divergence metrics and the PCoA was plotted with *phyloseq* on R. A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA, 999 permutations) was done with the function *Adonis2* (53,54) on this distance matrix to compare the variability of microbial composition with the R package *vegan* (55), and an analysis of the sample dispersion to the group centroids was carried out with the function *Betadisper*, *permutest* (Permutation test for homogeneity of multivariate Dispersions, 999 permutations) and *ANOVA* (58,59). The composition of the bacterial communities of the healthy and sick samples were explored with Excel to identify the potential pathogenic taxa, and with the web platform Microbiome Analyst for taxa abundance comparison (taxonomic levels: phylum and family) and the heatmap clustering (distance measure: Euclidean, Clustering algorithm: Ward) (<https://www.microbiomeanalyst.ca>) (58,59).

After a total sum scaling of the data, a Linear discriminant analysis (LDA) effect size (*LEfSe*) was conducted at the Genus rank on the platform Microbiome Analyst to identify key taxa (adjusted p-value cutoff: 0.1; log LDA score:2) (58,61), based on differences between communities, and coupling different statistical analysis on abundance and effect size. Otherwise, the shared OTUs between the sick microbiota were drawn in a Venn diagram with the count table. Finally, the taxa identified as potential pathogenic agents in sea-cucumber disease in the literature (26–29,62) and in this present study were searched in the count table, and only OTUs present exclusively in sick samples and were selected.

## RESULTS

### Sequencing results

In total, 37 samples have been sequenced with the Illumina MiSeq technology, distributed in 17 samples “healthy” and 20 “sick” samples, and representing respectively 3,296,087 and 2,379,119 merged sequences (tab. 2). After filtering and cleaning sequencing data, the 1,038,001 remaining sequences from healthy samples were clustered and affiliated in 2,653 OTUs, and the 708,297 remaining sequences of the sick samples in 2,644 OTUs. In total, 4,177 OTUs has been constituted. The mean library size varied according to the sample type, between a mean of 16,540 sequences for the contaminated seawater samples and 85,665 sequences for healthy water. Globally, the library size was higher for samples assigned to a “healthy” status, but the number of OTUs similar.

Tab. 2: Sequencing results of microbiota metabarcoding.

Compartment	n samples	Preprocess data	Data for statistical analysis		
		paired-end assembled	total sequences	mean library depth	OTUs
<b>Healthy</b>	<b>17</b>	<b>3 296 087</b>	<b>1 038 001</b>	<b>61 059</b>	<b>2 653</b>
Coelomic fluid	5	970 663	318 555	63 711	934
Skin	5	943 174	305 004	61 001	1 192
Seawater	2	450 116	171 329	85 665	658
Whole-body / juveniles	5	932 134	243 113	48 623	716
<b>Sick</b>	<b>20</b>	<b>2 379 119</b>	<b>708 297</b>	<b>35 415</b>	<b>2 644</b>
Coelomic fluid	3	313 186	106 921	35 640	745
Mucus	2	188 143	82 043	41 022	858
Skin	6	784 416	273 920	45 653	1 069
Seawater	4	546 482	66 159	16 540	227
Tank biofilm	3	321 853	120 125	40 042	790
Whole-body / juveniles	2	225 039	59 129	29 565	342
<b>TOTAL</b>	<b>37</b>	<b>5 675 206</b>	<b>1 746 298</b>	<b>47 197</b>	<b>4 177</b>

### Diversity analysis

The comparison of richness and diversity of healthy and sick associated- samples exhibited differences the sample types (fig. 2A), but differed significantly between healthy and sick samples only for skin microbiota (tab. 3) and in bacterial community of seawater (not shown). Moreover, the beta-diversity analysis demonstrated the divergence between the bacterial communities according to the sample type and the health status (*i.e* coelomic microbiota and skin microbiota of broodstock and whole-body microbiota of juvenile, fig. 2 B, tab. 4). The bacterial communities of the whole-body microbiota of the juveniles were more distinct from the coelomic and skin microbiota of the broodstock.



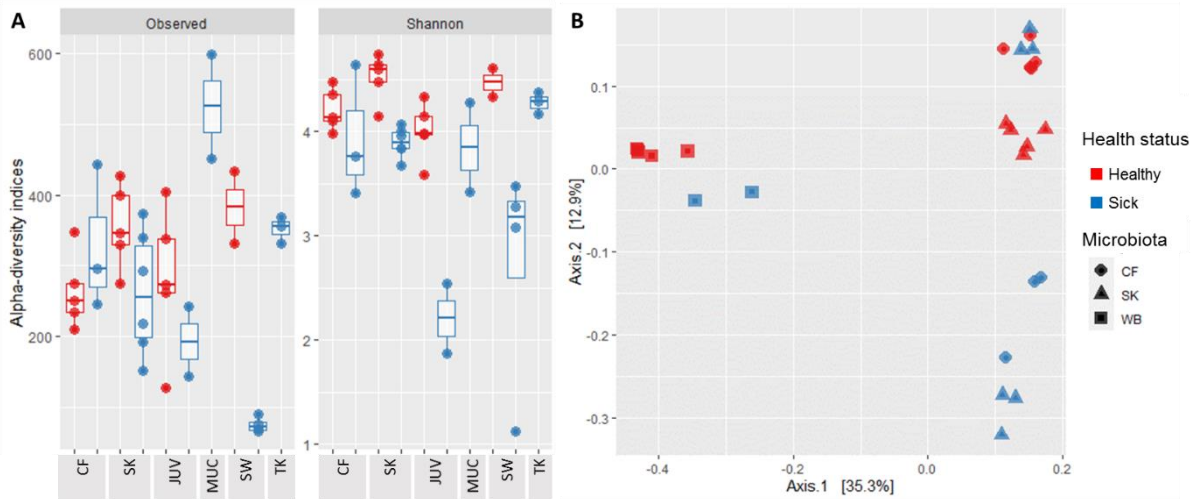


Fig. 2: Diversity analysis of healthy and sick samples. A: Alpha-diversity analysis: observed richness and Shannon's diversity indices for all the sample types. B: Beta-diversity: PCoA of sick and healthy samples of microbiota, built with the Jensen-Shannon Divergence metric. Sample code: CF= coelomic fluid microbiota; SK= Skin microbiota; JUV= whole-body microbiota of juveniles; MUC= mucus; SW= seawater; TK= tank.

Tab. 3: Statistical analysis on alpha-diversity values. Kruskal-Wallis test, p-value threshold 0.05

Sample type	"Healthy" vs "Sick"		Observed richness		Shannon's diversity index	
	n	df	chi-squared	p-value	chi-squared	p-value
Coeelomic microbiota	8	1	1.0889	0.2967	0.55556	0.4561
Skin microbiota	11	1	2.7	0.1003	7.5	0.00617*
Juveniles whole-body microbiota	7	1	1.35	0.2453	3.75	0.05281

\*Significant, p-value threshold 0.05

Tab. 4: Statistics results on beta-diversity metric (p-value threshold 0.05).

Test	PERMANOVA				Betadisper / Permutest		
	Df	R <sup>2</sup>	F	p-value	Sum Sq	F	p-value
Sick vs. healthy (n=26)	5	0.57501	5.4119	0.001	0.15122	5.0877	0.005

Microbial composition of healthy and sick microbiota in *H. forskali*

The *Proteobacteria* dominated the bacterial communities of the different microbiota of *H. forskali* (fig. 3), whatever the health status (47% in healthy samples and 50% in sick samples). In skin and coelomic microbiota, the *Firmicutes* (20%), the *Bacteroidota* (15%) and the *Actinobacteria* (11%) were abundant in healthy and sick microbiota, in contrast to juveniles where the *Actinobacteria* (1.6%) and the *Firmicutes* (2.1%) were less abundant, in profit to the *Proteobacteria* (83%), the *Bacteroidota* (14%) and the *Desulfobacterota* (6%).

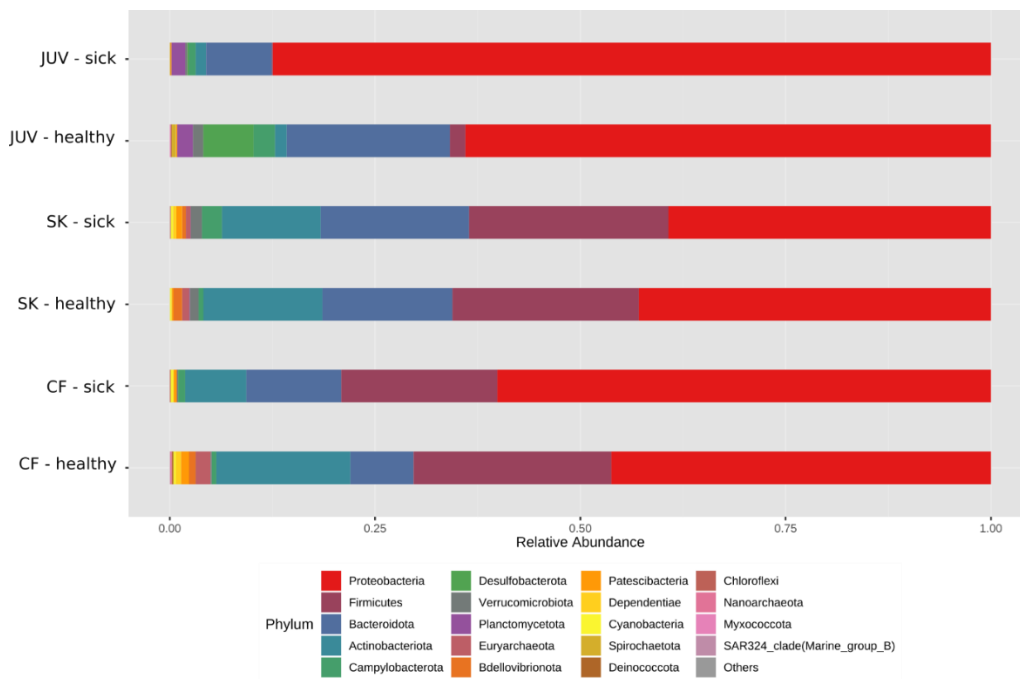


Fig. 3: Composition of the most abundant families of bacterial communities in the different microbiota according to the health status. Sample code: CF= coelomic fluid microbiota; SK= Skin microbiota; JUV= whole-body microbiota of juveniles.

Concerning the most abundant families, differences highlighted between sick and healthy microbiota (fig. 4). In the coelomic microbiota of sick broodstock, an important increase of the *Xantomonadaceae* (25.5%) and *Caulobacteraceae* (6.6%) was observed compared to healthy samples. In the skin microbiota, the *Flavobacteriaceae* (8.7%), the *Corynebacteriaceae* (6.1%) and the *Xanthomonadaceae* (3.2%) increased in several sick samples. In the microbiota of dying juveniles, the *Comamonadaceae* exploded (64.3%), linked with decrease in *Rhodobacteraceae* (from 39.8% in healthy microbiota to 8.3% in sick microbiota) and *Flavobacteriaceae* (from 12.8 to 5.5%).

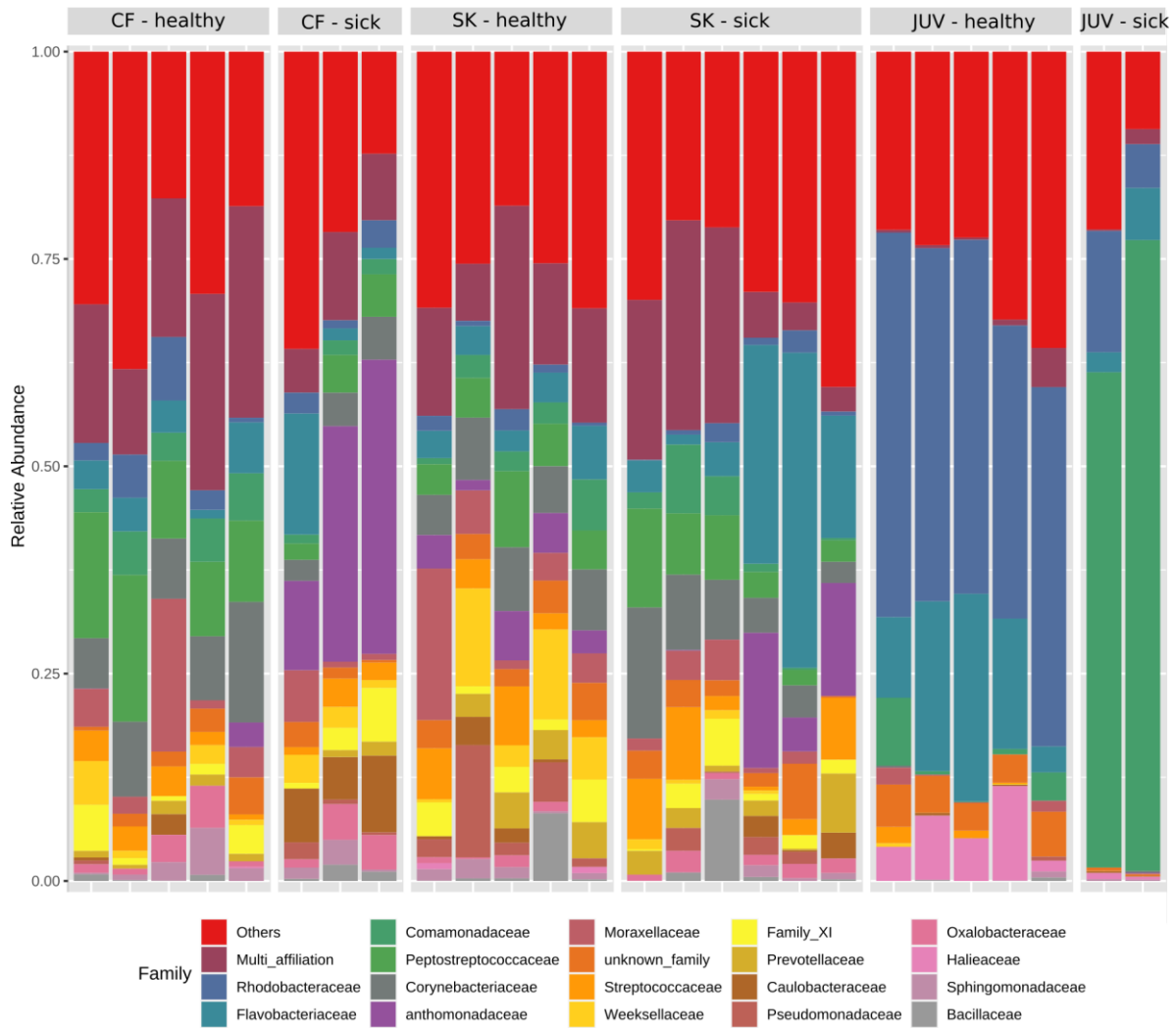


Fig. 4: Composition of the most abundant families of bacterial communities in the different microbiota according to the health status. Sample code: CF= coelomic fluid microbiota; SK= Skin microbiota; JUV= whole-body microbiota of juveniles.

### Biomarker analysis

The differential abundance analysis carried out between sick and healthy microbiota, highlighted taxa linked with the health status: 20 genera and 71 OTUs for the skin microbiota, 34 genera and 85 OTUs for the coelomic microbiota, and 15 genera and 43 OTUs for the whole-body microbiota of juveniles (Fig.5). Among them, the genus *Tenacibaculum* was identified as a sick biomarker in the coelomic and skin microbiota of the broodstock. Other genera identified as potential pathogenic or opportunistic agents of different species highlighted in the analysis, such as *Psychrobium*, found in diseased molluscs (63), *Stenotrophomonas* and *Brevundimonas* in human disease (64,65), or *Shewanella* (26,63,66,67).

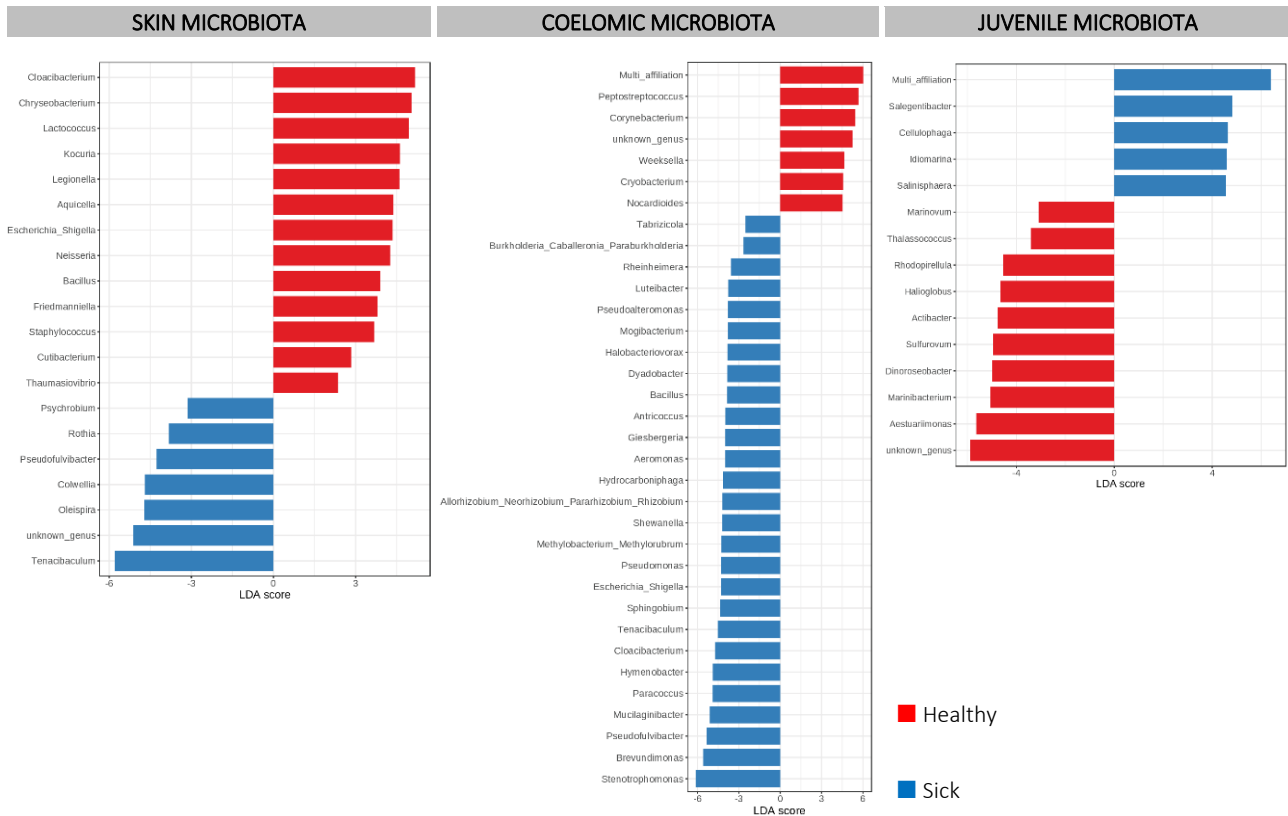


Fig. 5: biomarkers of health status identified with LefSE.

Otherwise, the heatmap clustering build with the sick samples of microbiota highlighted taxa associated with the health status (suppl. Figures). For the skin microbiota of sick sea-cucumbers, higher abundances of common opportunistic species such as *Vibrio sp.*, *Pseudomonas sp.*, for the coelomic microbiota, higher abundances of *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Aquipuribacter hungaricus*, *Vibrio sp.*, and, finally, higher proportions of *Roseobacter sp.*, *Thalassobius sp.* or *Thalassococcus lentus* in whole-body microbiota of sick juveniles. These taxa were correlated with disease or dysbiosis.

### Shared OTUs between microbiota of sick animals

The Venn diagram of shared OTUs, built with microbiota of sick animals, exhibited only 37 shared OTUs (represented 1.7% of their OTUs) (fig. 6, suppl. table). These shared OTUs were mainly composed by 6 families: the *Comamonadaceae*, *Caulobacteraceae*, *Moraxellaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Streptococcaceae* and *Sphingomonadaceae*. The coelomic and skin microbiota of sick animals showed a higher proportion of shared OTUs (306 OTUs representing 28%, and 343 OTUs shared in total), probably due to the fact that they originated from the same broodstock in the same location. Among them, the most abundant taxa were an undetermined *Comamonadaceae* and the genera *Stenotrophomonas*,

*Peptostreptococcus*, *Brevundimonas*, *Tenacibaculum*, *Anaerococcus*, *Corynebacterium* and *Massilia*. Some of these taxa were known to be opportunistic bacteria (*Corynebacterium* and *Comamonadaceae*).

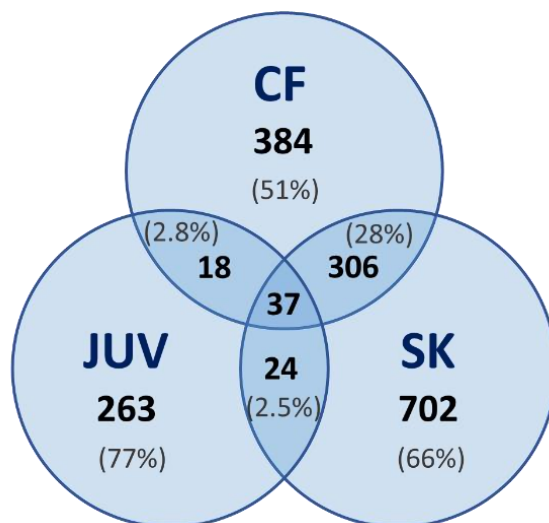


Fig. 6: Venn diagram of shared OTUs between microbiota of sick animals. Sample code: CF= coelomic fluid microbiota; SK= Skin microbiota; JUV= whole-body microbiota of juveniles.

### Presence and abundance of potential pathogenic bacteria

Based on the criteria of a specific presence in sick samples and a minimum abundance of 0.01%, 54 OTUs have been selected, grouped in 29 genera (fig. 7, suppl. table). In this list of potential pathogenic agents could be found members of the *Shewanellaceae* associated with dysbiosis and disease in molluscs such as *Shewanella sp.* and *Psychrobium* (63), and numerous members of the *Flavobacteriaceae* such as *Flavobacterium sp.*, *Polaribacter sp.*, and *Tenacibaculum sp.* responsible for several fish diseases (16,17,68). In sea-cucumber farming, a *Shewanella* strain was recently associated with skin ulceration disease in sea-cucumber farming, such as the species *Shewanella marisflavi*, isolated in *A. japonicus* (69,70). Finally, the most abundant genus was *Tenacibaculum* (5.8%), validated previous results, with important abundances in the microbiota of sick *H. forskali*, especially in the skin microbiota (5.18% of the total abundance), but also in environment, in the mucosal secretion and in the tank biofilm. The presence of these bacteria in the environment promoted the progression of the disease in captivity. In the 4 OTUs corresponding to the genus *Tenacibaculum*, *T. mesophilum* was also found, recently reported to be pathogenic in seabream and pearl oyster production (71).

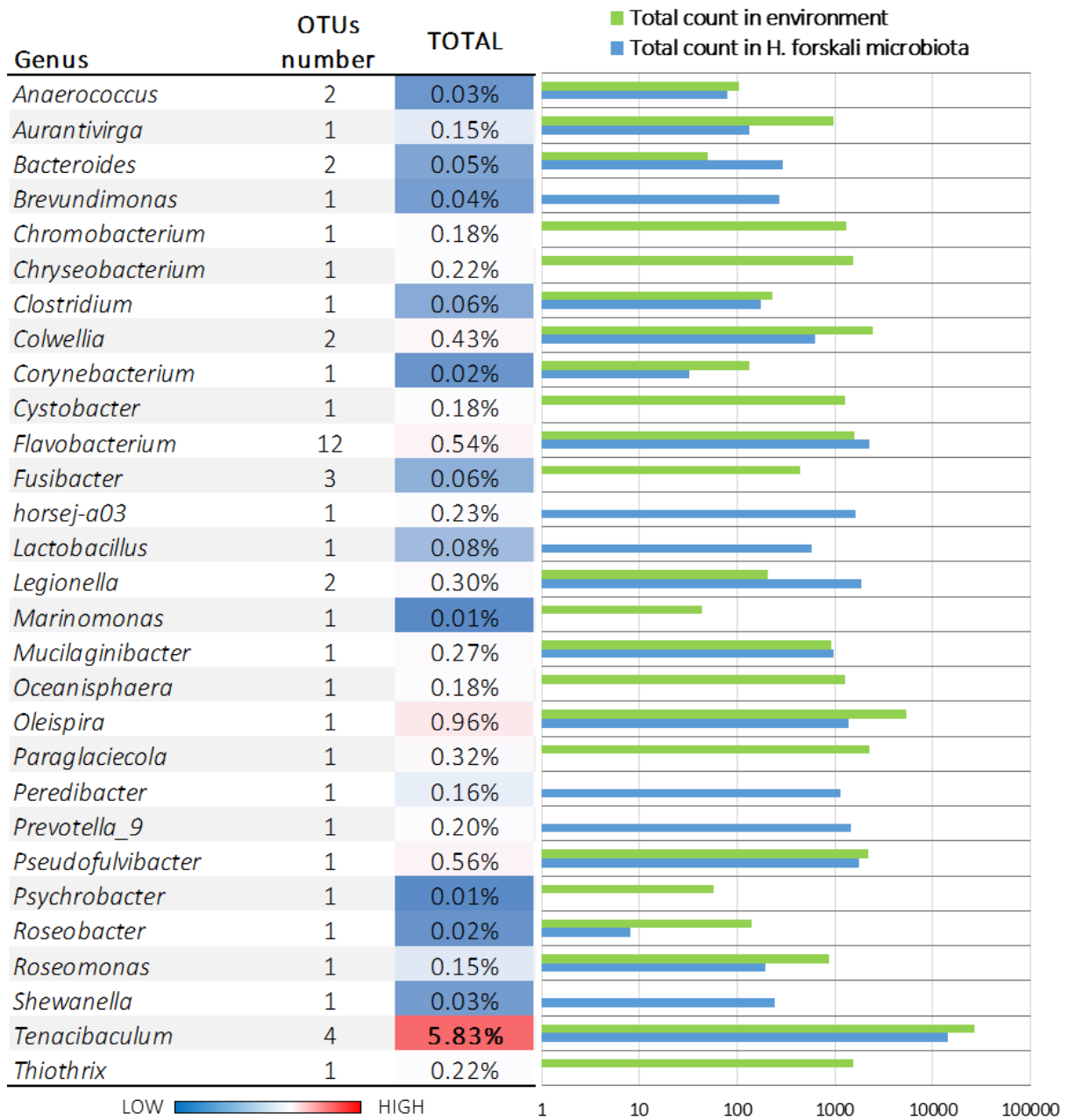


Fig.7: List of the most specific and abundant taxa correlated with the sick samples. Relative abundance, OUT content, and total count of the 29 selected genera.

## DISCUSSION

This study aimed to compare the microbiota of healthy and sick microbiota of the European sea-cucumber *H. forskali* and to identify potential pathogenic agents.

### The SKin Ulceration syndrome Disease (SKUD) could affect *H. forskali*

In sea-cucumber farming, the SKUD could be detected by an external examination of the animals: with the disease progression, white spots appeared in the body, coupled with a decrease of the animal activity, and these spots evaluated in skin ulcers and necrosis, that can lead to body perforation (28). Different pathogenic agents have been identified in *A. japonicus* and *H. scabra*, such as *Pseudoalteromonas sp.*, *Pseudoalteromonas tetraodonis*, or *Vibrio harveyi* (27,28,72,73). *H. forskali* was a new targeted species and no case of infectious disease was yet reported. First assays of domestication have succeed and highlighted the existence of disease in this temperate sea-cucumber in captivity. Broodstock of *H. forskali* presenting many skin ulcers were sampled, as well as environmental samples, and healthy animals. An increasing production of mucosal secretion was observed through the disease progression. Otherwise, 1-year old juveniles presenting depigmentation on their dermis were sampled. These animals constituted the first case of disease in *H. forskali*. In Europe, other cases of SKUD have been detected in *H. arguinensis* (62).

### The disease influenced the coelomic and skin microbiota of sick sea-cucumber

Analysis of the samples of sick and healthy samples of microbiota with the Illumina MiSeq technology allowed to highlight differences between healthy and sick microbiota. The alpha diversity analysis exhibited difference of richness and diversity, with highest diversity for the coelomic, skin and whole-body microbiota of healthy specimen of *H. forskali*. In many studies focusing on invertebrate diseases, the disease progression was correlated with a decrease in species richness and diversity (21) and a modification of the bacterial communities (21,74), with a proliferation of opportunistic taxa. Moreover, the beta-diversity highlighted the dissimilarities, first between the different type of microbiote (i.e coelomic, skin, and whole-body microbiota), but above all between healthy and sick samples. The microbiota of sick and healthy juveniles appeared as highly different from the 2 other microbiota. A more precise examination of the data and especially of the microbiota composition validated the influence of the disease on the bacterial communities of the microbiota. An overall increase of the Proteobacteria was observed in microbiota of sick animals. The Proteobacteria and especially the Class of the Gammaproteobacteria was a large group including pathogenic genera such as *Yersinia*, *Vibrio* or *Salmonella*. The families *Xantomonadaceae*, *Caulobacteraceae*, *Flavobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Corynebacteriaceae* and *Xanthomonadaceae* increased in several sick samples. These variations

explained to disease progression and the loss in diversity. This loss in diversity was already described in invertebrates disease development, leading to a dysbiosis and the development of opportunistic bacteria and pathogenic bacteria (21,26,74). Furthermore, the differences between the composition of the coelomic, skin and whole-body microbiota highlighted the specificities of these anatomical compartments and the anatomical modulation of the microbiota, already described in the scallop *Patinopecten yessoensis* (74).

### Microbiota dysbiosis and development of over-abundant opportunistic taxa

In the microbiota of sick or dying animals, some taxa were over abundant, such as the *Comamonadaceae*, the *Xanthomonadaceae* and the *Flavobacteriaceae*. The *Comamonadaceae* was a large family of Gram-negative bacteria found in many different habitats, and presenting an important phenotypic diversity with genera contributing to the recycling of organic matter (75). This family has also been detected in microbiota of different host, from mollusc species (50,76,77), to echinoderms (78), and juveniles of shrimp (79), where they were associated with a normal health status, even if some pathogenic genera have been described in the literature (75). However, the overabundance of this taxa in sick animals were probably the consequence of the disease and the dysbiosis generated both by pathogenic agents, and also by the development of opportunistic bacteria. Another abundant family associated with the diseased animals were the *Xanthomonadaceae*. This family was composed by some pathogenic species for plants, and were principally known for secreting exopolysaccharides used in biotechnologies (80–82). The development of this family could explain the higher secretion of mucus in sick animals.

### *Tenacibaculum* sp. as potential main causing agent of the SKUD in *H. forskali*

In the microbiota of diseased animals, several genera associated to pathology in aquaculture were detected, but some of them were overabundant, namely *Stenotrophomonas* sp., *Tenacibaculum* sp., *Sphingobium* sp., *Brevundimonas* sp., *Novosphingobium* sp. and *Oleispira* sp. These six taxa constituted potential causing agents for the SKUD observed in *H. forskali*. The genus *Stenotrophomonas* was described as pathogenic bacteria in human and but also as bioremediation agents in horticulture (64,83). The better candidate as pathogenic agent for the SKUD in *H. forskali* was *Tenacibaculum* (*Flavobacteriaceae*), with high abundance in infected tissues. The species *T. maritimum* was known in fish farming as a causing agent of the “tenacibaculosis”, which provoked multiple ulcers and necrosis on fishes, often leading to massive mortality in fish farming (84). In sea-cucumber, a strain of *Tenacibaculum* has been isolated from the intestine of *Apostichopus japonicus* (85), but no proof of pathogenicity has been found yet. In the previous data, 18 OTUs affiliated to this genus were found, in skin ulcers, in the coelomic microbiota, in the mucosal secretions and in the tank biofilm. The



prevalence, the abundance and the presence in biological and environmental compartments, as well as its history, incriminated the genus *Tenacibaculum*.

### The 16S metabarcoding as tool for emergent pathogen detection

Finally, this study highlighted the use of 16S Metarcoding approach as a tool for pathogen detection, and could resolve problem associated with the culturable approaches, often used in emergent disease studies. In this field of study, the metabarcoding permitted both to browse a large number of samples and also generated an important taxonomical data, which could be analysed by powerful bioinformatics tools. A weak part of the marine bacteria were non-culturable (86–88) and the laboratory choices such as growth media constituted biases for pathogen detection. Thus, the combination of first non-culturable approach with metabarcoding 16S and then culturable based approaches to validate the pathogenic agent by voluntary infection assays constituted a relevant method.

The genus *Tenacibaculum* was incriminated as principal causing agent for the SKUD in this study, and infection assays should be carried out to validate the results and describe the disease kinetic in *H. forskali*.

## Conclusion

In this study, we explored the skin and coelomic microbiota of *H. forskali* specimens exhibited signs of the Skin Ulceration Disease. The results exhibited highly different microbiota between healthy and sick animals. Sick sea-cucumbers showed signs of a dysbiosis with the development of opportunistic and/or potentially pathogen bacteria, among them the genus *Tenacibaculum*, which was overabundant in infected tissues. This preliminary work permitted to identify the first cases of SKUD in *H. forskali* by Metabarocding 16S.

## Aknowledgments and funding information

This work was funded by European maritime and fisheries Fund in France (HOLOFARM project, FEAMP - Innovative Aquaculture). Hélène Laguerre was supported by a “Quimper-Bretagne Occidentale” grant for PhD thesis. Thanks to the experimental station of the French Museum (MNHN, Concarneau, France): Gwenn Herault, Sébastien Cadiou and A icha Badou, and to Julien Gryns from the SME AQUA-B (Lesconil, France) for the sea-cucumber breeding and the furniture of sick animals. Thanks you to Christian Miquel and Sébastien Lobreaux (Alpine Ecology Laboratory - LECA, Grenoble Alpes University) for their advice on bioinformatics.

## REFERENCES

1. Meyer FP. 1991. Aquaculture disease and health management. *J Anim Sci* 69:4201–4208.
2. Bruno DE, Ellis AE. 1996. Chapter 13 - Salmonid Disease Management, p. 759–832. In Pennell, W, Barton, BA (eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier.
3. Chen M, Wang F, Xing K, Zhu A, Zhang S. 2015. Chapter 15 - Immunology and Diseases, p. 257–287. In Yang, H, Hamel, J-F, Mercier, A (eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier.
4. Chatterjee S. 2012. *Vibrio* Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. *J Mar Sci Res Dev* s1.
5. Austin B, Zhang X-H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol* 43:119–124.
6. Montánchez I, Kaberdin VR. 2020. *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Mar Environ Res* 154:104850.
7. Lupo C, Travers M-A, Tourbiez D, Barthélémy CF, Beaunée G, Ezanno P. 2019. Modeling the Transmission of *Vibrio aestuarianus* in Pacific Oysters Using Experimental Infection Data. *Front Vet Sci* 6:142.
8. Paillard C, Gausson S, Nicolas J-L, Le Pennec JP, Haras D. 2006. Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253:25–38.
9. Rodrigues S, Paillard C, Le Pennec G, Dufour A, Bazire A. 2015. *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease, Forms Biofilms with Spherical Components. *Front Microbiol* 6:1384.
10. Bjelland AM, Fauske AK, Nguyen A, Orlie IE, Østgaard IM, Sørsum H. 2013. Expression of *Vibrio salmonicida* virulence genes and immune response parameters in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Front Microbiol* 4:401.
11. Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Rediers H. 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *J Fish Dis* 34:643–661.
12. Toranzo A, Barja J. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis Aquat Organ* 9:73–82.
13. Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, Betancourt-Lozano M, Morales-Covarrubias MS. 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol* 81:1689–1699.
14. Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet Res* 46:103.
15. Tobbach E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J Fish Dis* 30:257–268.

16. Loch TP, Faisal M. 2015. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *J Adv Res* 6:283–300.
17. Madetoj J, Dalsgaard I, Wiklund T. 2002. Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish farming environment. *Dis Aquat Organ* 52:109–18.
18. Turnbaugh PJ, Gordon JI. 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity: The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol* 587:4153–4158.
19. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480–484.
20. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH. 2012. Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *BMC Microbiol* 12:20.
21. Lloyd MM, Pespeni MH. 2018. Microbiome shifts with onset and progression of Sea Star Wasting Disease revealed through time course sampling. *Sci Rep* 8.
22. Eeckhaut I, Parmentier E, Becker P, Gomez da Silva S, Jangoux M. Parasites and biotic diseases in field and cultivated sea cucumbers 16. In: Lovatelli, A. (comp./ed.); Conand, C.; Purcell, S.; Uthicke, S.; Hamel, J.-F.; Mercier, A. (eds.). *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome, FAO. 2004. 425p
23. Purcell S, Eeckhaut I. 2005. An external check for disease and health of hatchery-produced sea cucumbers. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 22:34-38.
24. Tolon T, Karacalar U, Sirin C. 2021. Observation of *Vibrio mediterranei* (Pujalte and Garay 1986) / *Vibrio shiloi* (Kushmaro et al. 2001) bacteria from skin ulcers of the cultured sea cucumber *Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1823). *Ege J Fish Aquat Sci* 38:387–391.
25. Canovas F, Domínguez-Godino JA, González-Wangüemert M. 2019. Short term approach to wildlife epidemiology of skin ulceration disease in the new target species of sea cucumber *Holothuria arguinensis*. *Dis Aquat Organ* 135.
26. Delroisse J, Van Wayneberghe K, Flammang P, Gillan D, Gerbaux P, Opina N, Todinanahary GGB, Eeckhaut I. 2020. Epidemiology of a SKin Ulceration Disease (SKUD) in the sea cucumber *Holothuria scabra* with a review on the SKUDs in Holothuroidea (Echinodermata). *Sci Rep* 10:22150.
27. Liu H, Zheng F, Sun X, Hong X, Dong S, Wang B, Tang X, Wang Y. 2010. Identification of the pathogens associated with skin ulceration and peristome tumescence in cultured sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Selenka). *J Invertebr Pathol* 105:236–242.
28. Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, Jangoux M, Rasolofonirina R, Rakotovo J, Eeckhaut I. 2004. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture* 242:13–30.
29. Deng H, He C, Zhou Z, Liu C, Tan K, Wang N, Jiang B, Gao X, Liu W. 2009. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture* 287:18–27.

30. Laguerre H, Raymond G, Plan P, Améziane N, Bailly X, Le Chevalier P. 2020. First description of embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea), a new species for aquaculture in the north-eastern Atlantic. *Aquaculture* 521:734961.
31. Rakaj A, Fianchini A, Boncagni P, Lovatelli A, Scardi M, Cataudella S. 2018. Spawning and rearing of *Holothuria tubulosa* : A new candidate for aquaculture in the Mediterranean region. *Aquac Res* 49:557–568.
32. González-Wangüemert M. 2018. The fast development of sea cucumber fisheries in the Mediterranean and NE Atlantic waters: From a new marine resource to its over-exploitation. *Coast Manag* 13.
33. MacDonald CLE, Stead SM, Slater MJ. 2013. Consumption and remediation of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) waste by the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Aquac Int* 21:1279–1290.
34. Sousa J, Félix P, Brito A, Venâncio E, Azevedo E Silva F, Simões T, Raposo A, Neves M, Narciso L, Melo R, Pombo A. 2020. The effects of stocking density on physiological traits in *Holothuria forskali* broodstock. *Aquac Res* 52.
35. David F, Hubas C, Laguerre H, Badou A, Herault G, Bordelet T, Ameziane N. 2020. Food sources, digestive efficiency and resource allocation in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea): Insights from pigments and fatty acids. *Aquac Nutr* 26:1568–1583.
36. Astall CM, Jones MB. 1991. Respiration and biometry in the sea cucumber *Holothuria forskali*. *J Mar Biol Assoc U K* 71:73–81.
37. Santos R, Dias S, Pinteus S, Silva J, Alves C, Tecelão C, Pedrosa R, Pombo A. 2015. Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. *Aquac Res* 47:2307–2323.
38. Tuwo A, Conand C. 1992. Reproductive biology of the holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). *J Mar Biol Assoc U K* 72:745–758.
39. Demeuldre M, Chinh Ngo T, Hennebert E, Wattiez R, Leclère P, Flammang P. 2014. Instantaneous adhesion of Cuvierian tubules in the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Biointerphases* 9:029016.
40. León-Palmero E, Joglar V, Álvarez PA, Martín-Platero A, Llamas I, Reche I. 2018. Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PLOS ONE* 13:e0196178.
41. Smith LC, Ghosh J, Buckley KM, Clow LA, Dheilly NM, Haug T, Henson JH, Li C, Lun CM, Majeske AJ, Matranga V, Nair SV, Rast JP, Raftos DA, Roth M, Sacchi S, Schrankel CS, Stensvåg K. 2010. Echinoderm Immunity, p. 260–301. In Söderhäll, K (ed.), *Invertebrate Immunity*. Springer US, Boston, MA.
42. Smith LC, Arizza V, Barela Hudgell MA, Barone G, Bodnar AG, Buckley KM, Cunsolo V, Dheilly NM, Franchi N, Fugmann SD, Furukawa R, Garcia-Ararras J, Henson JH, Hibino T, Irons ZH, Li C, Lun CM, Majeske AJ, Oren M, Pagliara P, Pinsino A, Raftos DA, Rast JP, Samasa B, Schillaci D, Schrankel CS, Stabili L, Stensvåg K, Sutton E. 2018. Echinodermata: The Complex Immune System in Echinoderms, p. 409–501. In Cooper, EL (ed.), *Advances in Comparative Immunology*. Springer International Publishing, Cham.

43. Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. Oxford University Press.
44. Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2015. OBITools: a Unix-inspired software package for DNA metabarcoding. Mol Ecol Resour 10.1111/1755-0998.12428.
45. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics 34:1287–1294.
46. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. PeerJ 2:e593.
47. Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26:2460–2461.
48. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ 4:e2584.
49. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10:421.
50. Rossbach S, Cardenas A, Perna G, Duarte CM, Voolstra CR. 2019. Tissue-Specific Microbiomes of the Red Sea Giant Clam *Tridacna maxima* Highlight Differential Abundance of *Endozoicomonadaceae*. Front Microbiol 10.
51. R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
52. McMurdie PJ, Holmes S. 2013. *phyloseq*: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE 8:e61217.
53. Anderson MJ. 2017. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA), p. 1–15. In Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. American Cancer Society.
54. Anderson MJ, Ellingsen KE, McArdle BH. 2006. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. Ecol Lett 9:683–693.
55. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2019. *vegan*: Community Ecology Package.
56. O’Neill M, Mathews K. 2002. Theory & Methods: A Weighted Least Squares Approach to Levene’s Test of Homogeneity of Variance. Aust N Z J Stat 42:81–100.
57. Stier AC, Geange SW, Hanson KM, Bolker BM. 2013. Predator density and timing of arrival affect reef fish community assembly. Ecology 94:1057–1068.
58. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. 2020. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. Nat Protoc 15:799–821.
59. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. 2017. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. Nucleic Acids Res 45:W180–W188.

60. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12:R60.
61. Saito K, Koido S, Odamaki T, Kajihara M, Kato K, Horiuchi S, Adachi S, Arakawa H, Yoshida S, Akasu T, Ito Z, Uchiyama K, Saruta M, Xiao J, Sato N, Ohkusa T. 2019. Metagenomic analyses of the gut microbiota associated with colorectal adenoma. *PLOS ONE* 14:e0212406.
62. Cánovas F, Domínguez-Godino JA, González-Wangüemert M. 2019. Epidemiology of skin ulceration disease in wild sea cucumber *Holothuria arguinensis*, a new aquaculture target species. *Dis Aquat Organ* 135:77–88.
63. Clerissi C, de Lorgeril J, Petton B, Lucasson A, Escoubas J-M, Gueguen Y, Dégremont L, Mitta G, Toulza E. 2020. Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Front Microbiol* 11.
64. Brooke JS. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 25:2–41.
65. Ryan MP, Pembroke JT. 2018. *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence* 9:480–493.
66. Beleneva IA, Magarlamov TY, Eliseikina MG, Zhukova NV. 2009. Biochemical and pathogenic properties of the natural isolate of *Shewanella algae* from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *J Invertebr Pathol* 102:250–255.
67. Lemaire O, Méjean V, Iobbi-Nivol C. 2020. The *Shewanella* genus: ubiquitous organisms sustaining and preserving aquatic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 44:155–170.
68. Bowman JP. 2006. The Marine Clade of the Family *Flavobacteriaceae*: The Genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter* and *Zobellia*, p. 677–694. In Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, K-H, Stackebrandt, E (eds.), *The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass*. Springer, New York, NY.
69. Li H, Qiao G, Li Q, Zhou W, Won KM, Xu D-H, Park S-I. 2010. Biological characteristics and pathogenicity of a highly pathogenic *Shewanella marisflavi* infecting sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *J Fish Dis* 33:865–877.
70. Xu L, Xu Y, He L, Zhang M, Wang L, Li Z, Li X. 2019. Immunomodulatory effects of chicken egg yolk antibodies (IgY) against experimental *Shewanella marisflavi* AP629 infections in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *Fish Shellfish Immunol* 84:108–119.
71. Nowlan JP, Lumsden JS, Russell S. 2020. Advancements in Characterizing *Tenacibaculum* Infections in Canada. *Pathog Basel Switz* 9:E1029.
72. Deng H, He C, Zhou Z, Liu C, Tan K, Wang N, Jiang B, Gao X, Liu W. 2009. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture* 287:18–27.
73. Delroisse J, Van Wayneberghe K, Flammang P, Gillan D, Gerbaux P, Opina N, Todinanahary GGB, Eeckhaut I. 2020. Epidemiology of a SKin Ulceration Disease (SKUD) in the sea cucumber *Holothuria scabra* with a review on the SKUDs in Holothuroidea (Echinodermata). *Sci Rep* 10:22150.

74. Yu Z, Liu C, Fu Q, Lu G, Han S, Wang L, Song L. 2019. The differences of bacterial communities in the tissues between healthy and diseased Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). *AMB Express* 9:148.
75. Willems A. 2013. The Family *Comamonadaceae*. The Prokaryotes: Alphaproteobacteria Betaproteobacteria. 4th ed. Ed. Eugene Rosenberg et al. Berlin, Germany: Springer, 2014. 777–851.
76. Palladino G, Rampelli S, Scicchitano D, Musella M, Quero GM, Prada F, Mancuso A, Seyfarth AM, Turroni S, Candela M, Biagi E. 2021. Impact of Marine Aquaculture on the Microbiome Associated with Nearby Holobionts: The Case of *Patella caerulea* Living in Proximity of Sea Bream Aquaculture Cages. 2. *Microorganisms* 9:455.
77. Dubé CE, Ky CL, Planes SE. 2019. Microbiome of the Black-Lipped Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*, a Multi-Tissue Description With Functional Profiling. *Front Microbiol* 10.
78. Green GBH, Hakim JA, Chen J-W, Koo H, Morrow CD, Watts SA, Bej AK. 2021. The Gut Microbiota of Naturally Occurring and Laboratory Aquaculture *Lytechinus variegatus* Revealed Differences in the Community Composition, Taxonomic Co-Occurrence, and Predicted Functional Attributes. 2. *Appl Microbiol* 1:201–224.
79. Huang Z, Li X, Wang L, Shao Z. 2014. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res* 47.
80. Assis R de AB, Polloni LC, Patané JSL, Thakur S, Felestrino ÉB, Diaz-Caballero J, Digiampietri LA, Goulart LR, Almeida NF, Nascimento R, Dandekar AM, Zaini PA, Setubal JC, Guttman DS, Moreira LM. 2017. Identification and analysis of seven effector protein families with different adaptive and evolutionary histories in plant-associated members of the *Xanthomonadaceae*. *Sci Rep* 7:16133.
81. Candido da Silva LC, Targino BN, Furtado MM, de Oliveira Pinto MA, Rodarte MP, Hungaro HM. 2017. Chapter 13 - Xanthan: Biotechnological Production and Applications, p. 385–422. In Holban, AM, Grumezescu, AM (eds.), *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*. Academic Press.
82. Saddler GS, Bradbury JF. 2015. *Xanthomonadaceae* fam. nov., p. 1–3. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman.
83. Ghosh R, Chatterjee S, Mandal NC. 2020. Chapter 20 - *Stenotrophomonas*, p. 427–442. In Amaresan, N, Senthil Kumar, M, Annapurna, K, Kumar, K, Sankaranarayanan, A (eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Academic Press.
84. Avendaño-Herrera R, Toranzo A, Magarinos B. 2006. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: A review. *Dis Aquat Organ* 71:255–66.
85. Wang L, Li X, Hu D, Lai Q, Shao Z. 2015. *Tenacibaculum holothuriorum* sp. nov., isolated from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* intestine. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4347–4352.
86. Enomoto M, Nakagawa S, Sawabe T. 2012. Microbial Communities Associated with Holothurians: Presence of Unique Bacteria in the Coelomic Fluid. *Microbes Environ* 27:300–305.
87. Chen L, Wang X-Y, Liu R-Z, Wang G-Y. 2021. Culturable Microorganisms Associated with Sea Cucumbers and Microbial Natural Products. *Mar Drugs* 19:461.

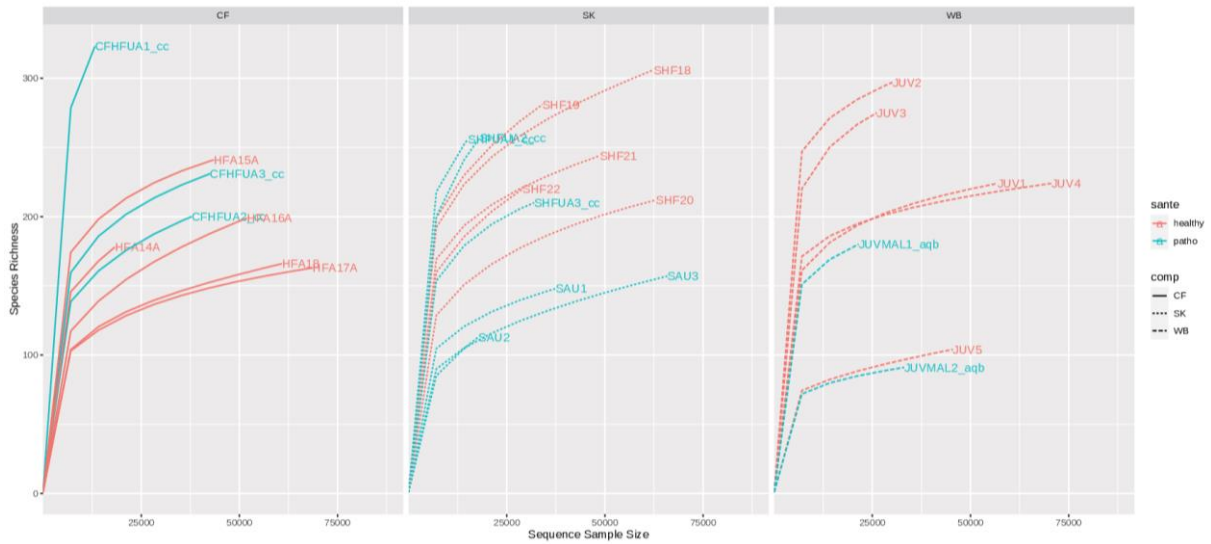
88. Offret C, Jégou C, Mounier J, Fleury Y, Chevalier PL. 2019. New insights into the haemo- and coelo-microbiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. *J Appl Microbiol* 126:1023–1031.



## Supplementary materials

Fig. S1: Rarefaction curves

Generated with the web platform Microbiome Analyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca>) (Chong et al., 2020; Dhariwal et al., 2017)



Code:

CF = coelomic fluid microbiota

SK = skin microbiota

WB = whole-body microbiota of juveniles

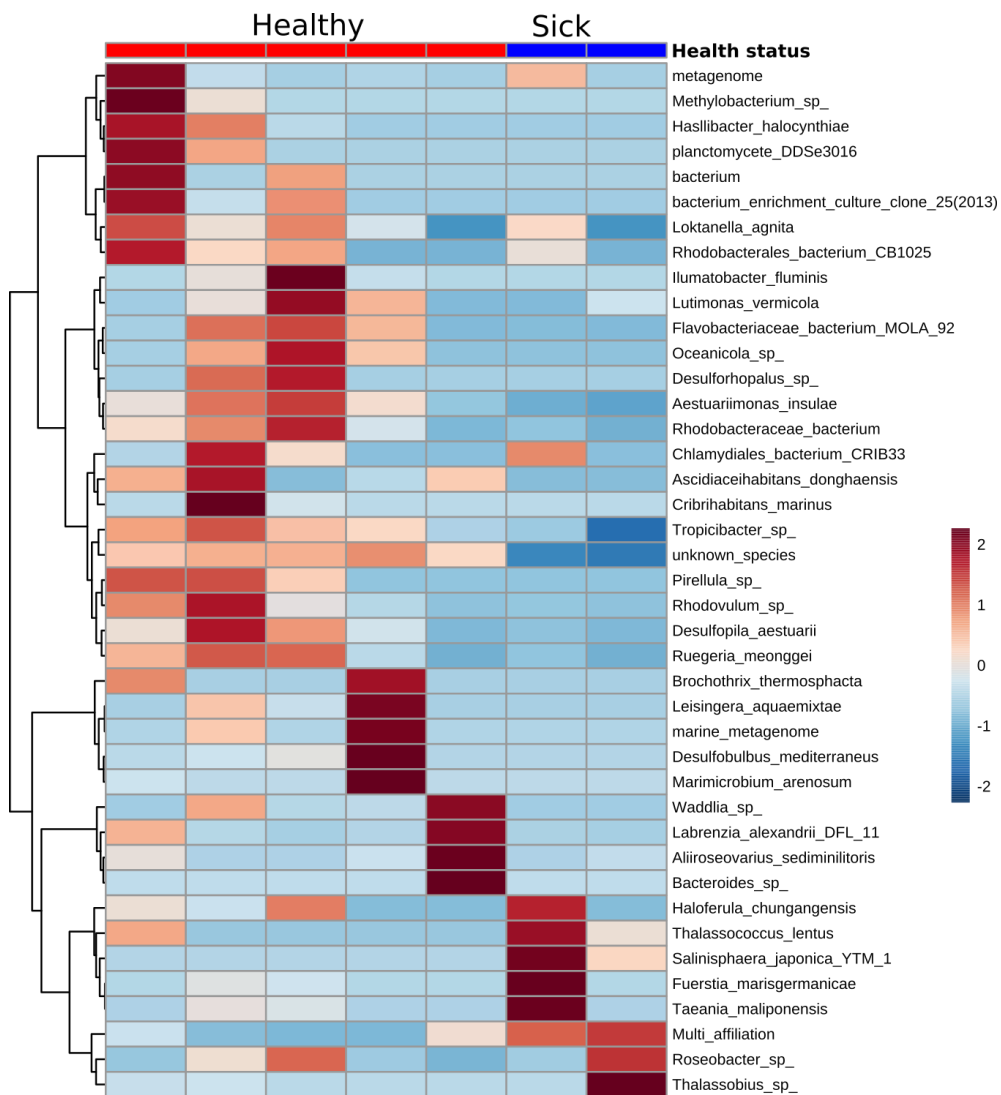
Red/pink = healthy samples

Blue = sick samples

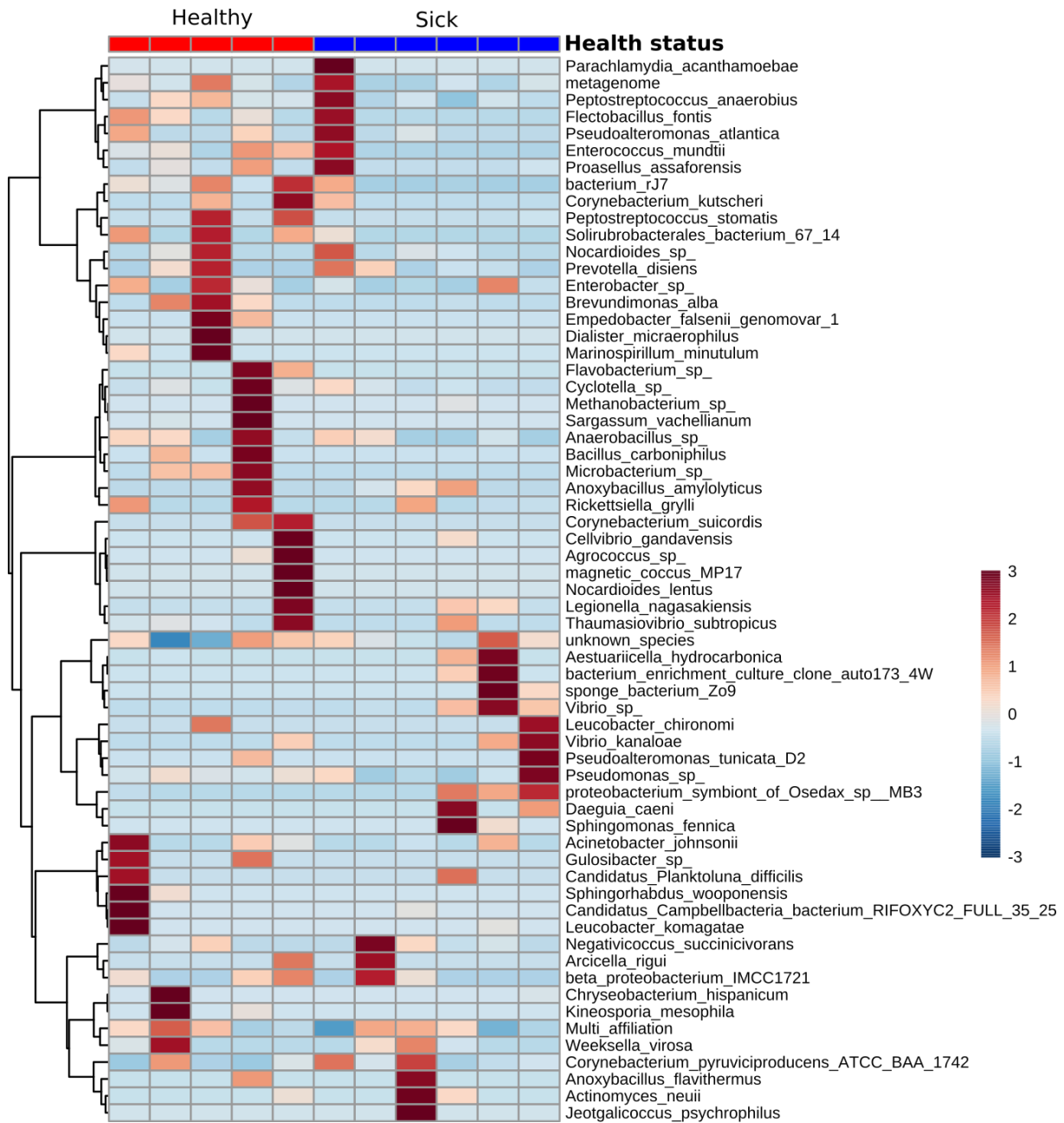
Supplementary table : List of the 37 shared OTUs between sick samples.

Family	Genus	Whole-body microbiota of sick juveniles	Coelomic microbiota of sick broodstock	Skin microbiota of sick broodstock	n OTUs
Comamonadaceae	Unknown	64.10%	1.17%	1.57%	5
Caulobacteraceae	Brevundimonas	0.05%	5.91%	0.48%	3
Moraxellaceae	Acinetobacter	0.05%	0.76%	0.98%	1
Sphingobacteriaceae	Pedobacter	2.30%	0.86%	0.12%	2
Streptococcaceae	Streptococcus	0.02%	1.28%	0.33%	2
Sphingomonadaceae	Novosphingobium	<0.01%	0.33%	0.62%	1
	Sphingomonas	0.05%	0.02%	<0.01%	1
Beijerinckiaceae	Methylobacterium-Methylorubrum	0.44%	0.31%	0.34%	2
Microbacteriaceae	Microbacterium	0.10%	0.19%	0.19%	1
	Cryobacterium	0.03%	0.27%	0.06%	1
Rhizobiaceae	Allorhizobium-Neorhizobium- Pararhizobium-Rhizobium	0.33%	0.22%	0.29%	1
	Multi-affiliation	0.01%	<0.01%	<0.01%	1
Vibrionaceae	Vibrio	0.01%	0.14%	0.19%	1
Idiomarinaceae	Idiomarina	0.75%	0.06%	0.01%	1
Rhodanobacteraceae	Luteibacter	0.51%	0.12%	0.01%	1
Cellvibrionaceae	Cellvibrio	0.00%	0.02%	0.11%	1
Iamiaceae	Iamia	0.02%	0.03%	0.09%	1
Intrasporangiaceae	Multi-affiliation	0.01%	0.04%	0.08%	1
Colwelliaceae	Colwellia	<0.01%	0.03%	0.09%	1
Micrococcaceae	Kocuria	0.39%	<0.01%	<0.01%	1
Burkholderiaceae	Ralstonia	0.01%	0.19%	<0.01%	1
Nocardioideae	Nocardioides	0.03%	0.03%	0.01%	1
Flavobacteriaceae	NS3a marine group	<0.01%	0.06%	<0.01%	1
Gaiellaceae	Gaiella	0.02%	<0.01%	<0.01%	1
Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	<0.01%	<0.01%	<0.01%	1

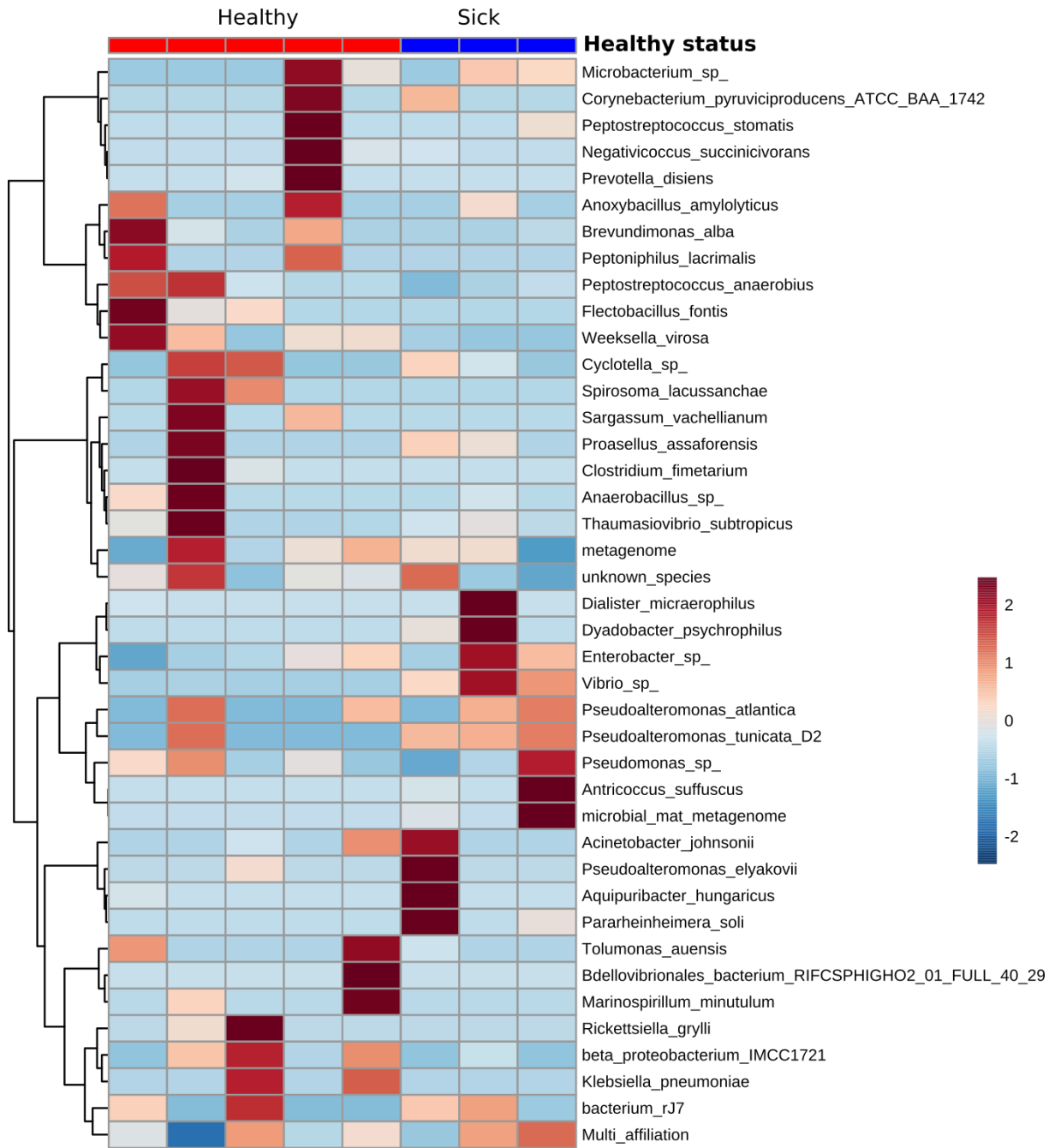
Suppl. fig. : Heatmap Clustering / Juveniles microbiota



Suppl. fig. : Heatmap clustering / skin microbiota



Suppl. fig. : Heatmap clustering / coelomic microbiota



## 6.3 Conclusion du chapitre et perspectives

Lors de la domestication d'une nouvelle espèce en aquaculture, la détection et l'identification des potentiels pathogènes sont une priorité, permettant de contribuer à la prophylaxie. Grâce à la détection de signes d'ulcérations cutanées chez des individus de *H. forskali* élevés en captivité, des prélèvements ont pu être réalisés et analysés par metabarcoding 16S. Des modifications des microbiotes coelomique et cutané ont été observées chez les individus malades. L'analyse différenciée des compositions a permis de mettre en exergue la présence de potentiels candidats pathogènes, tels que le genre *Tenacibaculum*, présent en abondance dans les plaies cutanées et absent des épidermes sains.

Ce travail a permis d'identifier des symptômes associés au SKUD chez *H. forskali* et d'isoler des souches à partir des plaies, qui feront l'objet de travaux futurs.





# **Chapitre 6**

## Étude du microbiote cultivable





## 7. Étude du microbiote cultivable

### 7.1 Partie 1 : Suivi des concentrations en microbiote cultivable chez l'hôte *H. forskali* dans le milieu naturel

#### 7.1.1 INTRODUCTION

Les invertébrés marins hébergent un microbiote propre, souvent différencié en fonction du compartiment anatomique considéré (King et al., 2021; Dubé et al., 2019; Rossbach et al., 2019; Lokmer et al., 2016b), et participant à des fonctions clés chez l'hôte notamment le maintien de l'homéostasie (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2016; Rosenberg et al., 2007), l'immunité (Smith et al., 2018; Chen et al., 2015; Smith et al., 2010) ou encore dans les fonctions digestives (Butt and Volkoff, 2019; Limborg et al., 2018). Chez les invertébrés marins, seule une part infime du microbiote est cultivable, estimée à moins de 5% chez l'holothurie japonaise *Apostichopus japonicus* et variable selon le compartiment anatomique exploré (Enomoto et al., 2012). Chez *H. forskali*, le microbiote cœlomique cultivable sur Marine Agar a été estimé à  $4,26 \cdot 10^4$  UFC/mL (Offret et al., 2019a). De nombreuses études ont été menées sur l'identification de souches bactériennes cultivables et le recherche d'activités antibactériennes à des fins biotechnologiques (Chen et al., 2021; Offret et al., 2019a; Laport et al., 2018; Offret et al., 2016). Chez les holothuries, les principaux taxa identifiés dans le microbiote cultivable dépendent du compartiment anatomique et de l'état de santé des animaux. Parmi ceux-ci, les genres *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Bacillus* et la famille des *Flavobacteriaceae*, sont retrouvés abondamment dans le microbiote cœlomique, et les genres *Roseobacter*, *Psychrobacter* et *Shewanella* dans le microbiote gastro-intestinal (Offret et al., 2019a; León-Palmero et al., 2018; Enomoto et al., 2012).

Malgré de nombreuses études réalisées sur les souches antibactériennes isolées à partir du microbiote cultivable, il n'existe aucune donnée à ce jour sur les variations du microbiote cultivable, que ce soit à l'échelle intra-anatomique, ou bien le suivi des variations spatio-temporelles. C'est pourquoi un suivi du microbiote cultivable a été mis en place chez *H. forskali*, nouvelle espèce d'intérêt pour l'aquaculture européenne, sur 2 sites en Finistère (Bretagne, France), sur deux années consécutives, et sur trois compartiments anatomiques que sont : le liquide cœlomique, le contenu gastro-intestinal et l'épiderme.

L'objectif de cette étude est de suivre les concentrations en microbiotes cultivables dans les différents compartiments, et d'identifier des fluctuations spatio-temporelles potentielles. Ces données seront également à confronter avec les données obtenues par metabarcoding 16S.

## 7.1.2 MATERIEL ET METHODES

Pour réaliser le suivi des microbiotes cultivables intra-anatomiques de *H. forskali*, des prélèvements ont été réalisés sur deux années et deux sites.

### Site de prélèvement et collecte des animaux en milieu naturel

La collecte des individus se fait en plongée bouteille (Décision n°1048/2019 : autorisation de prélèvement à titre scientifique délivrée par la Dirnamo, par plongeur professionnel), entre -1 et -16 mètres de profondeur, sur deux sites de prélèvement situés en Finistère : l'archipel des Glénan et la pointe de Brezellec (Bretagne, France) (fig. 22A).

L'archipel des Glénan est situé dans le Sud Finistère, à 9 MN sud au large de Concarneau et est situé dans une zone Natura2000 (coordonnées WGS84 : 47°43'57.76"N et 04°00'50.99"W) (fig. 22 C, D). Sur le site des Glénan, les prélèvements d'animaux sont effectués au nord de l'Archipel, sur le site du Huic, protégé de la puissante houle de Sud-Ouest. Le site est caractérisé par des champs de gros blocs rocheux colonisés par de nombreuses macroalgues (dont *Laminaria sp.*, *Sargassum sp.*) et des algues encrustantes (notamment *Lithotamnium sp.*), encerclant de petites plages de sable (fig. 22B, C). L'accès au site de prélèvement nécessite le recours à des moyens nautiques. Les concombres de mer sont localisés sur les parois rocheuses verticales (fig. 22B).

La pointe de Brezellec est située dans la Baie de Douarnenez (coordonnées géographiques WGS84 : 48°4'15.15"N et 4°39'45.29"W), au nord du Raz de Sein (fig. 22E, F). La pointe est orientée Est, et donc protégée de la houle et des vents dominants (NO et SO). L'habitat est proche de celui des Glénan, il est constitué de champs de gros blocs, avec de petites zones de sables (fig. 22D). La zone de plongée est accessible directement de la côte.

Bien que proches géographiquement, les deux sites sont séparés par une zone caractérisée par des variations bathymétriques importantes et des courants violents : le raz de Sein. Par ailleurs, la pointe de Brezellec peut être considérée comme un point côtier, tandis que la zone de collecte aux Glénan comme un point au large.

Lors de chaque collecte, 15 animaux sont prélevés et transférés directement au laboratoire dans des bacs de transport en plastique de 50 litres. Des prélèvements d'eau de mer sont également réalisés à proximité des animaux dans des tubes à centrifuger stériles de 15 mL (n=3 par collecte).

Au total, huit collectes ont été réalisées aux Glénan et six à la Pointe de Brezellec (Tab. 2).

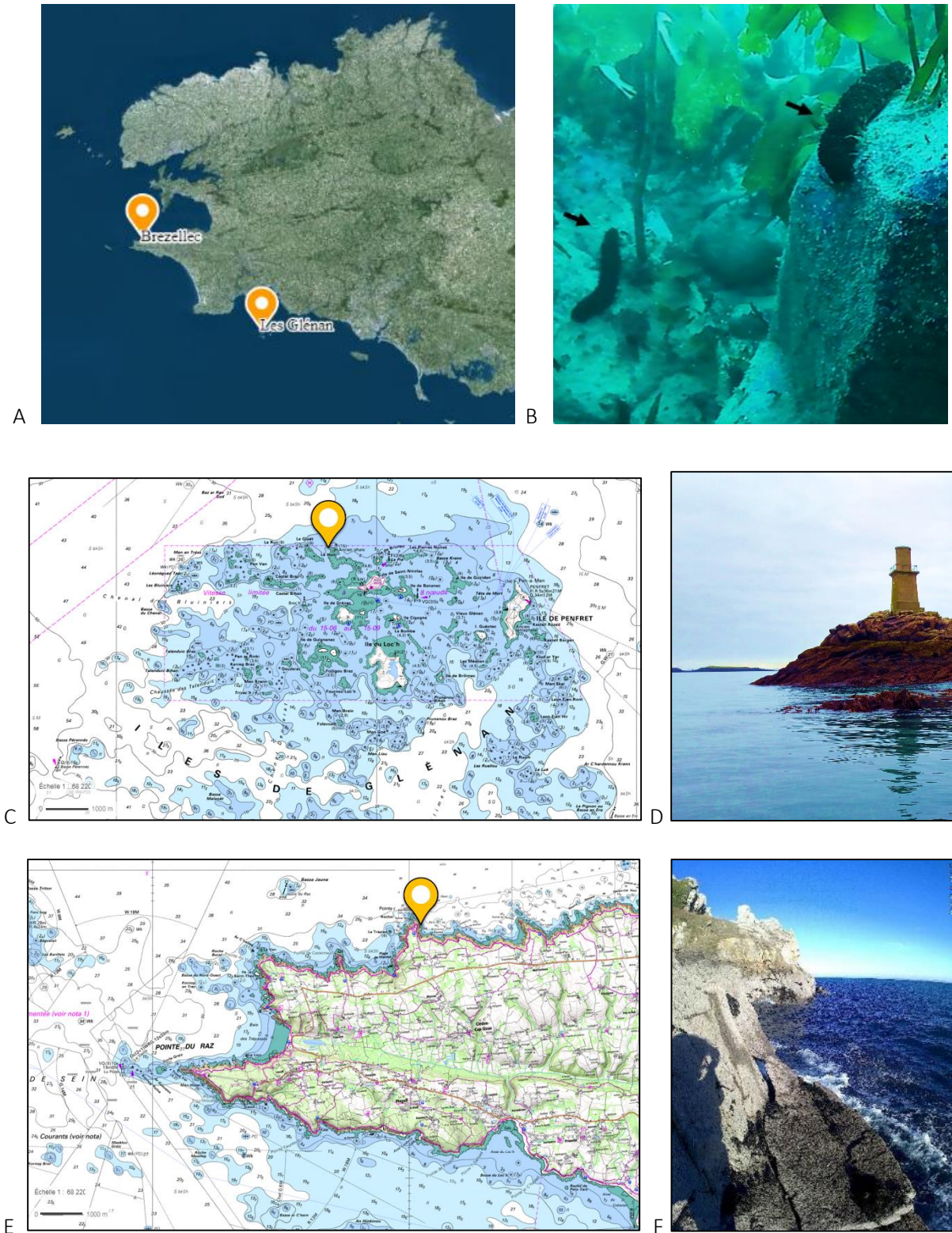


Fig. 22 : Définition des zones de collecte de *H. forskali*. A : deux spécimens de *H. forskali* dans leur habitat à Brezellec ; B : carte des zones de collecte en Finistère (Bretagne, France) ; C : vue détaillée du site Archipel des Glénan et D : photo de la zone de plongée ; E : vue détaillée du site de la Pointe de Brezellec et F : photo de la zone de collecte. Les points jaunes localisent les zones de plongées. Barre d'échelle : 1 km. Carte : geoportail.fr (fonds de carte SHOM).

Tab. 2 : Résumé des prélèvements de microbiote cultivable sur les holothuries : dates de collecte, échantillons prélevés et températures de l'eau de mer. Code : CF= microbiote cœlomique, GI = microbiote gastro-intestinal, SK = microbiote cutané ; SW = bactéries cultivables de l'eau de mer.

Périodes	Archipel des Glénan			Brézellec		
	dates	température (°C)	Echantillons	dates	température (°C)	Echantillons
hiver 2019	15/01/2019	11	EDM, GI, SK, CF	13/12/18	12	EDM, SK, GI
	27/02/19	10	EDM, CF	-	-	-
printemps 2019	30/04/19	12	EDM, GI, SK, CF	19/04/19	11	EDM, GI, SK, CF
été 2019	05/06/19	15	EDM, CF	-	-	-
automne 2019	-	-	-	18/09/19	16	EDM, GI, SK, CF
hiver 2020	22/01/20	10	EDM, GI, SK, CF	31/01/20	10	EDM, GI, SK, CF
été 2020	02/06/20	15	EDM, GI, SK, CF	26/05/20	15	EDM, GI, SK, CF
	10/06/20	15	EDM, CF	-	-	-
automne 2020	16/10/20	14	EDM, GI, SK, CF	29/09/20	16	EDM, GI, SK, CF

Au laboratoire, les individus sont pesés individuellement. Les mesures de taille ne sont pas adaptées du fait de la capacité de contraction importante des holothuries ( $\pm 1/3$  de leur taille moyenne).

### Prélèvement des fractions biologiques

Les trois fractions biologiques correspondant aux différents microbiotes étudiés sont ensuite récupérées chez les animaux : le liquide cœlomique (Smith et al., 2019), l'épiderme et le contenu gastrique.

#### Écouvillonnage de l'épiderme

Le microbiote cutané de l'animal est récupéré par écouvillonnage d'une surface de 10 cm<sup>2</sup> au milieu du dos de l'animal à l'aide d'un gabarit préalablement désinfecté (fig.23A). L'écouvillon est par la suite placé dans 5 mL d'eau de mer artificielle stérile, l'échantillon est vortexé et conservé dans de la glace avant d'être utilisé.

#### Collecte du liquide cœlomique

Le liquide cœlomique est prélevé à l'aide d'une aiguille stérile (25G) fixée sur une seringue de 2,5 mL. Au préalable, la zone de biopsie est désinfectée avec de l'alcool à 70° et l'aiguille est flambée au bec bunsen. La biopsie se fait par insertion de l'aiguille dans la cavité cœlomique au 2/3 de l'animal depuis



le pole oral, sur la face ventrale (fig. 23B). Au minimum 1,5 ml de liquide cœlomique sont prélevés et aussitôt disposés dans de la glace.

#### Récupération du contenu gastro-intestinal

Pour collecter le contenu gastrique, l'animal est disséqué. Après désinfection de l'épiderme de l'animal avec de l'alcool à 70°, une incision ventrale est opérée, selon l'axe bucco anal. Le système digestif complet (tube digestif + intestins) est ligaturé à ses extrémités et le contenu gastro-intestinal est récolté dans un tube à centrifuger stérile de 15 mL (fig. 23C). Tous les échantillons sont stockés sur glace avant traitement.

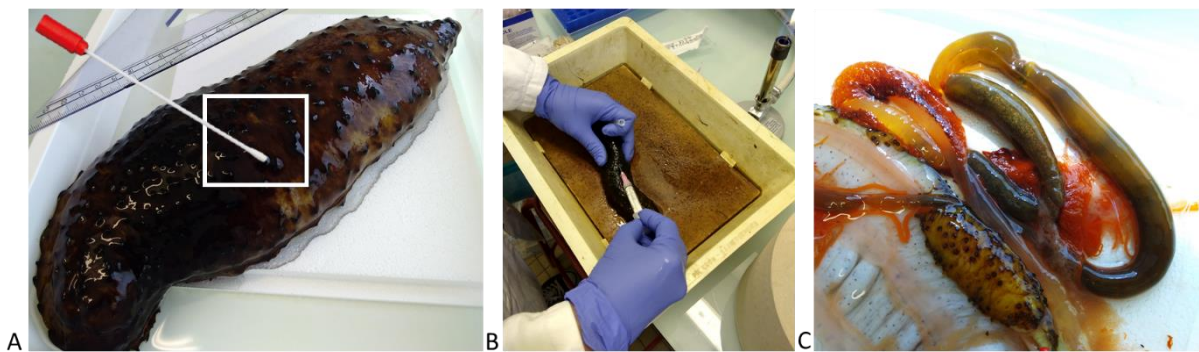


Fig. 23 : Récupération des fractions biologiques. A : Ecouvillonnage de l'épiderme (zone matérialisée par un carré blanc) ; B : Ponction du liquide cœlomique ; C : aperçu de l'ensemble du système digestif avant ligature.

#### Mise en culture et dénombrement du microbiote cultivable

Des dilutions en cascade sont opérées dans de l'eau de mer artificielle stérile pour les échantillons de microbiote cutané (1, 10<sup>ème</sup>), microbiote cœlomique (1, 10<sup>ème</sup>, 100<sup>ème</sup>), microbiote gastro-intestinal (1, 10<sup>ème</sup>, 100<sup>ème</sup>, 500<sup>ème</sup> et 1000<sup>ème</sup>) et d'eau de mer (1, 10<sup>ème</sup>, 100<sup>ème</sup>). Ensuite, 100 µl des solutions diluées et non diluées sont étalés sur milieu solide Marine Agar (Difco 2216) et les boîtes de Pétri placés en incubation à 18°C. Les boîtes sont dénombrées après trois jours d'incubation.

#### Analyses statistiques

Afin de mettre en évidence de potentielles variations liées au compartiment anatomique et/ou à l'environnement, des analyses statistiques sont conduites à partir des concentrations en microbiote cultivable sur R (R Core Team, 2021) :

- Tests non paramétriques de Kruskal-Wallis (fonction `kruskal.test`), au seuil de significativité de 0.05 ;

- Tests non paramétriques de comparaison par paires avec le test de Wilcoxon (fonction `pairwise.wilcox.test`) au seuil de significativité de 0.05.

Les graphiques de suivi des concentrations en microbiote cultivable sont réalisés sous R avec le package *ggplot2* (Wickham, 2016).

### 7.1.3 RESULTATS

Au total, 544 échantillons de fractions biologiques ont été analysés au cours des 14 campagnes de prélèvements, par approche culture-dépendante.

#### Comparaisons intra-anatomiques des microbiotes cultivables de *H. forskali*

Les moyennes des concentrations des trois microbiotes anatomiques cultivables de *H. forskali* et des bactéries cultivables de l'eau de mer diffèrent. La concentration moyenne en microbiote cœlomique cultivable est de  $5,9 \cdot 10^4 \pm 1,4 \cdot 10^5$  UFC/mL (n=197), pour le microbiote gastro-intestinal de  $9,9 \cdot 10^5 \pm 1,9 \cdot 10^6$  UFC/mL (n=157), et finalement de  $3,4 \cdot 10^2 \pm 1,1 \cdot 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> (n=146) pour le microbiote cutané (fig. 24). Pour l'eau de mer, une moyenne de  $1,8 \cdot 10^3 \pm 4,5 \cdot 10^3$  UFC/mL est dénombrée (n=44). Les résultats des tests statistiques mettent en exergue des différences significatives entre les moyennes des concentrations en microbiote cultivable selon les compartiments anatomiques, mais également avec la flore cultivable de l'eau de mer (tab. 3). Le microbiote gastro-intestinal comporte la plus forte concentration en bactéries cultivables, suivi par le microbiote cœlomique. Le microbiote cutané présente des valeurs faibles mais incomparables avec les autres moyennes de fait de l'unité (UFC/cm<sup>2</sup>).

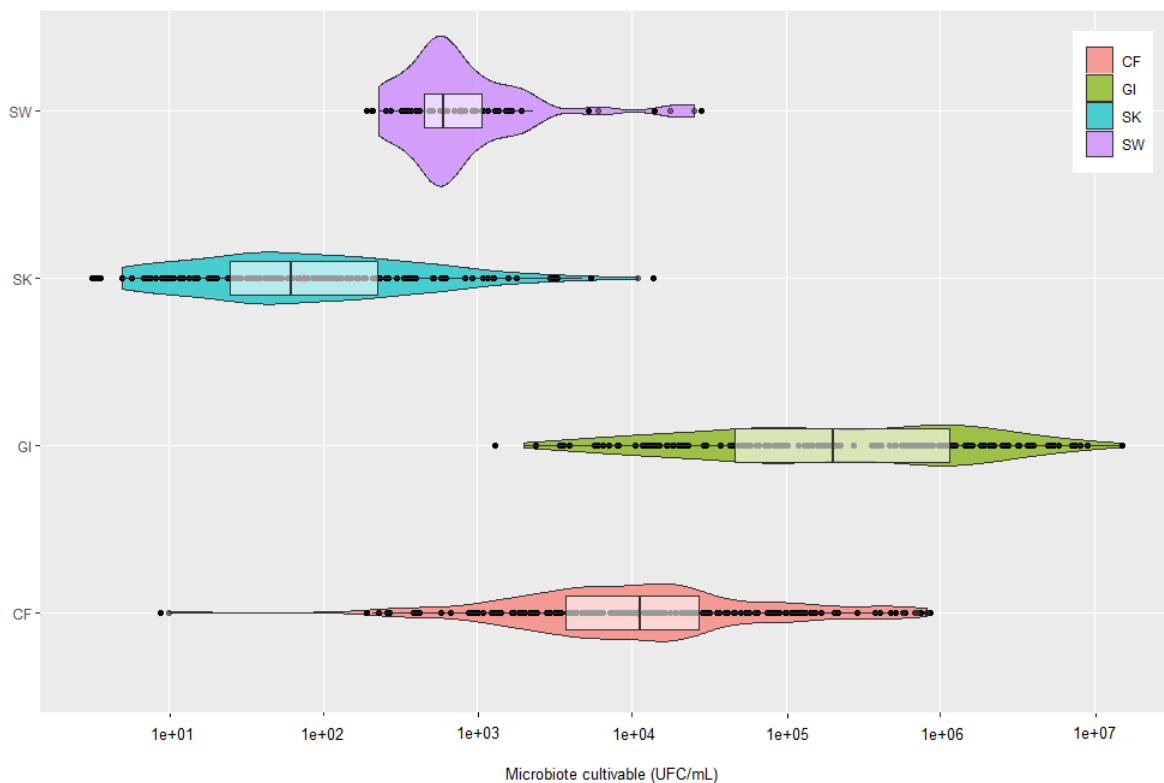


Fig. 24 : Valeurs des concentrations moyennes en microbiote cultivable dans les trois compartiments anatomiques de *H. forskali*. Code : CF= microbiote cœlomique, GI = microbiote gastro-intestinal, SK = microbiote cutané (en UFC/cm<sup>2</sup>) ; SW = bactéries cultivables de l'eau de mer.



Tab. 3 : statistiques associées à la comparaison des microbiotes cultivables des trois compartiments anatomiques de *H. forskali*. Code : CF= microbiote cœlomique, GI = microbiote gastro-intestinal, SK = microbiote cutané ; SW = bactéries cultivables de l'eau de mer.

Kruskal-Wallis rank sum test			
observations	Chi-squared	df	<i>p-value</i>
544	406.72	3	<2.2e-16
Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test			
	CF (n=197)	GI	SK
GI (n=157)	< 2e-16	-	-
SK (n=146)	< 2e-16	< 2e-16	-
SW (n=44)	< 2e-16	< 2e-16	5.10E-15

### Etude des variations spatio-temporelles des microbiotes cultivables

#### Microbiote cutané cultivable

Le microbiote cutané cultivable a été échantilloné sur les deux sites, aux Glénan (n=4 collectes) et à Brezellec (n=6 collectes). Les concentrations en microbiote cutané cultivable de *H. forskali* sont exprimées en UFC/cm<sup>2</sup> de surface d'épiderme écouvillonnée. Le suivi des concentrations en microbiote cutané cultivable montre des fluctuations importantes, en fonction de la période de collecte, et ce, sur les deux sites. En moyenne, la concentration en microbiote cutané cultivable est de  $2,4 \cdot 10^2 \pm 3,9 \cdot 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> aux Glénan, et de  $4,1 \cdot 10^2 \pm 1,4 \cdot 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> à Brezellec (fig. 25 et tab. 4). Les concentrations moyennes les plus basses sont observées en janvier 2020 pour le site des Glénan, et en mai et septembre 2020 sur le site Brezellec.

Les comparaisons interannuelles ne permettent pas de distinguer des variations saisonnières, les concentrations en cultivables étant différentes d'une année à l'autre sur la même période. Les résultats du test de Kruskal-Wallis valident un effet lié à la période de collecte sur chaque site et plus globalement de variations spatiotemporelles (tab. 5). La variable « site » seule n'influe pas sur les concentrations en microbiote cultivable.

Tab. 4: Valeurs moyennes des concentrations en microbiote cutané cultivable (en UFC /cm<sup>2</sup>)

Période (mois/année)	Glénan (n=61)		Brezellec (n=85)	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
déc-18	-	-	1.19E+03	1.49E+03
avr-19	5.75E+02	5.16E+02	8.33E+01	1.30E+02
sept-19	-	-	1.09E+03	2.89E+03
janv-20	2.70E+01	2.02E+01	2.69E+02	4.27E+02
mai-20	-	-	3.70E+01	7.57E+01
juin-20	1.46E+02	1.33E+02	-	-
sept-20	-	-	3.27E+01	5.00E+01
oct-20	1.78E+02	4.19E+02	-	-
<b>Moyenne</b>	<b>2.37E+02</b>	<b>3.95E+02</b>	<b>4.07E+02</b>	<b>1.38E+03</b>

Tab. 5 : Valeurs statistiques associées au microbiote cultivable cutané (seuil de significativité 0.05)

Kruskal-Wallis rank sum test (n=146)			
Variables	df	Chi-squared	p-value
site	1	2.9027	0.08843
période GL	3	32.113	4.953E-07 *
période BZ	5	32.27	5.25E-06 *
site*période	9	65.712	1.05E-10 *

\* significatif au seuil 0.05

### Microbiote gastro-intestinal cultivable

Au total, 73 échantillons de microbiotes gastro-intestinaux ont été collectés aux Glénan et 84 à Brezellec.

Les concentrations moyennes sur l'ensemble des collectes sur les deux sites sont de  $1,4 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^6$  UFC/mL aux Glénan, et de  $6,6 \cdot 10^5 \pm 1,8 \cdot 10^6$  UFC/mL à Brezellec (tab. 6). Les concentrations moyennes varient fortement en fonction des collectes, et une grande variabilité interindividuelle est également observée (fig.25 et tab. 6). Les concentrations les plus basses sont retrouvées en hiver aux Glénan. Les variations semblent davantage liées aux individus, surtout sur le site de Brezellec où les écarts entre individus sont importants. Par ailleurs, sur les deux années de suivi, les concentrations sont différentes à une même période.

Ces observations sont validées statistiquement, il existe des variations à la fois temporelles et spatiales des concentrations en microbiote gastro-intestinal cultivable (tab. 7).

Tab. 6 : Valeurs moyennes des concentrations en microbiote gastro-intestinal cultivable (en UFC /mL)

Période (mois/année)	Glénan (n=73)		Brezellec (n=84)	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
déc-18	-	-	9.80E+05	8.43E+05
janv-19	1.56E+05	2.48E+05	-	-
avr-19	7.85E+05	6.20E+05	1.67E+05	2.78E+05
sept-19	-	-	2.44E+06	3.84E+06
janv-20	9.99E+05	1.28E+06	1.45E+05	2.65E+05
mai-20	-	-	9.57E+04	1.13E+05
juin-20	1.59E+06	1.47E+06	-	-
sept-20	-	-	2.30E+05	3.90E+05
oct-20	3.27E+06	2.82E+06	-	-
<b>Moyenne</b>	<b>1.37E+06</b>	<b>1.86E+06</b>	<b>6.65E+05</b>	<b>1.84E+06</b>

Tab. 7 : Valeurs statistiques associées au microbiote gastro-intestinal cultivable (seuil de significativité 0.05)

Kruskal-Wallis rank sum test (n=157)			
Variables	df	Chi-squared	p-value
site	1	14.142	1.70E-04 *
période GL	4	29.908	5.11E-06 *
période BZ	5	35.456	1.22E-06 *
site*période	10	75.697	3.48E-12 *

\* significatif au seuil 0.05

#### Microbiote cœlomique cultivable

Le suivi du microbiote cœlomique cultivable sur les deux sites est basé sur 119 échantillons sur le site des Glénan et 78 échantillons sur le site de Brezellec. Les moyennes du microbiote cœlomique cultivable sur l'ensemble des collectes atteignent  $9.10^4 \pm 1,7.10^5$  UFC/mL aux Glénan, et  $1,2.10^4$  UFC/mL  $\pm 9,4.10^3$  UFC/mL à Brezellec (fig. 25, tab. 8).

Sur le site des Glénan, il apparaît une tendance saisonnière sur les concentrations en microbiote cœlomique cultivable, avec des moyennes plus importantes en périodes printanières et estivales en comparaison avec les moyennes hivernales. Sur le second site, Brezellec, les concentrations moyennes

en microbiote cœlomique cultivable fluctuent de façon inverse en comparaison avec le site de Glénan, les valeurs les plus importantes étant observées sur les périodes hivernales et automnales. Le comportement du microbiote cœlomique cultivable des deux sites apparaît donc très différent. Sur les deux années, les tendances sont relativement conservées sur un même site (fig. 25).

Par ailleurs, les résultats des tests statistiques valident l'existence de variations temporelles significatives, de variations spatio-temporelles significatives, mais des résultats plus contrastés sur l'effet « site » sur les concentrations moyennes (tab. 9).

Tab. 8 : Valeurs moyennes des concentrations en microbiote cœlomique cultivable (en UFC /mL)

Période (mois/année)	Glénan (n= 119)		Brézellec (n= 78)	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
déc-18	-	-	1.22E+04	8.39E+03
janv-19	5.58E+03	8.57E+03	-	-
févr-19	5.25E+03	3.09E+03	-	-
avr-19	1.00E+05	4.40E+04	6.26E+03	8.93E+03
juin-19	1.27E+05	2.06E+05	-	-
sept-19	-	-	1.87E+04	8.48E+03
janv-20	3.99E+03	2.40E+03	1.12E+04	8.18E+03
mai-20	-	-	2.79E+03	2.63E+03
juin-20	2.35E+05	2.60E+05	-	-
sept-20	-	-	1.95E+04	4.38E+03
oct-20	6.52E+03	4.14E+03	-	-
<b>Moyenne</b>	<b>9.04E+04</b>	<b>1.75E+05</b>	<b>1.17E+04</b>	<b>9.43E+03</b>

Tab. 9 : Valeurs statistiques associées au microbiote cœlomique cultivable (seuil de significativité 0.05)

Kruskal-Wallis rank sum test (n=197)			
Variables	df	Chi-squared	p-value
site	1	6.0616	0.01382 *
période GL	5	73.619	1.81E-14 *
période BZ	5	41.582	7.16E-08 *
site*période	11	125.96	<2.2E-16 *

\* significatif au seuil 0.05

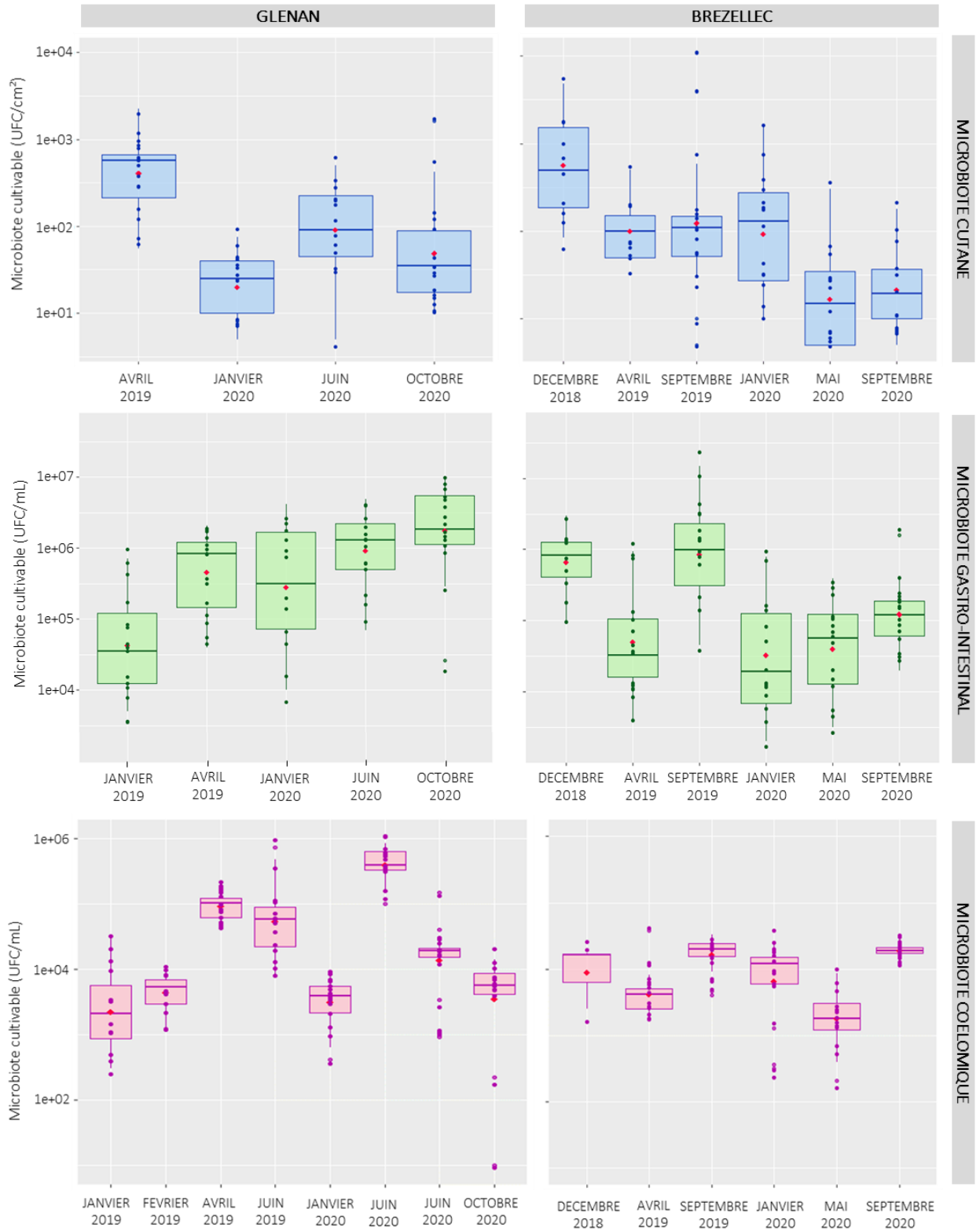


Fig. 25 : Suivi spatio-temporel des concentrations en microbiote cultivable dans les trois compartiments anatomiques de *H. forskali* sur les sites Glénan et Brezellec.

Compartiment environnemental : suivi des concentrations en bactéries cultivables de l'eau de mer

16 prélèvements d'eau de mer ont été réalisés sur les 2 années consécutives, à raison de 3 échantillons par collecte. Les concentrations moyennes en bactéries cultivables de l'eau de mer sont de  $2,8.10^2 \pm 6.10^3$  UFC/mL aux Glénan et de  $6,4.10^2 \pm 4,1.10^2$  UFC/mL à Brézellec (fig. 26, tab. 10).

Des concentrations importantes sont observées aux Glénan en janvier 2019, très probablement expliquées par la présence de bateaux de pêche en action de pêche (chalutage) à proximité de la zone de plongée, provoquant une remise en suspension de bactéries du sédiment (turbidité importante observée) (fig. 26). Après comparaison des moyennes sur les 2 années consécutives, aucune tendance saisonnière ne ressort des données, sur aucun des 2 sites. Les résultats des analyses statistiques ne permettent pas de conclure, il semble exister des variations spatio-temporelles des concentrations en bactéries cultivables (tab. 11). Toutefois, ces variations sont faibles au regard des variations observées chez les microbiotes anatomiques cultivables de *H. forskali*.

Tab. 10 : Valeurs moyennes des concentrations en bactéries cultivables dans l'eau de mer (en UFC /mL)

Période (mois/année)	Glénan (n= 24)		Brézellec (n= 20)	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
déc-18	-	-	6.00E+02	2.83E+01
janv-19	1.65E+04	9.75E+03	5.70E+02	3.97E+02
févr-19	6.83E+02	3.18E+02	-	-
avr-19	8.30E+02	1.30E+02	3.50E+02	1.82E+02
juin-19	3.27E+02	1.34E+02	-	-
sept-19	-	-	4.27E+02	8.96E+01
janv-20	4.97E+02	2.90E+02	1.01E+03	7.79E+02
mai-20	-	-	9.17E+02	5.33E+02
juin-20	1.68E+03	4.85E+02	-	-
sept-20	-	-	5.80E+02	3.61E+01
oct-20	5.93E+02	5.03E+01	-	-
<b>Moyenne</b>	<b>2.84E+03</b>	<b>6.02E+03</b>	<b>6.39E+02</b>	<b>4.13E+02</b>

Tab. 11 : Valeurs statistiques associées aux bactéries cultivables de l'eau de mer (seuil de significativité 0.05)

Kruskal-Wallis rank sum test (n=197)			
Variables	df	Chi-squared	p-value
site	1	4.4015	0.03591 *
période GL	5	14.273	0.01396 *
période BZ	6	8.9686	1.75E-01
site*période	12	26.404	9.41E-03 *

\* significatif au seuil 0.05

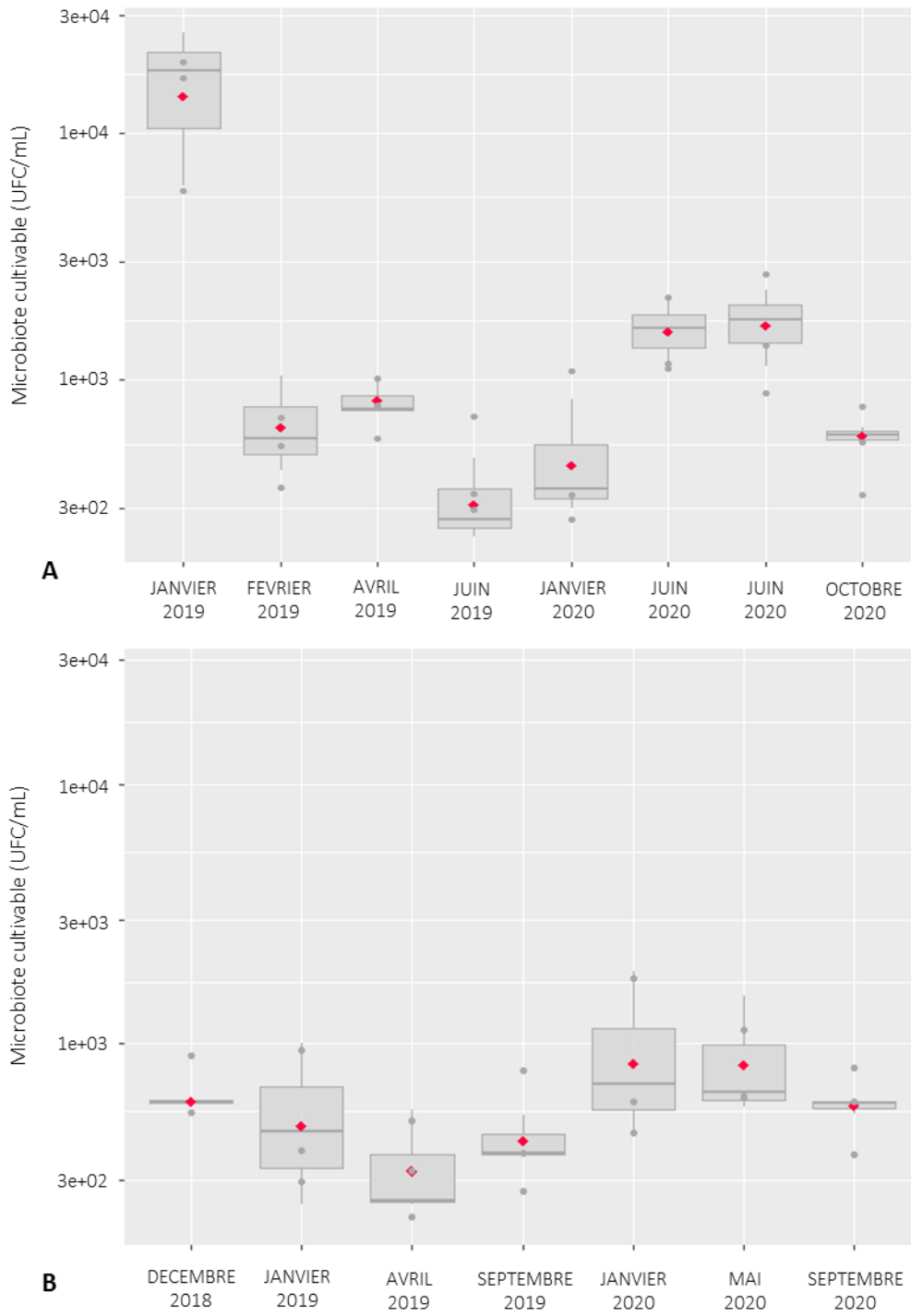


Fig. 26 : Suivi des concentrations en bactéries cultivables dans l'eau de mer aux Glénan (A) et à Brezellec (B).

## 7.2 Partie 2 : Du microbiote cultivable à la souche, sélection de souches d'intérêt biotechnologique

### 7.2.1 INTRODUCTION

De l'holobionte au microbiote, la présence de bactéries associées à un compartiment biologique donné pose la question du rôle de celles-ci. Plusieurs études démontrent les liens entre le microbiote, les grandes fonctions physiologiques et l'état de santé de l'hôte, notamment le lien entre microbiote gastro-intestinal et digestibilité (Limborg et al., 2018; Reilly et al., 2008), entre dysbiose du microbiote intestinal et obésité (Turnbaugh and Gordon, 2009), ou encore entre microbiote cutané et défense (Chiarello et al., 2018; Rebolgar et al., 2018).

De ces microbiotes, seule une faible part est cultivable, et dépendante du compartiment biologique d'origine (Enomoto et al., 2012). La culture de ces bactéries cultivables permet de rechercher des activités biologiques d'intérêt, comme des souches présentant des activités antibactériennes, ou d'autres activités enzymatiques. Ces souches d'intérêt biotechnologique peuvent devenir des candidats probiotiques à condition de remplir de très nombreux critères parmi lesquels leur facilité de culture et leur innocuité sur l'hôte considéré (Hill et al., 2014; Sanders, 2008). Ces probiotiques ont plusieurs applications possibles, depuis la santé humaine (Gill and Guarner, 2004; Kerry et al., 2018), la lutte biologique et la biostimulation en agriculture (Woo and Pepe, 2018; de Souza Vandenberghe et al., 2017), l'amélioration des performances zootechniques en agriculture (Adewole and Akinyemi, 2021; Al-Shawi et al., 2020) et aquaculture (Limborg et al., 2018; Hai, 2015; Vine et al., 2006; Verschuere et al., 2000), jusqu'à la formulation de cocktails anti-bioadhésion (Rodrigues et al., 2015; Dheilly et al., 2010). En aquaculture, certaines souches probiotiques, telles que le genre *Bacillus*, permettent de booster les performances de croissance (Adorian et al., 2019; Zhao et al., 2016; Chi et al., 2014), et/ou bien limiter la mortalité, et/ou protéger des agents pathogènes (Offret et al., 2019b; Tarnecki et al., 2019; Kapareiko et al., 2012), et/ou d'améliorer les qualités organoleptiques des produits de l'aquaculture (Huerta-Rábago et al., 2019; Nguyen et al., 2018). Le concombre de mer noir, *Holothuria forskali*, est une nouvelle espèce ciblée par l'aquaculture européenne, notamment pour la diversification des activités conchylicoles. La domestication de cette nouvelle espèce a fait l'objet d'un projet collaboratif de recherche et développement, HOLOFARM, présenté précédemment.

Au cours des campagnes de prélèvement et du suivi du microbiote cultivable, des isollements de souches bactériennes ont été réalisés, afin de constituer une souchothèque. Ensuite, une recherche d'activités biologiques a été réalisée sur les souches : des tests d'activité antibactérienne et des tests d'activité protéolytique et agarolytiques, l'objectif étant de constituer une collection de candidats probiotiques



pour l'aquaculture. L'étude du microbiote cultivable de cet hôte, et la recherche de souches bactériennes d'intérêt est une première étape vers le développement d'une aquaculture durable et saine.

## 7.2.2 MATERIEL ET METHODES

Lors des collectes réalisées dans le milieu naturel, les dénombrements de microbiote cultivable ont permis d'isoler des souches bactériennes et de constituer une souchothèque d'intérêt biotechnologique, principalement à vocation aquacole.

### Création d'une souchothèque à vocation aquacole

A partir des boîtes de dénombrement issues des collectes, des isolements de colonies sont réalisés à l'aide d'oses stériles. Les colonies isolées sont placées en culture dans 5 mL de MB (Marine Broth, Difco 2216), et placées en incubation à 18°C pour 3 jours. Les isolats sont ensuite repiqués sur MA (Marine Broth Difco 2216 et Agar Bactériologique type E). Les souches sont repiquées une seconde fois en milieu liquide puis en milieu solide pour s'assurer de la pureté des colonies isolées. Les souches qui ne présentent pas de reprise après 3 jours d'incubation, soit en milieu liquide soit en milieu solide, sont éliminées de la collection.

En parallèle, la cryopréservation des souches est opérée en microplaques 96 puits. Chaque puit est rempli de 75µl de bouillon d'isolat (culture overnight) et complété de 75 µl de glycérol à 50% (v/v). Les microplaques sont ensuite placées en cryoconservation à -80°C. Des tests de reprise après cryoconservation ont été entrepris, en déposant des spots de 2 µl sur un MA, à l'aide d'un répliqueur en métal de 96 picots.

### Criblage d'activités

Afin de sélectionner des souches selon leur potentiel biotechnologique, différents tests d'activité ont été conduits : des tests antimicrobiens et des tests protéolytiques. Les tests d'activités sont réalisés à partir des cultures d'isolats bactériens placés en microplaques 96 puits.

### Activité agarolytique

Lors des dénombrements des microbiotes cultivables, les souches bactériennes présentant une activité agarolytique sont isolées et cryoconservées dans des microplaques dédiées.

### Activité protéolytique

Un criblage sur des activités protéolytiques (activité caséinase) a été réalisé en déposant, à l'aide d'un répliqueur 96 picots, 2 µl de culture d'isolats en surface d'un milieu MA enrichi avec 10% de lait écrémé. Des dépôts de 2 µl de témoins sont réalisés : du MB stérile et la souche *Vibrio tapetis* CECT4600 comme témoins négatifs, et les 2 contrôles positifs, la protéinase K (0,1 g/mL) et la souche *Pseudoalteromonas* hCg6 (isolée à partir de l'hémolymphe de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Desriac et al., 2020; Offret et al., 2019b)) qui possède une activité protéolytique. Les boîtes sont placées en incubation pendant 2 jours à 18°C. Une activité positive, c'est-à-dire une dégradation de la caséine, se caractérise par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie. Ce test est couramment utilisé comme test de base pour rechercher une activité protéolytique, notamment sur des souches bactériennes isolées des microbiotes d'invertébrés marins (Bogatyrenko and Buzoleva, 2016; Tzuc et al., 2014).

### Activité antibactérienne

Dans un premier temps, le criblage sur des propriétés antibactériennes est réalisé sur toute la collection de souches isolées contre 6 bactéries pathogènes en aquaculture (tab. 12). Les bactéries cibles sont cultivées en milieu liquide MB, à 18°C, 30°C, ou 37°C et de 1 à 3 jours selon la souche (tab. 12) et repiquées ensuite sur MA. Les géloses de MA sont inondées pendant 15 min avec 10 mL de bouillons de bactéries pathogènes issus de cultures overnight, à une concentration finale de 10<sup>6</sup> UFC/mL. L'excès de culture est ensuite éliminé et les boîtes sont séchées pendant 1 à 2h sous hotte à flux laminaire. Un dépôt de 2 µL de chaque isolat est ensuite effectué en surface à l'aide d'un répliqueur 96 picots selon la technique décrite dans le paragraphe précédent. Les témoins positifs utilisés sont la souche bactérienne *Pseudoalteromonas* hCg6, active contre les bactéries à Gram négatif, et l'antibiotique Kanamycine (Cf = 1mg/mL), et les contrôles négatifs sont constitués de la souche *Aeromonas hydrophila* (CIP 7614) et de MB stérile (dépôts témoins 2 µl). Les boîtes sont placées en incubation à 18°C pendant 48h. Les lectures sont réalisées avec le lecteur de gel Gel Doc XR (Hercules, USA), avec le filtre flamingo. Une activité antimicrobienne positive se caractérise par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie. Les rayons des halos d'inhibition sont notés en millimètres et un score global est donné par addition de l'ensemble des rayons.

Pour les souches présentant une activité positive contre au moins un des 6 pathogènes, une seconde série de tests antibactériens est menée, contre les 6 premières souches pathogènes pour confirmation de l'activité et contre 7 nouveaux pathogènes, y compris des bactéries pathogènes de l'humain (tab. 12).

Tab. 12 : Liste des bactéries pathogènes utilisées pour le criblage antibactérien

Description						conditions de culture		
Genre	espèce	souche		Morphologie	Hôtes cibles	milieu	température (°C)	
SÉRIE 1	<i>Lactococcus</i>	<i>garviae</i>	ATCC43921	+	coques	poissons	TSB	30
	<i>Listonella</i>	<i>anguillarum</i>	NCBIM829	-	bacilles	poissons	TSB+1,5% NaCl	30
	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>	ORM4	-	bacilles	divers	MA	18
	<i>Vibrio</i>	<i>parahaemolyticus</i>	13028/A3	-	bacilles	divers	MA	18
	<i>Vibrio</i>	<i>tapetis</i>	CECT4600	-	bacilles	coquillages	MA	18
	<i>Yersinia</i>	<i>ruckeri</i>	ATCC29473	-	faucilles	poissons	TSB+1,5% NaCl	30
SÉRIE 2	<i>Aeromonas</i>	<i>caviae</i>	CIP7616	-	bacilles	poissons	TSB	30
	<i>Vagococcus</i>	<i>salmoninarum</i>	Réf. interne	-	coques	poissons	TSB	30
	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	CIP 7614	-	bacilles	poissons	TSB	30
	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	ATCC25923	+	coques	vertébrés	TSB	37
	<i>Vibrio</i>	<i>nigripulchritudo</i>	Ifremer	-	bacilles	crevettes	MA	30
	<i>Vibrio</i>	<i>aestuarianus</i>	Réf. interne	-	bacilles	coquillages	MB	18
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	ATCC25922	-	bacilles	vertébrés	TSB	37

### Détection de la flore *Vibrionaceae*

Dans le milieu aquacole, le genre *Vibrio* est souvent associé à une action négative sur les élevages, certaines espèces étant à l'origine de pathologie. C'est pourquoi il est intéressant de les identifier rapidement. Le test de pousse sur gélose sélective de TBCS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose) est une technique ayant l'avantage d'être rapide, peu coûteuse, et relativement fiable, elle permet une bonne discrimination de la flore des *Vibrionaceae* en 24 à 48h. Les géloses TCBS sont des milieux de culture sélectifs pour la détection de la flore *Vibrinaceae* et notamment de l'espèce *Vibrio cholerae*, grâce à un pH basique, sa concentration en chlorure de sodium, et la présence d'inhibiteurs de bactéries à Gram positif. Par ailleurs, il apporte visuellement des informations sur le métabolisme des colonies qui s'y développent, notamment la fermentation du saccharose (colonies jaunes), ou la production de sulfure d'hydrogène (centre de la colonie noire).

Afin de caractériser rapidement les souches appartenant à la famille des *Vibrionaceae*, les isolats, cultivés en bouillon en microplaques 96 puits, sont repiqués sur des géloses TCBS. Des spots de 2 µl de

témoins sont déposés en bas des boîtes : MB (témoin négatif), la souche *Pseudoalteromonas* hCg6 (témoin négatif), et la souche *V. parahaemolyticus* (témoin positif).

### Identification génétique des souches présentant une activité antimicrobienne

Une identification génétique est réalisée pour les souches présentant une activité antimicrobienne contre au moins un des 6 pathogènes de la première phase des tests antibactériens. Pour extraire l'ADNg des isolats, 1,5 mL de culture overnight pure sont centrifugés à 14 000 g pendant 5 minutes, puis l'ADNg est extrait avec le kit « microbial DNA extraction » de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne) selon le protocole fournisseur.

Le gène 16S de l'ADNr est ensuite amplifié avec les amorces universelles modifiées forward 24F-w18 (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), reverse 1492R-w20 (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3') et le OneTaq master mix (New England BioLabs, Ipswich, USA), selon le programme PCR suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, 30 cycles à 95°C pendant 30s, 54°C pendant 1 min, 68°C pendant 1 min, et une élongation finale à 68°C pendant 5 min. Les produits de l'amplification sont visualisés avec du SYBR™ Gold (Invitrogen, Waltham, USA) sur un gel d'électrophorèse (0,8% agarose dans du tampon 1xTAE). La concentration en ADNg est quantifiée pour 20% des échantillons, sélectionnés aléatoirement, avec le fluorimètre Qubit Fluorometer (Invitrogen, Waltham, USA).

Les échantillons sont ensuite envoyés pour séquençage du 16S à la plateforme de séquençage Sanger de GATC EUROFINs genomics (Cologne, Allemagne). Les séquences forward et reverse sont assemblées, après transformation la séquence reverse en ligne (outil « Reverse Complement », disponible sur : [https://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)), puis alignées et affiliées grâce aux bases de données 16S avec BLASTn (Altschul et al., 1990) sur le serveur NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Une identification au genre sera déterminée.

### 7.2.3 RESULTATS

Au total, 3615 souches bactériennes ont été isolées à partir des microbiotes cultivables de *H. forskali* et 55 microplaques ont été cryoconservées. Par ailleurs, des souches ont également été isolées à partir des compartiments environnementaux (n=867), c'est-à-dire l'eau de mer et le sédiment, et du microbiote cœlomique d'autres échinodermes (n=470). Ces derniers échantillons ne seront pas développés dans cette thèse.

#### Composition et cryoconservation de la souchothèque

Parmi les 3615 souches bactériennes, 1752 sont issues du microbiote cœlomique cultivable (48%), 1176 du microbiote gastro-intestinal cultivable (33%), 666 du microbiote cutané cultivable (18%) et enfin, 21 issues d'autres échantillons biologiques (tab. 13). Ces souches proviennent pour la moitié du site des Glénan (n=1594, 44%) et l'autre moitié, du site de Brezellec (n=2021, 56%).

Tab. 13 : Résumé du nombre d'isolats réalisés

Compartiment anatomique	Glénan	Brezellec	total
Liquide cœlomique	763	989	<b>1752</b>
Contenu gastro-intestinal	546	630	<b>1176</b>
Epiderme	285	381	<b>666</b>
Autres	0	21	<b>21</b>
<b>Total général</b>	<b>1594</b>	<b>2021</b>	<b>3615</b>

Au total, après cryoconservation, seules 288 souches n'ont pas reprises, ni sur MA, ni en MB, soit 8% de la collection.

#### Activités d'intérêt biotechnologique

##### Activité agarolytique

Lors des dénombrements, la concentration la plus importante en souches bactériennes agarolytiques provenait du microbiote gastro-intestinal cultivable, relativement stable au cours du temps, avec  $2.10^4$  UFC/mL en moyenne, suivi par le microbiote cœlomique cultivable avec  $3.10^2$  UFC/mL en moyenne (fig. 27). Au total, 197 bactéries agarolytiques ont été isolées et cryoconservées, 82 issues du liquide cœlomique, 91 du contenu gastro-intestinal et 24 de l'épiderme. Certaines colonies agarolytiques provoquent des dépressions dans la gélose (fig. 28A), certaines liquéfient le milieu de culture (fig. 28D), et d'autres créent des perforations (fig. 28B-C).

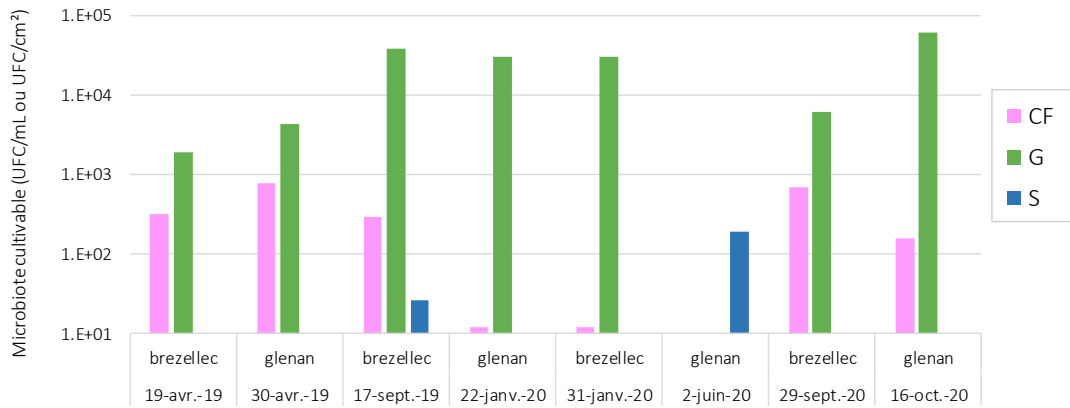


Fig. 27 : Concentrations moyennes en colonies agarolytiques dans les dénombrements du microbiote cultivable. Code : CF = liquide cœlomique ; G = contenu gastro-intestinal ; S = épiderme

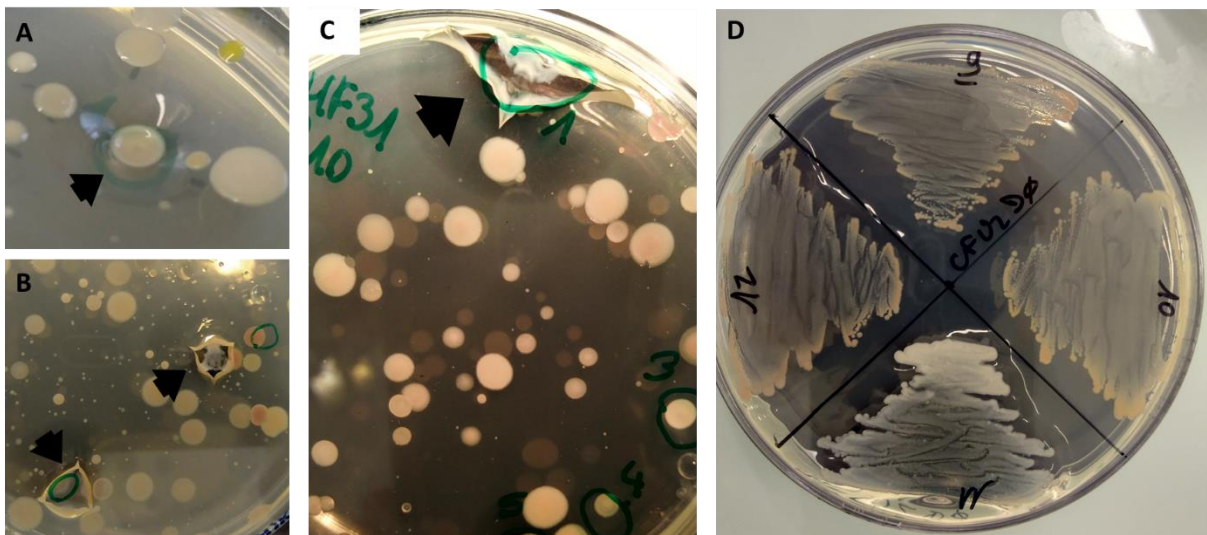


Fig. 28 : photos de souches présentant une activité agarolytique. A : colonie agarolytique formant une dépression sur le milieu de culture. B et C : souches agarolytiques provoquant des perforations du MA ; D : souches agarolytiques après isolement et repiquage.

### Activité protéolytique

Le test d'activité protéolytique fait ressortir des proportions importantes de souches présentant une activité protéolytique, soit près de la moitié des souches isolées (49,5% soit n= 1670 / 3375 souches testées) : 49,2% des souches issues du microbiote cœlomique, 51,8% des souches issus du microbiote gastro-intestinal et 44,9 % issues du microbiote cutané (fig. 29 et 30).

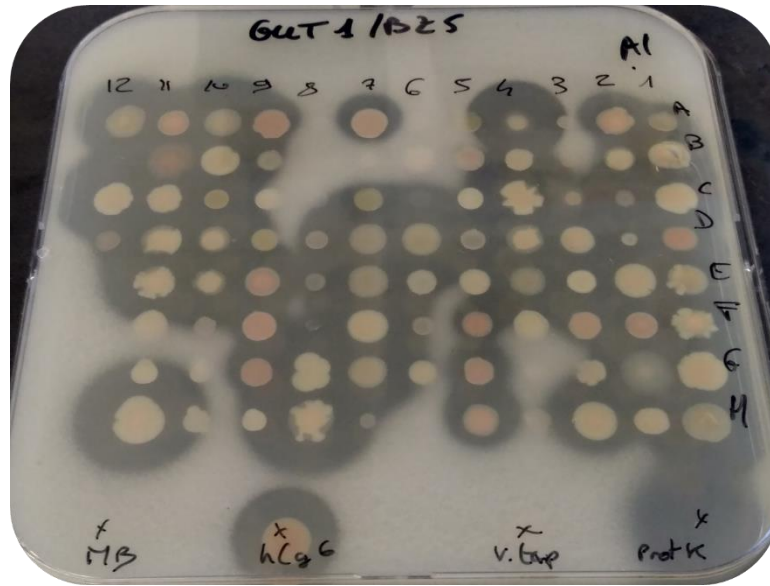


Fig. 29 : Résultat d'un test d'activités protéolytique sur des souches issues de microbiotes gastro-intestinaux. Les halos transparents reflètent une activité protéolytique.

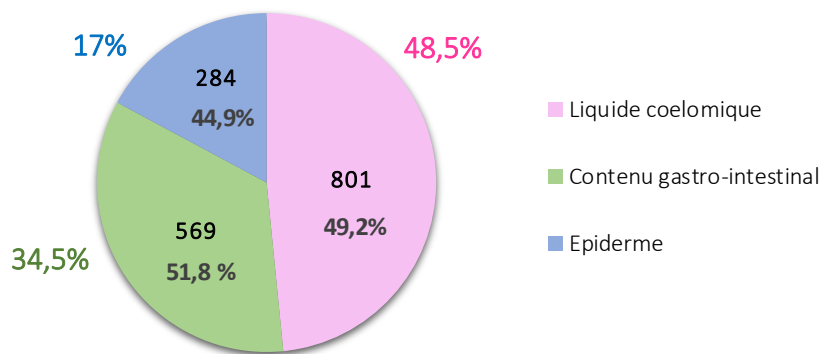


Fig. 30 : Nombre d'isolats de la souchothèque présentant une activité protéolytique par compartiment (en noir), pourcentage des souches actives du compartiment anatomique concerné (en gris), pourcentage des souches actives du compartiment considéré par rapport à l'ensemble des souches actives (en couleur).

### Activité antibactérienne

Les résultats des tests antibactériens mettent en avant 205 isolats, représentant 5,7% des souches testées (n= 3594), présentant au moins une activité antibactérienne contre un des 6 pathogènes ciblés (fig. 31 et 32). Le compartiment anatomique qui montre la proportion la plus importante de souches antibactériennes est le liquide cœlomique, avec 6,5% de souches actives (n=114), suivie par le contenu gastro-intestinal avec 5,4% (n= 63) et, finalement, l'épiderme avec 4,2% (n=28). Ces proportions sont toutefois proches d'un compartiment à l'autre.

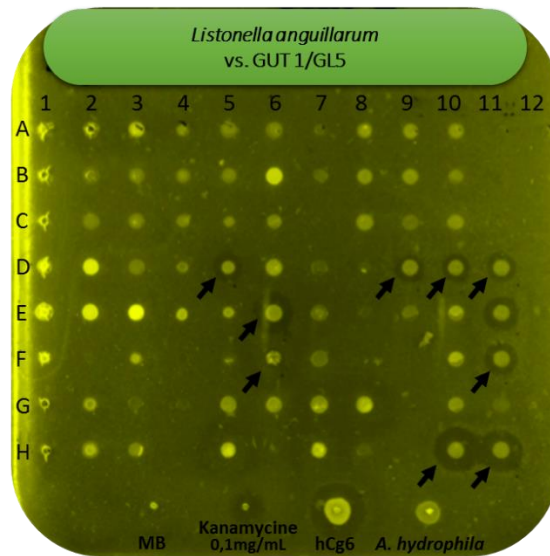


Fig. 31 : Résultat d'un test d'activité antibactérien contre *L. anguillarum*, à partir de souches isolées de contenus gastro-intestinaux. Les halos d'inhibition, témoins d'une activité antibactérienne, sont pointés avec une flèche.

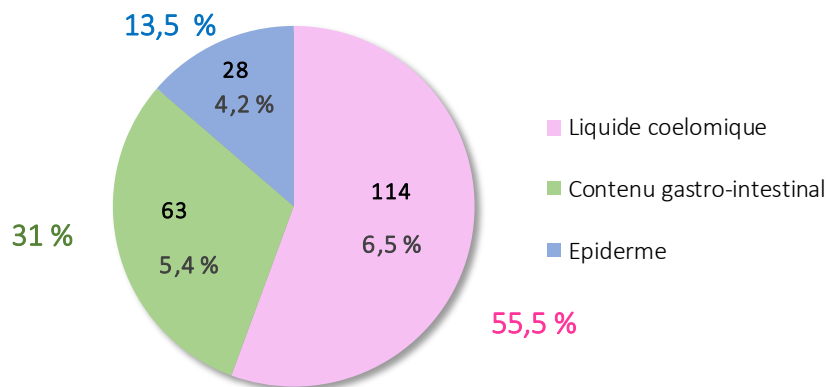


Fig. 32 : Nombre d'isolats de la souchothèque présentant une activité antibactérienne par compartiment (en noir), pourcentage des souches actives du compartiment anatomique concerné (en gris), pourcentage des souches actives du compartiment considéré par rapport à l'ensemble des souches actives (en couleur).

La 2<sup>ème</sup> série de criblage, menée contre 14 pathogènes au total, valident 96 souches qui présentent au moins une activité antimicrobienne, parmi lesquelles 60 souches coelomiques (53% de l'activité conservée), 23 souches gastro-intestinales (37% de l'activité conservée) et 13 souches cutanées (soit 46% de l'activité conservée). Une diminution de l'activité antimicrobienne est donc observée entre les 2 séries de criblages.

### Identification de la flore *Vibrionaceae*

Au total, 3410 souches ont été testées sur gélose TCBS. Une pousse est observée pour 47% des isolats, signifiant que près de la moitié des souches constituant la souchothèque est assimilée à la famille des *Vibrionaceae* (fig. 33, 34). En fonction des compartiments anatomiques, l'abondance des *Vibrionaceae*



cultivables diffère : 67,9 % pour les souches gastro-intestinales, 39 % pour les souches coelomiques, et 31,5 % pour les souches cutanées (fig. 34).

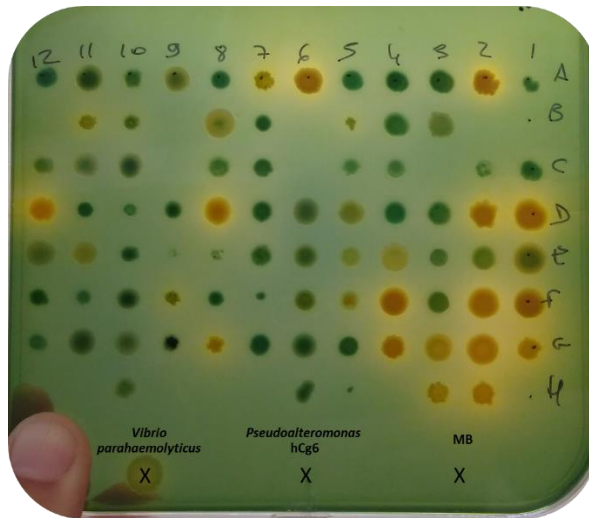


Fig. 33 : Résultat d'un test de pousse sur gélose TCBS. Les colonies jaunes révèlent une activité saccharose +.

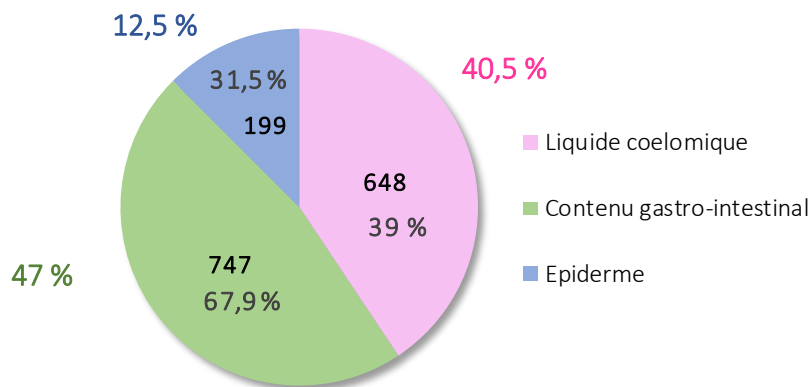


Fig. 34 : Nombre d'isolats de la flore *Vibrionaceae* de la souchothèque par compartiment (en noir), pourcentage des souches *Vibrionaceae* du compartiment anatomique concerné (en gris), et pourcentage des souches *Vibrionaceae* du compartiment considéré par rapport à l'ensemble des souches *Vibrionaceae* (en couleur).

### Identification génétique des souches antibactériennes

Au total, 142 souches ont été séquencées sur les 205 souches antibactériennes détectées, soit 69%. Des souches n'ont pas pu être identifiées, soit du fait d'échecs successifs de séquençage, soit parce qu'elles n'ont pas repris après cryoconservation. Sur les 142 souches identifiées, 78 proviennent du microbiote coelomique cultivable, 40 du microbiote gastro-intestinal cultivable, et 24 du microbiote cutané cultivable.

Les souches antibactériennes appartiennent au phylum des Proteobacteria en majorité (87% des souches identifiées) (fig. 35A). Au rang taxonomique de l'ordre, les Alteromonadales représentent plus de la moitié des souches (54%, n= 76), suivies des Vibrionales qui représentent 23 % des souches (n=33)

et les Bacillales (7%, n= 10) (fig. 35B). L'identification au genre fait ressortir 3 genres qui atteignent 75 % des souches : les genres *Shewanella* (n=37, 26%), *Pseudoalteromonas* (n=36, 25%) et *Vibrio* (n=33, 23 %) (fig. 35C).

En fonction des compartiments anatomiques d'origine, les genres bactériens diffèrent (fig. 35D). Dans le liquide coelomique, les souches antibactériennes cultivables appartiennent majoritairement aux genres *Pseudoalteromonas* (36 % des souches), *Vibrio* (19%) et *Shewanella* (14%). Les Alteromonadales représentent donc 53 % des souches coelomiques cultivables, et les Vibrionales 19%.

Dans le microbiote gastro-intestinal, les bactéries antibactériennes de la collecte sont constituées principalement de Gammaproteobacteria (95%) et des genres *Shewanella* (52%) et *Vibrio* (35%).

Finalement, dans le microbiote cutané cultivable, les souches antibactériennes cultivables appartiennent pour 50% aux Alteromonadales également. Les genres les plus abondants sont les *Pseudoalteromonas*, les *Shewanella*, les *Pseudomonas* et les *Vibrio*, qui accumulent à eux seuls 63%.

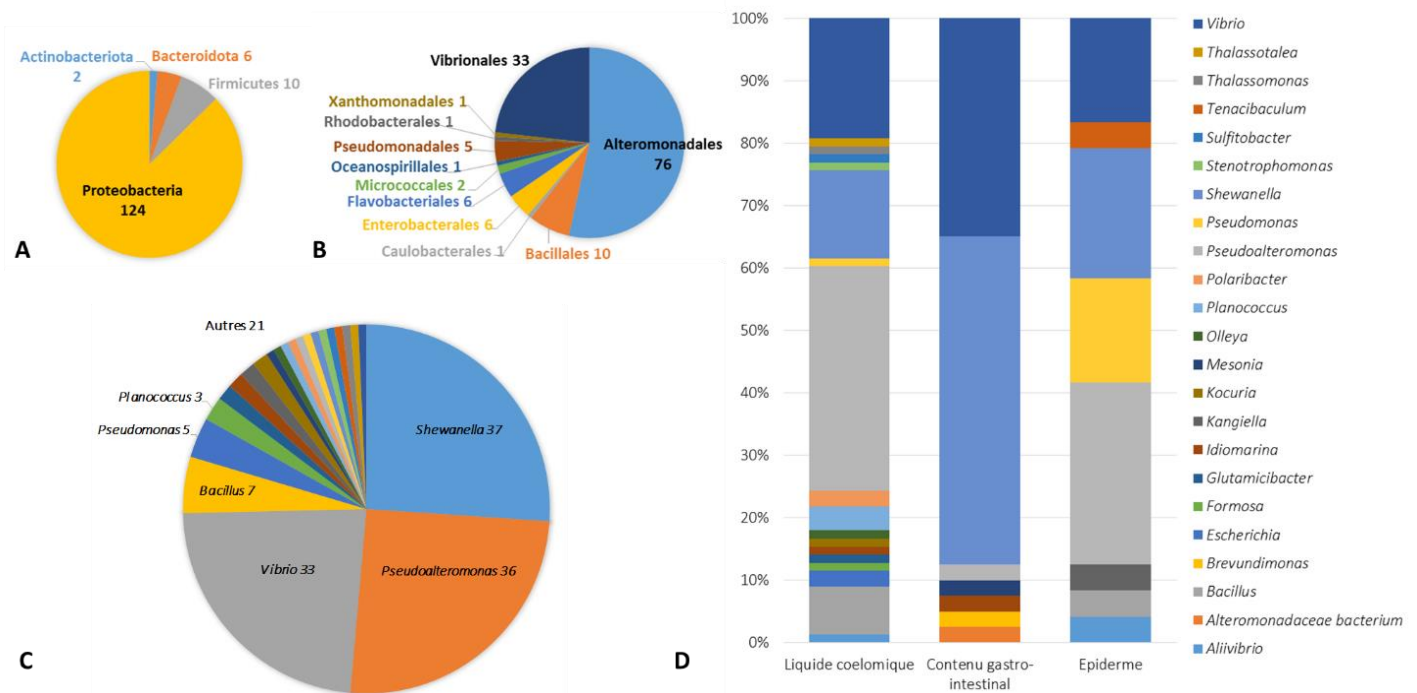


Fig. 35 : Identification des souches antibactériennes. A-C : Abondance relative des taxons bactériens dans l'ensemble des compartiments anatomiques et nombre de souches, par phylum (A), ordre (B) et genre (C). Les chiffres représentent le nombre de souches à activité antibactérienne. D : Distribution des abondances relatives des genres bactériens par compartiment anatomique d'origine.

## Activités globales des souches antibactériennes sélectionnées

Sur les 142 souches antibactériennes, 80% présentent également une activité protéolytique (tab. 14). Parmi les genres les plus représentés, le genre *Shewanella* (n= 37), présente un score total sur les tests antibactériens de 5 par souche, et possède des activités protéolytiques pour 70 % des souches. Pour les souches de *Pseudoalteromonas* (n= 36), le score total moyen est de 11, et parmi ce genre figurent 50 % de souches protéolytiques. Chez les *Vibrio* (n= 33), le score antibactérien moyen est de 7, et 79 % des souches démontrent d'une activité protéolytique.

Tab. 14: Synthèse de l'ensemble des activités des 142 souches antimicrobiennes. Code couleur : activité croissante du bleu vers le rouge.

Genres	Nombre d'isolats	Moyenne score activité antimicrobienne			Nombre d'isolats protéolytiques
		série 1	série 2	total	
<i>Aliivibrio</i>	2	2	1	5	1
<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	1	1	0	2	1
<i>Bacillus</i>	7	3	3	10	3
<i>Brevundimonas</i>	1	1	5	6	1
<i>Escherichia</i>	2	3	4	10	1
<i>Formosa</i>	1	1	1	4	1
<i>Glutamicibacter</i>	1	1	1	7	1
<i>Idiomarina</i>	2	6	1	6	2
<i>Kangiella</i>	1	2	0	2	1
<i>Kocuria</i>	1	4	0	10	0
<i>Mesonina</i>	1	3	0	3	1
<i>Mucus bacterium</i>	1	1	0	2	1
<i>Olleya</i>	1	3	2	5	1
<i>Planococcus</i>	3	1	1	4	3
<i>Polaribacter</i>	2	3	1	4	2
<i>Pseudoalteromonas</i>	36	2	8	11	36
<i>Pseudomonas</i>	4	2	1	4	2
<i>Shewanella</i>	37	2	2	5	26
<i>Stenotrophomonas</i>	1	1	1	2	1
<i>Sulfitobacter</i>	1	3	2	10	1
<i>Tenacibaculum</i>	1	3	1	4	1
<i>Thalassomonas</i>	1	1	0	3	0
<i>Thalassotalea</i>	1	1	0	2	0
<i>Vibrio</i>	33	2	2	7	26

## 7.3 DISCUSSION

Ainsi, après 15 collectes réalisées et 230 animaux échantillonnés, pendant 2 ans sur 2 sites finistériens, un suivi des concentrations en microbiote cultivable des 3 compartiments anatomiques de *H. forskali* a été réalisé et une souchothèque de 3615 souches a été constituée.

### Des concentrations variables en microbiote cultivable

Les concentrations en microbiote cultivable sont significativement différentes entre les 3 compartiments analysés, mais également différentes de la concentration en bactéries cultivables de l'eau de mer. Ces différences peuvent être expliquées, d'une part, par la nature des taxa présents dans chaque compartiment, certains taxa étant favorisés par le milieu de culture ou bien plus facile à cultiver que d'autres. Par ailleurs, le pH des compartiments anatomiques diffère, sélectionnant probablement en partie les bactéries cultivables. Le Marine Agar (Difco, 2216) est un des milieux les plus utilisés en écologie microbienne marine.

### Microbiote cutané cultivable

Le microbiote cutané présente des concentrations en bactéries cultivables de l'ordre de  $3,4 \cdot 10^2 \pm 1,1 \cdot 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>. En comparaison, chez *A. japonicus*, le microbiote cutané cultivable est décrit entre  $1,7 \cdot 10^3$  et  $1,1 \cdot 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> sur un milieu de culture APY Agar (Enomoto et al., 2012). De nombreuses boîtes sans colonies ont été observées pour chaque collecte (seuil de détection : concentration <5 UFC/cm<sup>2</sup>). Bien qu'en contact direct avec l'environnement, les concentrations en bactéries cultivables de l'épiderme sont faibles. Les données obtenues par metabarcoding 16S font ressortir une richesse faible et une abondance en Proteobacteria bien supérieure dans le microbiote cutané en comparaison avec les autres compartiments animaux et environnementaux, notamment liée la présence d'une famille surabondante, les *Rhizobiaceae*. L'ensemble de ces résultats peuvent avoir plusieurs justifications : soit le microbiote cutané de *H. forskali* est composé en grande partie de bactéries non cultivables sur Marine Agar, et/ou ce microbiote est sélectionné par l'holobionte, et/ou bien lié aux variations de l'environnement et notamment de ses communautés bactériennes.

### Un microbiote gastro-intestinal cultivable variable et renfermant des souches agarolytiques

Le microbiote gastro-intestinal de *H. forskali* comporte des concentrations moyennes en bactéries cultivables de  $1,4 \cdot 10^6$  UFC/mL sur le site des Glénan et de  $6,7 \cdot 10^5$  UFC/mL à Brezellec. Les données existantes chez *A. japonicus* révèlent des concentrations variables de l'ordre entre  $1,8 \cdot 10^4$  à  $2,6 \cdot 10^5$  UFC/mL sur un milieu de culture APY Agar (Enomoto et al., 2012). Le microbiote gastro-intestinal est en contact indirect avec l'environnement, au travers de l'alimentation de l'animal. Les concentrations en

microbiote gastro-intestinal cultivable présentent des variations spatio-temporelles. Les concentrations en microbiote cultivable sont supérieures pour les animaux collectés sur le site des Glénan, en pleine mer, en comparaison avec le site côtier de Brezellec. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus par metabarcoding 16S, montrant des spécificités spatiales, se traduisant notamment la présence de taxons associés à un site donné. Cette différence spatiale peut être liée aux ressources alimentaires de l'animal. Par ailleurs, ces mêmes ressources alimentaires peuvent aussi expliquer les variations temporelles observées, et également l'état physiologique de l'hôte. En fonction de la saison, la composition de la biocénose évolue et par la même, la source alimentaire de *H. forskali*. De plus, avant la reproduction (février – avril), les holothuries diminuent leur alimentation et allouent leurs ressources énergétiques à la maturation sexuelle et la reproduction (mars – mai). Elles se réalimentent ensuite à la fin de la période de reproduction pour reconstituer leurs réserves énergétiques. Le microbiote gastro-intestinal est ainsi un compartiment qui reflète en partie l'environnement de l'hôte et l'état physiologique de l'animal.

Parmi ces souches gastro-intestinales cultivables, une concentration importante de souches agarolytiques est observée lors des dénombrements ( $2.10^4$  UFC/mL). Les bactéries agarolytiques dégradent l'agarose, un polysaccharide présent dans les algues rouges (Lee et al., 2017). De nombreuses souches bactériennes marines possèdent des activités agarolytiques, tels que les genres *Pseudoalteromonas* (Khalifa and Aldayel, 2019), *Vibrio* (Yu et al., 2020), *Arthrobacter* (Prabhakaran Pillai et al., 2018), ou encore *Agarivorans* (Du et al., 2011; Kurahashi and Yokota, 2004). Ces souches sécrètent des agarases, enzymes capables d'hydrolyser l'agar des algues (Hu et al., 2009). Des hypothèses ont été émises sur la source alimentaire de *H. forskali* à partir de débris végétaux en partie (David et al., 2020; Boncagni et al., 2019), la présence de souches bactériennes agarolytiques abondantes dans le microbiote gastro-intestinal de *H. forskali* va dans le sens de ces premières hypothèses. Par ailleurs, dans les travaux de David (David et al., 2020), la présence de certains acides gras et pigments présents dans le contenu gastro-intestinal n'est pas expliquée par la nature de l'aliment ingéré, suggérant que le microbiote digestif peut potentiellement contribuer à cette amélioration nutritionnelle (David et al., 2020).

### Le liquide cœlomique cultivable

Le liquide cœlomique, qui est le compartiment anatomique le plus interne de l'hôte *H. forskali*, présente des valeurs moyennes en bactéries cultivables de l'ordre de  $5,9.10^4$  UFC/mL, en accord avec les dénombrements observés chez la même espèce sur Marine Agar, de l'ordre de  $4,26.10^4$  UFC/mL (Offret et al., 2019a), et entre  $1,3.10^3$  et  $8,4.10^3$  UFC/mL chez *A. japonicus* (Enomoto et al., 2012). Le microbiote cœlomique cultivable présente des variations spatio-temporelles. Ces observations peuvent trouver

différentes explications parmi lesquelles figurent l'état physiologique de l'animal, et l'impact de l'environnement sur l'animal, ce compartiment étant le siège de l'immunité et d'autres fonctions physiologiques fondamentales chez les échinodermes (Smith et al., 2018).

### Un microbiote cultivable source de candidats probiotiques

Dans un cadre réglementaire de plus en plus drastique et face aux nouvelles attentes des consommateurs, des défis majeurs se dessinent en faveur d'une aquaculture durable. La limitation de la production d'effluents et la diminution de la proportion des farines de poissons dans les aliments constituent les objectifs de travail en aquaculture (Burel, 2017; Guillaume J., 1999). Ainsi, la formulation de nouveaux aliments complétés en probiotiques peut constituer une solution, et agir en stimulant le microbiote intestinal de l'hôte (Limborg et al., 2018).

Près de la moitié des souches isolées des microbiotes (n=1670) présentent une activité protéolytique, ce qui constitue une activité intéressante en vue d'une application en tant que probiotiques aquacoles. De nombreuses bactéries marines produisent des protéases intra et extracellulaires (Hoffman and Decho, 2000), jouant un rôle important dans le recyclage de la matière organique (Li et al., 2017), et notamment dans le cycle de l'azote (Li et al., 2017; Mrkonjic Fuka et al., 2007). Dans les productions aquacoles d'ormeaux, l'utilisation de souches bactériennes marines produisant des protéases a ainsi été proposée pour améliorer la digestibilité des granulés aquacoles (Amin, 2018).

Les bactéries marines issues des microbiotes des organismes marins représentent une source de composés antimicrobiens (Desriac et al., 2020; Offret et al., 2019, 2016; Destoumieux-Garzón et al., 2016; Desriac et al., 2014; Li et al., 2014; Defer et al., 2010), notamment chez les holothuries (Offret et al., 2019; León-Palmero et al., 2018; Santos et al., 2015; Mohammadizadeh et al., 2013; Gowda et al., 2008; Farouk et al., 2007). Parmi les souches antibactériennes issues des microbiotes cultivables de *H. forskali*, 205 possèdent une activité antibactérienne contre des souches bactériennes pathogènes en aquaculture, soit 5,7% de la souchothèque créée.

Sur les 142 souches identifiées, 33 souches (23%) ont été affiliées au genre *Vibrio*. Les *Vibrio* constituent un genre ubiquiste dans le milieu marin, opportuniste et présent en abondance dans les microbiotes des invertébrés marins, y compris l'holothurie (León-Palmero et al., 2018; Enomoto et al., 2012). Quelques études proposent l'utilisation de souches de *Vibrio* comme candidats probiotiques (Kapareiko et al., 2011). Cependant, de nombreuses espèces de *Vibrio* sont associées à des épizooties en aquaculture, notamment *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. aestuarianus* en conchyliculture en France (Offret et al., 2019b; Pernet et al., 2016; Travers, 2008; Austin and Zhang, 2006; Paillard et al., 2006; Gay et al., 2001).

36 souches à activité antibactérienne appartenant au genre *Pseudoalteromonas* (25%) ont été identifiées. Le genre *Pseudoalteromonas* est très fréquent dans le monde marin et dans les microbiotes des organismes marins, dont les holothuries (León-Palmero et al., 2018; Enomoto et al., 2012). Le genre *Pseudoalteromonas* est couramment décrit comme produisant des composés antibactériens (Bowman, 2007; Holmström and Kjelleberg, 1999). Le LBCM a identifié de nombreuses souches antibactériennes, notamment les *Pseudoalteromonas* hCg-6 (Offret et al., 2019b), *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66 hOe-124 et hOe-125 (Cuny et al., 2021), et caractérisé leurs composés, des cyclolipopeptides appelés altérines (Desriac et al., 2020; Offret et al., 2016).

7 souches de *Bacillus* (5%) ont été identifiées parmi les souches antimicrobiennes. Le genre *Bacillus* est clairement associé aux applications probiotiques, chez différents hôtes, depuis l'homme jusqu'aux invertébrés marins (Adorian et al., 2019; Tarnecki et al., 2019; Kapareiko et al., 2012). Parmi les souches décrites comme probiotiques en aquaculture, les espèces *B. pumilus* (Gao et al. 2017; Srisapomee and Areechon 2017), *B. subtilis* (Kapareiko et al., 2012) et *B. aquimaris* (Ma et al., 2020; Nguyen et al., 2018; Ngo et al., 2016) sont prépondérantes. L'avantage du développement de probiotiques à partir de *Bacillus* est sa facilité de culture en général (cryopréservation, lyophilisation, tolérance sur les milieux de culture, thermo tolérance ...), notamment lié au fait que ce genre sporule (Lee et al., 2019; Elshagabee et al., 2017).

Des souches affiliées à d'autres genres ont démontré une activité antibactérienne, notamment le genre *Shewanella*, ubiquiste et associé au microbiote de l'holothurie (León-Palmero et al., 2018; Enomoto et al., 2012), une souche de *Tenacibaculum*, genre souvent associé à des maladies telles que la ténacibaculose chez les poissons (Nowlan et al., 2020; Avendaño-Herrera et al., 2006) ou le syndrome d'ulcération chez les concombres de mer (Wang et al. 2015), et les genres opportunistes *Stenotrophomonas* (Bayer-Santos et al., 2019; Brooke, 2012) et *Polaribacter* (Bowman, 2006).

L'identification du microbiote cultivable, au travers de ses souches à activité antibactérienne, démontre d'une dominance des Proteobacteria, et plus précisément des Alteromonadales et des Vibrionales, en accord avec les résultats obtenus par metabarcoding dans les travaux de thèse, et dans les études du microbiote de *H. forskali* (León-Palmero et al., 2018) et plus globalement des holothuries (Pagán-Jiménez et al., 2019; Gao et al., 2014; Enomoto et al., 2012).

Finalement, deux souches à activité antibactérienne ont été plus spécifiquement étudiées: la souche *Pseudoalteromonas* cfHf56-1, issue du microbiote coelomique, qui présente également une activité algicide, et la souche *Bacillus pumilus* sHf15-3, issue du microbiote cutané, qui s'est révélée capable de former des biofilms. La souche sHf15-3 présente un fort potentiel, du fait de son affiliation taxonomique au genre *Bacillus*, sa facilité de culture, et l'existence de travaux antérieurs décrivant cette espèce

comme probiotique aquacole (Gao et al. 2017; Srisapoome and Areechon 2017). Ces souches feront l'objet de travaux et valorisations ultérieurs.

Ce travail de sélection de souches sur des activités d'intérêt biotechnologique est la première étape nécessaire d'un long processus vers le développement de candidats probiotiques en aquaculture.







# **Conclusion générale & Perspectives**



## 8. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Depuis le développement des nouvelles technologies de séquençage, notre connaissance des écosystèmes marins a largement évolué (Sogin et al., 2006), et de nombreuses souches bactériennes non cultivables ont ainsi pu être découvertes. De l'écosystème à l'holobionte, les études foisonnent et permettent d'illustrer davantage les interactions entre hôte – microbiote – environnement (Rosenberg et al., 2007).

La thèse « Microbiote des Echinodermes : Spécificité et plasticité des microbiotes chez *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) » avait pour objectif principal de réaliser l'inventaire du microbiote de *H. forskali* dans plusieurs conditions, et comme objectif secondaire de constituer une souchothèque à destination de l'aquaculture. Pour se faire, des collectes de concombres de mer ont été réalisées en milieu naturel, en parallèle sur 2 sites pendant 2 années consécutives. Au total, plus de 240 holothuries ont été collectées dans le milieu naturel (n=15 individus par collecte), au cours de 16 campagnes de prélèvement, constituant un échantillonnage conséquent.

L'analyse du microbiote a combiné 2 approches, une approche culture-indépendante par Metabarcoding 16S (région V4) et séquençage Illumina MiSeq, et une approche culture dépendante visant notamment à constituer une souchothèque.

Il s'est avéré difficile de comparer et corrélérer les données obtenues par ces 2 approches, du fait des choix opérés en microbiologie pasteurienne classique, et notamment sur la sélection des souches.

### Existence d'un microbiote spécifique chez les échinodermes

Nous avons analysé et comparé le microbiote de 3 espèces d'échinodermes occupant la même niche écologique, à savoir l'holothurie noire *H. forskali*, l'étoile de mer glaciale *M. glacialis*, et l'oursin *S. granularis*. Le microbiote cœlomique été sélectionné car ce liquide physiologique n'est pas en contact direct avec l'environnement, parce qu'il joue un rôle essentiel chez les échinodermes (Smith et al., 2018). Les résultats obtenus par metabarcoding 16S valident l'existence de microbiotes cœlomiques distincts chez les 3 espèces d'échinodermes, avec la présence importante de taxons spécifiques à chaque hôte. Parmi ces 3 espèces, le microbiote de l'holothurie présente les richesses et diversités les plus importantes, mais également la concentration en bactéries cultivables la plus forte.

En se focalisant sur le microbiote de *H. forskali*, nous avons montré qu'il variait au cours de son cycle de vie, et en fonctions de paramètres de l'environnement (fig. 36). Ainsi, la composition du microbiote a

été établie à 4 phases clés du cycle de vie : la phase embryonnaire, la phase larvaire, le stade juvénile et le stade adulte reproducteur de l'holothurie noire (fig. 36).

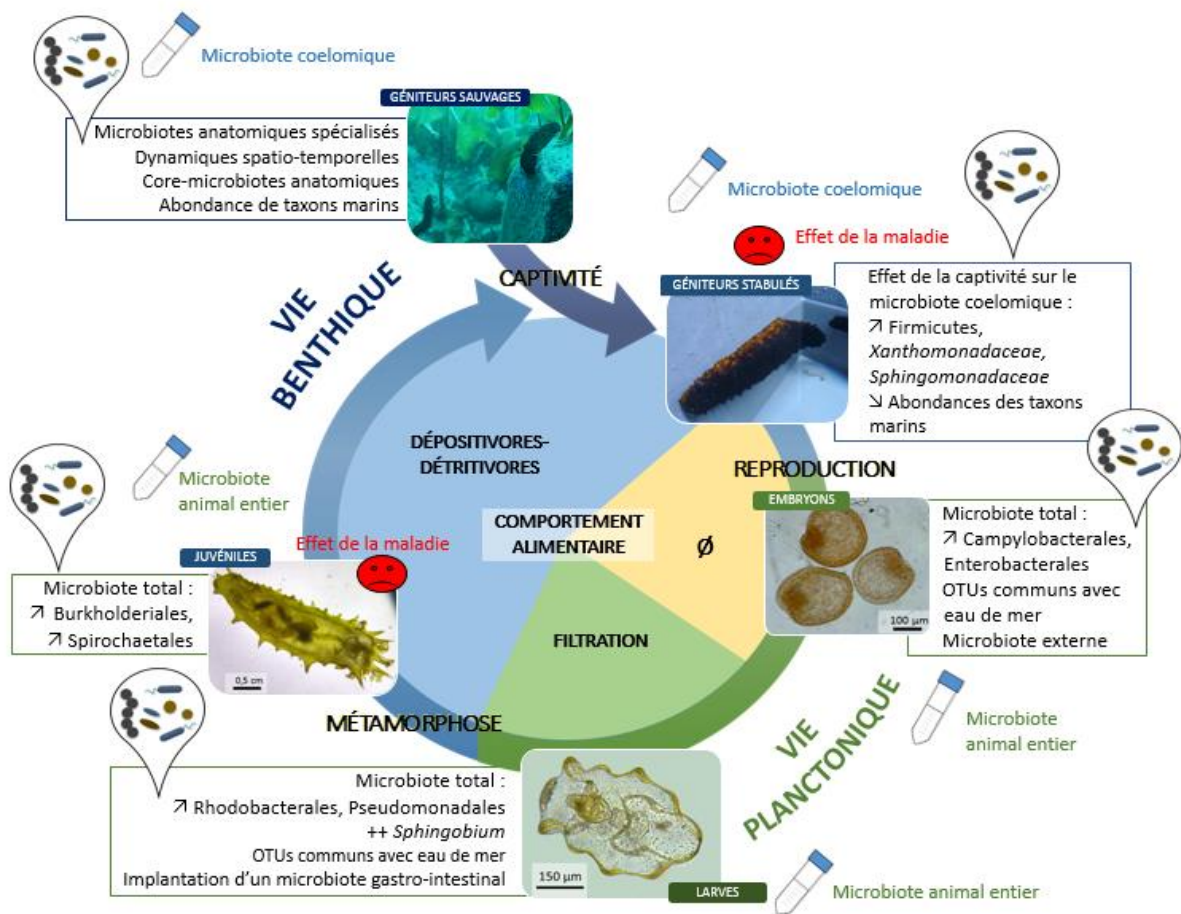


Fig. 36 : Plasticité et évolution des microbiotes de *H. forskali* au cours de sa vie

### Un microbiote compartimenté et spécialisé chez les adultes reproducteurs

Chez les adultes reproducteurs ou géniteurs, les travaux de thèse ont mis en exergue l'existence de microbiotes anatomiques distincts (fig. 37). Cette compartimentation du microbiote est un fait biologique chez les vertébrés mais également chez les mollusques bivalves et les étoiles de mer (King et al., 2021; Dubé et al., 2019; Rossbach et al., 2019; Jackson et al., 2018; Lokmer et al., 2016). Il en ressort des microbiotes anatomiques distincts, qui présentent des variations spatio-temporelles plus ou moins marquées, en accord avec les données de suivi des concentrations en microbiote cultivable.

Les résultats obtenus sur le microbiote coelomique par metabarcoding à partir de 197 échantillons collectés sur 2 sites et 2 années consécutives (11 périodes échantillonnées), mettent en avant la plasticité et la spécificité du microbiote coelomique en fonction du temps et de l'espace. De plus, nous avons montré la modification des communautés bactériennes du liquide coelomique après plusieurs

mois de captivité. Par ailleurs, la présence d'OTUs partagés uniquement entre les communautés bactériennes de l'eau de mer et le microbiote du liquide coelomique semble indiquer des échanges entre ces 2 compartiments biologiques. De surcroît, l'isolement de 2 souches antibactériennes identiques, l'une à partir du microbiote coelomique de *H. forskali*, la souche *Pseudoalteromonas* cf *Hf56-1* et l'autre à partir de l'eau de mer, la souche *Pseudoalteromonas* SW25-2, vient étayer cette hypothèse et suggère une sélection du microbiote par l'holobionte. Afin d'illustrer les échanges entre le milieu extérieur et le liquide coelomique, des balnéations des animaux en milieu contrôlé et fermé, avec différentes souches bactériennes sont envisagées.

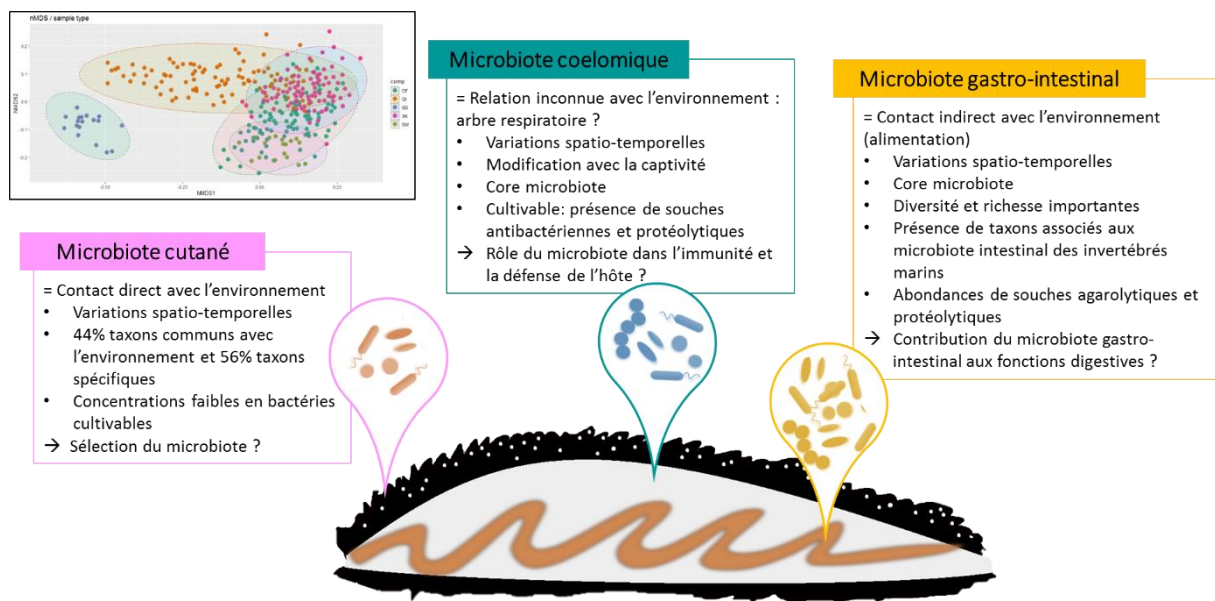


Fig. 37 : Existence de microbiotes anatomiques différenciés chez *H. forskali*

Un argument supplémentaire en faveur de la spécificité et l'originalité de ce compartiment biologique est la présence de souches bactériennes présentant des activités antibactériennes (~6,5% des souches isolées). Le liquide coelomique est le siège de l'immunité chez les échinodermes, notamment grâce aux coelomocytes. La présence de ces souches antibactériennes interroge sur leur rôle dans l'homéostasie de l'animal et notamment dans la défense de l'holobionte. En effet ces souches pourraient constituer un bouclier microbien et participer à la modulation des populations bactériennes de ce microbiote.

Afin de comprendre le rôle de ce microbiote, et notamment des souches antibactériennes isolées, des tests *in vitro* pourraient être conduits en culture cellulaire, en associant coelomocytes et microbiotes. Les interactions entre bactéries et coelomocytes pourraient être analysées par une approche multi-omic en combinant transcriptomique et metabarcoding pour visualiser l'impact des bactéries sur les coelomocytes et réciproquement.

Le microbiote gastro-intestinal de *H. forskali* comporte un core microbiote important de 109 OTUs, prévalent et présent sur les 2 sites de l'étude. Ces « taxons core » pourraient être considérés comme un microbiote endémique du système digestif jouant un rôle nécessaire dans les fonctions digestives de l'hôte. Pour les communautés bactériennes ponctuelles, présentes occasionnellement ou non prévalentes, nous pouvons poser l'hypothèse d'une modulation liée à l'environnement, à un changement de la source alimentaire, nécessitant une spécialisation temporaire du microbiote (Rodriguez Barreras et al., 2021; Gobet et al., 2018; Pierce et al., 2016). De plus, les variations spatio-temporelles de ce microbiote gastro-intestinal, observées à la fois par metabarcoding 16S et par des techniques cultures-dépendantes, suggère des modulations du microbiote. De même, le régime alimentaire influence le microbiote gastro-intestinal chez de nombreuses espèces animales. En mésocosmes, cet impact de l'alimentation sur le microbiote total a pu être mesuré chez des juvéniles de *H. forskali* soumis à différents régimes alimentaires. Outre les résultats sur les modifications des compositions des microbiotes et les performances zootechniques, l'expérimentation a permis de valider le comportement alimentaire stades post-métamorphose de *H. forskali*, à savoir un régime à partir de détritux algaux en partie, et de fèces. Ce comportement alimentaire contribue probablement à l'enrichissement du microbiote intestinal des holothuries par transfert horizontal et/ou vertical. L'étude du microbiote cultivable va dans le sens de ces hypothèses : la présence de souches présentant des activités agarolytiques et protéolytiques en grande proportion parmi le microbiote cultivable du système digestif suggère la fonction de ce microbiote chez l'hôte.

L'analyse du microbiote cutané, à la fois par metabarcoding 16S et par des approches cultures-dépendantes, a mis en avant les spécificités de ce compartiment anatomique. Le microbiote cutané est composé d'une abondance en Proteobacteria plus importante en comparaison avec des autres microbiotes, et plus précisément d'une famille majoritaire, les *Rhizobiaceae*, qui accumulent à elles seules 68% de l'abondance totale. Les *Rhizobiaceae* constituent une famille hétérogène composée de bactéries à Gram négatif, principalement aérobies. De nombreuses espèces de cette famille ont été décrites comme symbiontes des plantes, contribuant à la fixation de l'azote (Carareto Alves et al., 2014). De plus, les familles des *Sphingomonadaceae* et des *Xanthomonadaceae* (Proteobacteria) présentent des abondances relatives supérieures aux autres compartiments. Bien qu'étant un compartiment externe et donc en contact direct et permanent avec les communautés bactériennes de l'environnement, une concentration en bactéries cultivables faible et une richesse et diversité en OTUs moins importantes que dans les autres compartiments anatomiques de l'holothurie et de l'eau de mer ont été observées. En outre, la présence de taxons spécifiques suggère une sélection du microbiote par l'holobionte, et un rôle potentiel de barrière de ce microbiote cutané.

### Acquisition et spécialisation du microbiote dès les premiers stades de vie

Les études sur l'acquisition, les modalités de transfert, et l'évolution du microbiote au cours du cycle de vie des invertébrés marins sont anecdotiques. Dès les premiers stades embryonnaires, l'imprégnation de l'environnement est effective sur la partie externe de l'embryon, le blastoderme. Le microbiote évolue au stade larvaire Auricularia, stade au cours duquel la larve planctonique commence à s'alimenter par filtration de l'eau, et pourrait constituer une étape clé de l'implantation et l'installation du microbiote gastro-intestinal (Carrier and Reitzel, 2020; Carrier et al., 2017). La 3<sup>ème</sup> modification importante du microbiote est observée après la métamorphose, où la larve passe d'une vie planctonique et d'une alimentation par filtration, à un stade juvénile caractérisé par une vie benthique et un régime alimentaire de détritivore – dépositivore. Au cours du cycle de vie de l'holothurie *H. forskali*, des transmissions horizontales de communautés bactériennes sont observées, et ce, par des modalités d'imprégnations variables en fonction du stade de vie. De plus, une spécialisation du microbiote est observée dès les premiers stades de vie. Le microbiote est donc un reflet du stade de vie de l'hôte.

### Prévenir l'émergence de maladie chez *H. forskali*

Des symptômes apparentés au SKUD ont été observés chez *H. forskali*, chez des juvéniles et géniteurs en aquaculture. Les microbiotes des animaux malades diffèrent de ceux des animaux sains, et les résultats montrent la présence de genres bactériens opportunistes voire pathogènes. L'utilisation du metabarcoding 16S a permis d'identifier plusieurs bactéries pathogènes potentielles, parmi lesquels figure le genre *Tenacibaculum*, abondants sur les plaies des individus infectés et absents des individus sains. Cette étude préliminaire a donc permis de pointer l'existence de la maladie SKUD chez cette « nouvelle » espèce d'holothurie, et permettra à l'avenir de porter attention à l'émergence de maladies et infections. Des souches bactériennes ont été isolées à partir de prélèvements réalisés sur les plaies, et ont été cryoconservées en vue d'une utilisation ultérieure. Afin de valider ces résultats, il serait intéressant de réaliser dans un premier temps des tests de pathogénicité in vitro, et, finalement, valider les résultats in vivo, par des tests d'infection volontaire à des holothuries (par balnéation ou injection dans la cavité cœlomique) en enceintes confinées.

### De la plasticité à la résilience des microbiotes

L'ensemble de ces résultats, obtenus par Metabarcoding 16S, montrent à la fois la spécificité et la plasticité des microbiotes de *H. forskali*, lui conférant une plasticité face à l'environnement, mais également l'existence d'un core microbiote, plus résilient, qui lui, contribue à l'homéostasie de l'hôte (Risely, 2020; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2016; Rosenberg et al., 2007). L'effort d'échantillonnage a permis de s'affranchir des biais pré- et post-séquençage, et d'obtenir des résultats



statistiquement interprétables pour la définition de core microbiotes. Les comportements des microbiotes anatomiques de *H. forskali* divergent en fonction des paramètres de son environnement et de l'état physiologique de l'hôte. Ainsi, chaque compartiment contient une « part variable » de son microbiote, et une « part fixe », résidente, c'est-à-dire le core microbiote. Un core, ou plutôt des core microbiotes ont ainsi été défini selon la nomenclature de Risely (Risely, 2020) : un core commun, représentatif des échinodermes ou de l'hôte *H. forskali*, des cores écologiques spécifiques (compartiments anatomiques) et des cores temporels (associés au stade de vie). Afin de comprendre le rôle joué par les core-microbiotes chez l'hôte, il serait judicieux de combiner les approches multi-omics, notamment associer du metabarcoding à de la métabolomique.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- Abdelrhman, K.F.A., Bacci, G., Marras, B., Nistri, A., Schintu, M., Ugolini, A., and Mengoni, A. (2017). Exploring the bacterial gut microbiota of supralittoral talitrid amphipods. *Res. Microbiol.* 168, 74–84.
- Adewole, D., and Akinyemi, F. (2021). Gut Microbiota Dynamics, Growth Performance, and Gut Morphology in Broiler Chickens Fed Diets Varying in Energy Density with or without Bacitracin Methylene Disalicylate (BMD). *Microorganisms* 9, 787.
- Adorian, T.J., Jamali, H., Farsani, H.G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T., and Roozbehfar, R. (2019). Effects of Probiotic Bacteria *Bacillus* on Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, and Hematological Parameters of Asian Sea Bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11, 248–255.
- Aguirre de Cárcer, D. (2018). The human gut pan-microbiome presents a compositional core formed by discrete phylogenetic units. *Sci. Rep.* 8, 14069.
- Ainsworth, T.D., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J.-B., Zakrzewski, M., Gates, R.D., Padilla-Gamiño, J.L., Spalding, H.L., Smith, C., et al. (2015). The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *ISME J.* 9, 2261–2274.
- Akamine, J. (2004). The status of the sea cucumber fisheries and trends in Japan: past and present. p. 39–47. *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. A. Lovatelli (comp./ed.); Conand, C; Purcell, S.; Uthicke, S.; Hamel, J-F; Mercier, A. (eds.). FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome, FAO
- De Albuquerque, F.P., de Oliveira, J.L., Moschini-Carlos, V., and Fraceto, L.F. (2020). An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. *Sci. Total Environ.* 700, 134868.
- Al-Shawi, S.G., Dang, D.S., Yousif, A.Y., Al-Younis, Z.K., Najm, T.A., and Matarneh, S.K. (2020). The Potential Use of Probiotics to Improve Animal Health, Efficiency, and Meat Quality: A Review. *Agriculture* 10, 452.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Amin, M. (2018). Marine protease-producing bacterium and its potential use as an abalone probiont. *Aquac. Rep.* 12, 30–35.
- Anderson, S., Flemming, J., Watson, R., and Lotze, H. (2011). Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish Fish.* 12, 317–339.
- Ando, H., Mukai, H., Komura, T., Dewi, T., Ando, M., and Isagi, Y. (2020). Methodological trends and perspectives of animal dietary studies by noninvasive fecal DNA metabarcoding. *Environ. DNA* 2, 391–406.
- Anslan, S., Mikryukov, V., Armolaitis, K., Ankuda, J., Lazdina, D., Makovskis, K., Vesterdal, L., Schmidt, I.K., and Tedersoo, L. (2021). Highly comparable metabarcoding results from MGI-Tech and Illumina sequencing platforms. *PeerJ* 9, e12254.
- Appanna, V.D. (2018). The Human Microbiome: The Origin. In *Human Microbes - The Power Within: Health, Healing and Beyond*, V.D. Appanna, ed. (Singapore: Springer), pp. 1–36.
- Apprill, A. (2017). Marine Animal Microbiomes: Toward Understanding Host–Microbiome Interactions in a Changing Ocean. *Front. Mar. Sci.* 4, 222.

- Arnone, M., Byrne, M., and Martínez, P. (2015). Echinodermata. In: Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates. Vol 6 (Deuterostomia). Springer : A. Wanninger (ed), Vienne.
- Asmani, K., Petton, B., Le Grand, J., Mounier, J., Robert, R., and Nicolas, J.-L. (2016). Establishment of microbiota in larval culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 464, 434–444.
- Astudillo-García, C., Bell, J.J., Webster, N.S., Glasl, B., Jompa, J., Montoya, J.M., and Taylor, M.W. (2017). Evaluating the core microbiota in complex communities: A systematic investigation: Core microbiota in complex communities. *Environ. Microbiol.* 19, 1450–1462.
- Austin, B., and Zhang, X.-H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 119–124.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A., and Magarinos, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: A review. *Dis. Aquat. Organ.* 71, 255–266.

## B

- Baird, D.J., and Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Mol. Ecol.* 21, 2039–2044.
- Barros, I., Froufe, H., Marnellos, G., Egas, C., Delaney, J., Clamp, M., Santos, R.S., and Bettencourt, R. (2018). Metatranscriptomics profile of the gill microbial community during *Bathymodiolus azoricus* aquarium acclimatization at atmospheric pressure. *AIMS Microbiol.* 4, 240–260.
- Battaglione, S.C., Seymour, J.E., and Ramofafia, C. (1999). Survival and growth of cultured juvenile sea cucumbers, *Holothuria scabra*. *Aquaculture* 178, 293–322.
- Bayer-Santos, E., Cenens, W., Matsuyama, B.Y., Oka, G.U., Sessa, G.D., Mininel, I.D.V., Alves, T.L., and Farah, C.S. (2019). The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* utilizes a type IV secretion system for interbacterial killing. *PLOS Pathog.* 15, e1007651.
- Becker, P.T., Egea, E., and Eeckhaut, I. (2008). Characterization of the bacterial communities associated with the bald sea urchin disease of the echinoid *Paracentrotus lividus*. *J. Invertebr. Pathol.* 12.
- Bellec, L., Bonavita, M.-A.C., Hourdez, S., Jebbar, M., Tasiemski, A., Durand, L., Gayet, N., and Zeppilli, D. (2019). Chemosynthetic ectosymbionts associated with a shallow-water marine nematode. *Sci. Rep.* 9, 1–14.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C.C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G.H., et al. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8, 103.
- Binyon, J. (1972). Chapter 8 - Physiology of the water vascular system and the neural control of locomotion. In *Physiology of Echinoderms*, J. Binyon, ed. (Pergamon), pp. 124–146.
- Björk, J.R., Díez-Vives, C., Astudillo-García, C., Archie, E.A., and Montoya, J.M. (2019). Vertical transmission of sponge microbiota is inconsistent and unfaithful. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 1172–1183.
- Björk, J.R., O’Hara, R.B., Ribes, M., Coma, R., and Montoya, J.M. (2017). The dynamic core microbiome: Structure, dynamics and stability (Ecology).
- Blasiak, L., Zinder, S., Buckley, D., and Hill, R. (2013). Bacterial diversity associated with the tunic of the model chordate *Ciona intestinalis*. *ISME J.* 8.
- Bogatyrenko, E.A., and Buzoleva, L.S. (2016). Characterization of the gut bacterial community of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Microbiology* 85, 116–123.
- Boncagni, P., Rakaj, A., Fianchini, A., and Vizzini, S. (2019). Preferential assimilation of seagrass detritus by two coexisting Mediterranean sea cucumbers: *Holothuria polii* and *Holothuria tubulosa*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 231, 106464.
- Booolootian, R.A. (1966). *Physiology of Echinodermata* (Interscience Publishers).

- Bordenstein, S.R., and Theis, K.R. (2015). Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biol.* 13, e1002226.
- Botté, E.S., Nielsen, S., Abdul Wahab, M.A., Webster, J., Robbins, S., Thomas, T., and Webster, N.S. (2019). Changes in the metabolic potential of the sponge microbiome under ocean acidification. *Nat. Commun.* 10, 4134.
- Bowman, J.P. (2007). Bioactive Compound Synthetic Capacity and Ecological Significance of Marine Bacterial Genus *Pseudoalteromonas*. *Mar. Drugs* 5, 220–241.
- Bowman, J.P. (2006). The Marine Clade of the Family *Flavobacteriaceae*: The Genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salagentibacter*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter* and *Zobellia*. In *The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (New York, NY: Springer), pp. 677–694.
- Boxberger, M., Cenizo, V., Cassir, N., and La Scola, B. (2021). Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome* 9, 125.
- Brener-Raffalli, K. (2017). Dynamique de l'holobionte corallien et plasticité transcriptomique: variabilité interindividuelle, interpopulationnelle et interspécifique. Université de Perpignan Via Domitia.
- Britt, A., Bernini, M., McSweeney, B., Dalapati, S., Duchin, S., Cavanna, K., Santos, N., Donovan, G., O'Byrne, K., Noyes, S., et al. (2020). The effects of atrazine on the microbiome of the eastern oyster: *Crassostrea virginica*. *Sci. Rep.* 10, 11088.
- Brooke, J.S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 2–41.
- Bukin, Yu.S., Galachyants, Yu.P., Morozov, I.V., Bukin, S.V., Zakharenko, A.S., and Zemskaya, T.I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci. Data* 6.
- Burel, C. (2017). Bases de la nutrition et formulation en aquaculture. In *Durabilité Des Aliments Pour Le Poisson En Aquaculture : Réflexions et Recommandations Sur Les Aspects Technologiques, Économiques, Sociaux et Environnementaux*, (UICN - Union Internationale pour la Conservation de la Nature), 296 p.
- Bush, A., Compson, Z.G., Monk, W.A., Porter, T.M., Steeves, R., Emilson, E., Gagne, N., Hajibabaei, M., Roy, M., and Baird, D.J. (2019). Studying Ecosystems With DNA Metabarcoding: Lessons From Biomonitoring of Aquatic Macroinvertebrates. *Front. Ecol. Evol.* 7.
- Butt, R.L., and Volkoff, H. (2019). Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Front. Endocrinol.* 10, 9.
- Byrd, A.L., Belkaid, Y., and Segre, J.A. (2018). The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 143–155.

## C

- Calle, M.L. (2019). Statistical Analysis of Metagenomics Data. *Genomics Inform.* 17.
- Carareto Alves, L.M., de Souza, J.A.M., Varani, A. de M., and Lemos, E.G. de M. (2014). The Family *Rhizobiaceae*. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 419–437.
- Carrier, T.J., Beaulieu, S.E., Mills, S.W., Mullineaux, L.S., and Reitzel, A.M. (2021). Larvae of Deep-Sea Invertebrates Harbor Low-Diversity Bacterial Communities. *Biol. Bull.* 241, 65–76.
- Carrier, T.J., and Reitzel, A.M. (2020). Symbiotic Life of Echinoderm Larvae. *Front. Ecol. Evol.* 7, 509.

- Carrier, T.J., and Reitzel, A.M. (2018). Convergent shifts in host-associated microbial communities across environmentally elicited phenotypes. *Nat. Commun.* 9, 1–9.
- Carrier, T.J., Macrander, J., and Reitzel, A.M. (2017). A microbial perspective on the life-history evolution of marine invertebrate larvae: if, where, and when to feed.
- Chen, L., Wang, X.-Y., Liu, R.-Z., and Wang, G.-Y. (2021). Culturable Microorganisms Associated with Sea Cucumbers and Microbial Natural Products. *Mar. Drugs* 19, 461.
- Chen, M., Wang, F., Xing, K., Zhu, A., and Zhang, S. (2015). Immunology and Diseases. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, (Elsevier), pp. 257–287.
- Chi, C., Liu, J.-Y., Fei, S.-Z., Zhang, C., Chang, Y.-Q., Liu, X.-L., and Wang, G.-X. (2014). Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of *A. japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 38, 367–373.
- Chiarello, M., Auguet, J.-C., Bettarel, Y., Bouvier, C., Claverie, T., Graham, N.A.J., Rieuvilleneuve, F., Sucre, E., Bouvier, T., and Villéger, S. (2018). Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet. *Microbiome* 6, 147.
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., and Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat. Protoc.* 15, 799–821.
- Chopin, T. (2013). Integrated Aquaculture Multi-trophic (IMTA). In *Sustainable Food Production*, P. Christou, R. Savin, B.A. Costa-Pierce, I. Misztal, and C.B.A. Whitelaw, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 184–205.
- Cicala, F., Cisterna-Céliz, J.A., Moore, J.D., and Rocha-Olivares, A. (2018). Structure, dynamics and predicted functional role of the gut microbiota of the blue (*Haliotis fulgens*) and yellow (*H. corrugata*) abalone from Baja California Sur, Mexico. *PeerJ* 6, e5830.
- Cleary, D.F.R., Becking, L.E., Polónia, A.R.M., Freitas, R.M., and Gomes, N.C.M. (2016). Jellyfish-associated bacterial communities and bacterioplankton in Indonesian Marine lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92.
- Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.-M., Gueguen, Y., Dégremont, L., Mitta, G., and Toulza, E. (2020). Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Front. Microbiol.* 11.
- Clerissi, C., Lorgeril, J. de, Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.-M., Gueguen, Y., Mitta, G., and Toulza, E. (2018). Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters. *BioRxiv* 378125.
- Conand, C., and Byrne, M. (1993). A Review of Recent Developments in the World Sea Cucumber Fisheries. *Mar. Fish. Rev.* 55.
- Corell, J., and Rodriguez-Ezpeleta, N. (2014). Tuning of protocols and marker selection to evaluate the diversity of zooplankton using metabarcoding. *Rev. Investig. Mar.* 21, 19–39.
- Cuny, H., Offret, C., Boukerb, A.M., Parizadeh, L., Lesouhaitier, O., Le Chevalier, P., Jégou, C., Bazire, A., Brillet, B., and Fleury, Y. 2021 (2021). *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov., a new bacterial species harboured by the flat oyster *Ostrea edulis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71, 005070.

## D

- Damjanovic, K., van Oppen, M.J.H., Menéndez, P., and Blackall, L.L. (2019). Experimental Inoculation of Coral Recruits With Marine Bacteria Indicates Scope for Microbiome Manipulation in *Acropora tenuis* and *Platygyra daedalea*. *Front. Microbiol.* 10.
- Dang, H., Zhang, T., Yi, F., Ye, S., Liu, J., Li, Q., Li, H., and Li, R. (2019). Enhancing the immune response in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* by addition of Chinese herbs *Houttuynia cordata* Thunb as a food supplement. *Aquac. Fish.* 4, 114–121.

- Dan-Sohkawa, M., Morimoto, M., and Kaneko, H. (1995). In Vitro Reactions of Coelomocytes against Sheep Red Blood Cells in the Solitary Ascidian *Halocynthia roretzi*. *Zoolog. Sci.* 12, 411–417.
- David, F., Hubas, C., Laguerre, H., Badou, A., Herault, G., Bordelet, T., and Ameziane, N. (2020). Food sources, digestive efficiency and resource allocation in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea): Insights from pigments and fatty acids. *Aquac. Nutr.* 26, 1568–1583.
- Defer, D., Bourgougnon, N., and Fleury, Y. Recherche d'activités antimicrobiennes chez des mollusques marins. Purification et caractérisation partielle de peptides antimicrobiens isolés à partir de l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* et de bactéries associées. Université de Bretagne Sud, 2009. 343 p.
- Desriac, F., El Harras, A., Simon, M., Bondon, A., Brillet, B., Le Chevalier, P., Pugnère, M., Got, P., Destoumieux-Garzón, D., and Fleury, Y. (2020). Alterins Produced by Oyster-Associated *Pseudoalteromonas* Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. *Mar. Drugs* 18, 630.
- Desriac, F., Chevalier, P.L., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C., and Fleury, Y. (2014). Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol. Lett.* 350, 107–116.
- Destoumieux-Garzón, D., Rosa, R.D., Schmitt, P., Barreto, C., Vidal-Dupiol, J., Mitta, G., Gueguen, Y., and Bachère, E. (2016). Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371, 20150300.
- Devanadera, M.K., Velasco, R.U., and Lopez, M.L. (2015). Diversity, exploitation and conservation status of commercially important sea cucumber (Class Holothuria) species in Southeast Asia. *Philipp. J. Syts. Biol.* 9, 33-45.
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I.L., Agellon, L.B., and Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.* 45, W180–W188.
- Dheilly, A., Soum-Soutéra, E., Klein, G.L., Bazire, A., Compère, C., Haras, D., and Dufour, A. (2010). Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3452–3461.
- Ding, J., Liao, N., Zheng, Y., Yang, L., Zhou, H., Xu, K., Han, C., Luo, H., Qin, C., Tang, C., et al. (2020). The Composition and Function of Pigeon Milk Microbiota Transmitted From Parent Pigeons to Squabs. *Front. Microbiol.* 11, 1789.
- Diop, K., Dufour, J.-C., Levasseur, A., and Fenollar, F. (2019). Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. *Hum. Microbiome J.* 11, 100051.
- Dishaw, L.J., Flores-Torres, J., Lax, S., Gemayel, K., Leigh, B., Melillo, D., Mueller, M.G., Natale, L., Zucchetti, I., De Santis, R., et al. (2014). The Gut of Geographically Disparate *Ciona intestinalis* Harbors a Core Microbiota. *PLoS ONE* 9, e93386.
- Domínguez-Godino, J.A., and González-Wangüemert, M. (2018). Breeding and larval development of *Holothuria mammata*, a new target species for aquaculture. *Aquac. Res.* 49, 1430–1440.
- Domínguez-Godino, J.A., Slater, M.J., Hannon, C., and González-Wangüemert, M. (2015). A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: Breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. *Aquaculture* 438, 122–128.
- Dopheide, A., Xie, D., Buckley, T., Drummond, A., and Newcomb, R. (2018). Impacts of DNA extraction and PCR on DNA metabarcoding estimates of soil biodiversity. *Methods Ecol. Evol.* 10.

- Doré, J., and Corthier, G. (2010). The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34, S7–S15.
- Du, Z., Wang, J., Yang, L., and Chen, G. (2011). Identification of a marine agarolytic bacterium *Agarivorans albus* QM38 and cloning and sequencing its beta-agarase genes. *Acta Oceanol. Sin.* 30, 118–124.
- Dubé, C.E., Ky, C.L., and Planes, S.E. (2019). Microbiome of the Black-Lipped Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*, a Multi-Tissue Description With Functional Profiling. *Front. Microbiol.* 10.
- Durand, L., Zbinden, M., Cueff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E.G., Shillito, B., and Cambon-Bonavita, M.-A. (2010). Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71, 291–303.

## E

---

- Eliseikina, M.G., and Magarlamov, T.Yu. (2002). Coelomocyte Morphology in the Holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). *Russ. J. Mar. Biol.* 28, 197–202.
- Elshaghabee, F.M.F., Rokana, N., Gulhane, R.D., Sharma, C., and Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 8, 1490.
- Enomoto, M., Nakagawa, S., and Sawabe, T. (2012). Microbial Communities Associated with Holothurians: Presence of Unique Bacteria in the Coelomic Fluid. *Microbes Environ.* 27, 300–305.
- Erwin, P., Pineda, M.C., Webster, N., Turon, X., and Lopez-Legentil, S. (2013). Down under the tunic: bacterial biodiversity hotspots and widespread ammonia-oxidizing archaea in coral reef ascidians. *ISME J.* 8.

## F

---

- Falentin, H., Auer, L., Mariadassou, M., Pascal, G., Rué, O., Dugat-Bony, E., Delbes, C., Nicolas, A., Rifa, E., Mondy, S., et al. (2019). Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s’initier aux analyses métabarcoding. *Cah. Tech. INRA* 2019, 1–23.
- Fan, L., Wang, Z., Chen, M., Qu, Y., Li, J., Zhou, A., Xie, S., Zeng, F., and Zou, J. (2019). Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment. *Sci. Total Environ.* 657, 1194–1204.
- Farouk, A.E.A., Ghouse, F.A.H., and Ridzwan, B.H. (2007). New Bacterial Species Isolated from Malaysian Sea Cucumbers with Optimized Secreted Antibacterial Activity. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 3, 60–65.
- Fieth, R.A., Gauthier, M.-E.A., Bayes, J., Green, K.M., and Degnan, S.M. (2016). Ontogenetic Changes in the Bacterial Symbiont Community of the Tropical Demosponge *Amphimedon queenslandica*: Metamorphosis Is a New Beginning. *Front. Mar. Sci.* 3.
- Franzenburg, S., Fraune, S., Altrock, P.M., Künzel, S., Baines, J.F., Traulsen, A., and Bosch, T.C. (2013). Bacterial colonization of Hydra hatchlings follows a robust temporal pattern. *ISME J.* 7, 781–790.
- Freeman, C.J., and Thacker, R.W. (2011). Complex interactions between marine sponges and their symbiotic microbial communities. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1577–1586.



**G**

- Gao, M.L., Hou, H.M., Zhang, G.L., Liu, Y., and Sun, L.M. (2017a). Bacterial diversity in the intestine of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Iran. J. Fish. Sci.* 16, 318–325
- Gao, X.-Y., Liu, Y., Miao, L.-L., Li, E.-W., Hou, T.-T., and Liu, Z.-P. (2017b). Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express* 7, 23.
- Gao, F., Li, F., Tan, J., Yan, J., and Sun, H. (2014a). Bacterial Community Composition in the Gut Content and Ambient Sediment of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Revealed by 16S rRNA Gene Pyrosequencing. *PLoS ONE* 9, e100092.
- Gao, Z., Kang, Y., Yu, J., and Ren, L. (2014b). Human pharyngeal microbiome may play a protective role in respiratory tract infections. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12, 144–150.
- Garcia-Arraras, J., and Greenberg, M. (2002). Visceral Regeneration in Holothurians. *Microsc. Res. Tech.* 55, 438–451.
- Gay, M., Waechter, M., Lambert, C., Escoubas, J.-M., Cochenec, N., Nicolas, J.-L., Berthe, F., and Le Roux, F. (2001). Caractérisation de bactéries pathogènes, *Vibrio splendidus*, isolées de bivalves marins. Ifremer, journées conchylicoles du département ressources aquacoles, 3 p.
- Gianasi, B.L., Hamel, J.-F., Montgomery, E.M., Sun, J., and Mercier, A. (2020). Current Knowledge on the Biology, Ecology, and Commercial Exploitation of the Sea Cucumber *Cucumaria frondosa*. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 0, 1–72.
- Gill, H.S., and Guarner, F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad. Med. J.* 80, 516–526.
- Gissi, F., Reichelt-Brushett, A.J., Chariton, A.A., Stauber, J.L., Greenfield, P., Humphrey, C., Salmon, M., Stephenson, S.A., Cresswell, T., and Jolley, D.F. (2019). The effect of dissolved nickel and copper on the adult coral *Acropora muricata* and its microbiome. *Environ. Pollut.* 250, 792–806.
- Gobet, A., Mest, L., Perennou, M., Dittami, S.M., Caralp, C., Coulombet, C., Huchette, S., Roussel, S., Michel, G., and Leblanc, C. (2018). Seasonal and algal diet-driven patterns of the digestive microbiota of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a generalist marine herbivore. *Microbiome* 6, 60.
- González-Wangüemert, M. (2018). The fast development of sea cucumber fisheries in the Mediterranean and NE Atlantic waters: From a new marine resource to its over-exploitation. *Coast. Manag.* 13.
- Goodrich, J.K., Di Rienzi, S.C., Poole, A.C., Koren, O., Walters, W.A., Caporaso, J.G., Knight, R., and Ley, R.E. (2014). Conducting a Microbiome Study. *Cell* 158, 250–262.
- Gowda, N.M., Goswami, U., and Islam Khan, M. (2008). T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 141–145.
- Green, G.B.H., Hakim, J.A., Chen, J.-W., Koo, H., Morrow, C.D., Watts, S.A., and Bej, A.K. (2021). The Gut Microbiota of Naturally Occurring and Laboratory Aquaculture *Lytechinus variegatus* Revealed Differences in the Community Composition, Taxonomic Co-Occurrence, and Predicted Functional Attributes. *Appl. Microbiol.* 1, 201–224.
- Gu, M., Ma, H., Zhang, W., Ai, Q., Wang, X., and Bai, N. (2010). Immune response of sea cucumber *Apostichopus japonicus* coelomocytes to several immunostimulants in vitro. *Aquaculture* 306, 49–56.
- Guillaume J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (1999). Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. Ouvrage Inra-Ifremer, 485 p.



Günther, B., Knebelsberger, T., Neumann, H., Laakmann, S., and Martínez Arbizu, P. (2018). Metabarcoding of marine environmental DNA based on mitochondrial and nuclear genes. *Sci. Rep.* 8, 14822.

## H

Haegeman, B., and Etienne, R.S. (2017). A general sampling formula for community structure data. *Methods Ecol. Evol.* 8, 1506–1519.

Hai, N.V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *J. Appl. Microbiol.* 119, 917–935.

Hakim, J.A., Schram, J.B., Galloway, A.W.E., Morrow, C.D., Crowley, M.R., Watts, S.A., and Bej, A.K. (2019). The Purple Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus* Demonstrates a Compartmentalization of Gut Bacterial Microbiota, Predictive Functional Attributes, and Taxonomic Co-Occurrence. *Microorganisms* 7, 35.

Hakim, J.A., Koo, H., Kumar, R., Lefkowitz, E.J., Morrow, C.D., Powell, M.L., Watts, S.A., and Bej, A.K. (2016). The gut microbiome of the sea urchin, *Lytechinus variegatus*, from its natural habitat demonstrates selective attributes of microbial taxa and predictive metabolic profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92.

Hamady, M., and Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res.* 19, 1141–1152.

Hamel, J.-F., Hidalgo, R.Y., and Mercier, A. (2013). Larval development and juvenile growth of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. *SPC beche-de-mer information bulletins* 18, 6–8.

Hamel, J.-F., Conand, C., Pawson, D.L., and Mercier, A. (2001). The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): Its biology and exploitation as Beche-de-mer. In *Advances in Marine Biology*, (Elsevier), pp. 129–223.

Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø.M., and Stensvåg, K. (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J. Invertebr. Pathol.* 81, 94–102.

Hedayat, K.M., Lapraz, J.-C., and Schuff, B. (2020). Chapter 28 - Dysbiosis. In *The Theory of Endobiogeny*, K.M. Hedayat, J.-C. Lapraz, and B. Schuff, eds. (Academic Press), pp. 195–201.

Hernandez-Agreda, A., Gates, R.D., and Ainsworth, T.D. (2017). Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. *Trends Microbiol.* 25, 125–140.

Hernandez-Agreda, A., Leggat, W., Bongaerts, P., and Ainsworth, T.D. (2016). The Microbial Signature Provides Insight into the Mechanistic Basis of Coral Success across Reef Habitats. *MBio* 7, e00560-16, /mbio/7/4/e00560-16.atom.

Hetzel, H.R. (1965). Studies on holothurian coelomocytes. ii. the origin of coelomocytes and the formation of brown bodies. *Biol. Bull.* 128, 102–111.

Hildemann, W.H., and Dix, T.G. (1972). Transplantation reactions of tropical Australian echinoderms. *Transplantation* 14, 624–633.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., et al. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514.

Hirth, F. (2010). On the Origin and Evolution of the Tripartite Brain. *Brain. Behav. Evol.* 76, 3–10.

Hoffman, M., and Decho, A. (2000). Proteolytic enzymes in the marine bacterium *Pseudoalteromonas atlantica*: Post-secretional activation and effects of environmental conditions. *Aquat. Microb. Ecol.* - *Aquat MicrobE* 23, 29–39.

- Holmström, C., and Kjelleberg, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 285–293.
- Hu, Z., Lin, B.-K., Xu, Y., Zhong, M. q., and Liu, G.-M. (2009). Production and purification of agarase from a marine agarolytic bacterium *Agarivorans* sp. HZ105. *J. Appl. Microbiol.* 106, 181–190.
- Huang, W., Huo, D., Yu, Z., Ren, C., Jiang, X., Luo, P., Chen, T., and Hu, C. (2018). Spawning, larval development and juvenile growth of the tropical sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Aquaculture* 488, 22–29.
- Huerta-Rábago, J.A., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M.E., and Martínez-Córdova, L.R. (2019). Addition of commercial probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: Effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture* 502, 391–399.

## I

---

- Ito, S., and Kitamura, H. (1997). Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Stichopus japonicus* by periphitic diatoms. In *Live Food in Aquaculture*, A. Hagiwara, T.W. Snell, E. Lubzens, and C.S. Tamaru, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 281–284.

## J

---

- Jackson, E.W., Pepe-Ranney, C., Debenport, S.J., Buckley, D.H., and Hewson, I. (2018). The Microbial Landscape of Sea Stars and the Anatomical and Interspecies Variability of Their Microbiome. *Front. Microbiol.* 9, 1829.
- Jacquioud, S., Puga-Freitas, R., Spor, A., Mounier, A., Monard, C., Mougél, C., Philippot, L., and Blouin, M. (2019). A core microbiota of the plant-earthworm interaction conserved across soils.
- Janakiram, N., Mohammed, A., and Rao, C. (2015). Sea Cucumbers Metabolites as Potent Anti-Cancer Agents. *Mar. Drugs* 13, 2909–2923.
- Jensen, S., Frank, J.A., Arntzen, M.Ø., Duperron, S., Vaaje-Kolstad, G., and Hovland, M. (2021). *Endozoicomonadaceae* symbiont in gills of *Acesta* clam encodes genes for essential nutrients and polysaccharide degradation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97.
- Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S., Edwards, D., Tang, Y., Nakamura, A., Kitching, R., Dolman, P., Woodcock, P., Edwards, F., et al. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecol. Lett.* 16.

## K

---

- Kamarudin, K.R., Hashim, R., and Gires, U. (2010). Phylogeny of Sea Cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) as Inferred from 16S Mitochondrial rRNA Gene Sequences. *Sains Malaysiana* 39, 209–2018.
- Kapareiko, D., Alix, J., Jeffress, D., and Wikfors, G. (2012). Evaluation of a *Bacillus* sp. probiotic candidate upon survival of oyster larvae (*Crassostrea virginica*) during pilot-scale trials and its effects upon oyster hemocyte immune functions. *J. Shellfish Res.* 31, 303–303.
- Kapareiko, D., Lim, H.J., Schott, E.J., Hanif, A., and Wikfors, G. (2011). Isolation and Evaluation of New Probiotic Bacteria for use in Shellfish Hatcheries: II. Effects of a *Vibrio* sp. Probiotic Candidate Upon Survival of Oyster Larvae (*Crassostrea virginica*) in Pilot-Scale Trials. *ResearchGate* 30, 617–625.
- Kelly, M.S. (2005). Echinoderms: their culture and bioactive compounds. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 39, 139–165.
- Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S., and Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* 26, 927–939.

- Khalifa, A., and Aldayel, M. (2019). Isolation and characterisation of the agarolytic bacterium *Pseudoalteromonas ruthenica*. *Open Life Sci.* 14, 588–594.
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., and Kot, A.M. (2021). Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Mol. Basel Switz.* 26, 1858.
- Kiew, P.L., and Don, M.M. (2012). Jewel of the seabed: sea cucumbers as nutritional and drug candidates. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63, 616–636.
- Kim, T.-Y., Lee, J.-J., Kim, B.-S., and Choi, S.H. (2017). Whole-Body Microbiota of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) from South Korea for Improved Seafood Management. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1753–1762.
- King, W., Kaestli, M., Siboni, N., Padovan, A., Christian, K., Mills, D., Seymour, J., and Gibb, K. (2021). Pearl Oyster Bacterial Community Structure Is Governed by Location and Tissue-Type, but *Vibrio* Species Are Shared Among Oyster Tissues. *Front. Microbiol.* 12.
- Knauer, J. (2011). Growth and Survival of Larval Sandfish, *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea), Fed Different Microalgae. *J. World Aquac. Soc.* 42, 880–887.
- Kumar, R., Chaturvedi, A.K., Shukla, P.K., and Lakshmi, V. (2007). Antifungal activity in triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinopyga lecanora*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 4387–4391.
- Kurahashi, M., and Yokota, A. 2004 *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a  $\gamma$ -proteobacterium isolated from marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 693–697.
- Kurek, A., Homa, J., Kauschke, E., and Plytycz, B. (2007). Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *Eur. J. Soil Biol.* 43, S121–S126.

## L

- Laguerre, H., Raymond, G., Plan, P., Améziane, N., Bailly, X., and Le Chevalier, P. (2020). First description of embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea), a new species for aquaculture in the north-eastern Atlantic. *Aquaculture* 521, 734961.
- Laport, M.S., Bauwens, M., Collard, M., and George, I. (2018). Phylogeny and Antagonistic Activities of Culturable Bacteria Associated with the Gut Microbiota of the Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*). *Curr. Microbiol.* 75, 359–367.
- Lawrence, J.M. (2020). *Sea Urchins: Biology and Ecology* (Academic Press). 730 p.
- Lee, N.-K., Kim, W.-S., and Paik, H.-D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci. Biotechnol.* 28, 1297–1305.
- Lee, W.-K., Lim, Y.-Y., Leow, A.T.-C., Namasivayam, P., Ong Abdullah, J., and Ho, C.-L. (2017). Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydr. Polym.* 164, 23–30.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., and Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci.* 22, 583–595.
- Lemon, K.P. (2020). Human nasal microbiota. *Curr. Biol.* 30, R1118–R1119.
- León-Palmero, E., Joglar, V., Álvarez, P.A., Martín-Platero, A., Llamas, I., and Reche, I. (2018). Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PLOS ONE* 13, e0196178.
- Li, M., Callier, M.D., Blancheton, J.-P., Galès, A., Nahon, S., Triplet, S., Geoffroy, T., Menniti, C., Fouilland, E., and Roque d'orbcastel, E. (2019). Bioremediation of fishpond effluent and production of microalgae for an oyster farm in an innovative recirculating integrated multi-trophic aquaculture system. *Aquaculture* 504, 314–325.

- Li, Y., Wu, C., Zhou, M., Wang, E.T., Zhang, Z., Liu, W., Ning, J., and Xie, Z. (2017). Diversity of Cultivable Protease-Producing Bacteria in Laizhou Bay Sediments, Bohai Sea, China. *Front. Microbiol.* 8, 405.
- Li, C., Blencke, H.-M., Haug, T., Jørgensen, Ø., and Stensvåg, K. (2014). Expression of antimicrobial peptides in coelomocytes and embryos of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Dev. Comp. Immunol.* 43, 106–113.
- Limborg, M.T., Alberdi, A., Kodama, M., Roggenbuck, M., Kristiansen, K., and Gilbert, M.T.P. (2018). Applied Hologenomics: Feasibility and Potential in Aquaculture. *Trends Biotechnol.* 36, 252–264.
- Ling, Z., Liu, X., Luo, Y., Yuan, L., Wang, Y., Xiang, C., and Li, L. (2013). Pyrosequencing Analysis of the Human Microbiota of Healthy Chinese Undergraduates. *BMC Genomics* 14, 390.
- Littlewood, D.T.J., Smith, A.B., Clough, K.A., and Emson, R.H. (1997). The interrelationships of the echinoderm classes: morphological and molecular evidence. *Biol. J. Linn. Soc.* 61, 409–438.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 251364.
- Lloyd, M.M., and Pespeni, M.H. (2018). Microbiome shifts with onset and progression of Sea Star Wasting Disease revealed through time course sampling. *Sci. Rep.* 8.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., and Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Med.* 8, 51.
- Lokmer, A., Goedknegt, M.A., Thieltges, D.W., Fiorentino, D., Kuenzel, S., Baines, J.F., and Wegner, K.M. (2016a). Spatial and Temporal Dynamics of Pacific Oyster Hemolymph Microbiota across Multiple Scales. *Front. Microbiol.* 7.
- Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J.F., and Wegner, K.M. (2016b). The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environ. Microbiol.* 18, 970–987.
- Loos, L.M., and Nijland, R. (2021). Biases in bulk: DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved. *Mol. Ecol.* 30, 3270–3288.
- López-Legentil, S. (2015). Temporal stability of bacterial symbionts in a temperate ascidian. *Front. Microbiol.* 6, 11.
- Lowe, B.A., Marsh, T.L., Isaacs-Cosgrove, N., Kirkwood, R.N., Kiupel, M., and Mulks, M.H. (2012). Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *BMC Microbiol.* 12, 20.
- Luo, C., Tsementzi, D., Kypides, N., Read, T., and Konstantinidis, K.T. (2012). Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One* 7, e30087.

## M

- Ma, Y.-X., Li, M., Liu, J.-C., Tao, W., Yu, Z.-C., and Liu, Y.-B. (2020). Effects of *Bacillus aquimaris* T16 on growth, enzyme activity, and disease resistance of the Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *J. World Aquac. Soc.* 51, 702–711.
- MacDonald, C.L.E., Stead, S.M., and Slater, M.J. (2013). Consumption and remediation of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) waste by the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Aquac. Int.* 21, 1279–1290.
- Makridis, P., Kokou, F., Bournakas, C., Papandroulakis, N., and Sarropoulou, E. (2021). Isolation of *Phaeobacter* sp. from Larvae of Atlantic Bonito (*Sarda sarda*) in a Mesocosmos Unit, and Its Use for the Rearing of European Seabass Larvae (*Dicentrarchus labrax* L.). *Microorganisms* 9, 128.

- Man, W.H., de Steenhuijsen Piters, W.A.A., and Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 259–270.
- Marchesi, J.R., and Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31.
- Margulis, L. (1993). Origins of species: acquired genomes and individuality. *Biosystems* 31, 121–125.
- Margulis L. (1981). *Symbiosis in cell evolution*. New York: W.H. Freeman. 452 p.
- Marquet, N., Conand, C., Power, D.M., Canário, A.V.M., and González-Wangüemert, M. (2017). Sea cucumbers, *Holothuria arguinensis* and *H. mammata*, from the southern Iberian Peninsula: Variation in reproductive activity between populations from different habitats. *Fish. Res.* 191, 120–130.
- Matranga, V. (1996). Molecular aspects of immune reactions in Echinodermata. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 15, 235–247.
- Mazlan, N., and Hashim, R. (2015). Spawning induction and larval rearing of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Malaysia. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 35, 32-36.
- McFall-Ngai, M.J. (1994). Animal-Bacterial Interactions in the Early Life History of Marine Invertebrates: The *Euprymna scolopes* / *Vibrio fischeri* Symbiosis. *Am. Zool.* 34, 554–561.
- Medagedara, C., Jayatissa, A.J., Fahim, M., Pushpakumara, J., and Kumara, P.A.D. (2019). Survival and growth of the sea cucumber *Holothuria scabra* farmed in two selected sites in Puttalam Lagoon, Sri Lanka.
- Medina-Silva, R., Oliveira, R.R., Trindade, F.J., Borges, L.G.A., Lopes Simão, T.L., Augustin, A.H., Valdez, F.P., Constant, M.J., Simundi, C.L., Eizirik, E., et al. (2018). Microbiota associated with tubes of *Escarpi* sp. from cold seeps in the southwestern Atlantic Ocean constitutes a community distinct from that of surrounding marine sediment and water. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 533–550.
- Meisterhans, G., Raymond, N., Girault, E., Lambert, C., Bourrasseau, L., de Montaudouin, X., Garabetian, F., and Jude-Lemeilleur, F. (2016). Structure of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) Microbiota at the Organ Scale in Contrasting Sets of Individuals. *Microb. Ecol.* 71, 194–206.
- Miller, P.M., Lamy, T., Page, H.M., and Miller, R.J. (2021). Sea urchin microbiomes vary with habitat and resource availability. *Limnol. Oceanogr. Lett.* 6, 119–126.
- Miller, A.K., Kerr, A.M., Paulay, G., Reich, M., Wilson, N.G., Carvajal, J.I., and Rouse, G.W. (2017). Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata). *Mol. Phylogenet. Evol.* 111, 110–131.
- Moeller, A.H., Suzuki, T.A., Phifer-Rixey, M., and Nachman, M.W. (2018). Transmission modes of the mammalian gut microbiota. *Science* 362, 453–457.
- Mohammadzadeh, F., Ehsanpor, M., Afkhami, M., Mokhlesi, A., Khazaali, A., and Montazeri, S. (2013). Evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of *Holothuria scabra* from the North Coast of the Persian Gulf. *J. Mycol. Médicale* 23, 225–229.
- Moran, N.A., and Sloan, D.B. (2015). The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLOS Biol.* 13, e1002311.
- Moran, N.A. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8627–8633.
- Mrkonjic Fuka, M., Engel, M., Munch, J.-C., and Schloter, M. (2007). Chapter 19 - Characterization of Proteolytic Microbes and Their Activities in Soils. In *Biology of the Nitrogen Cycle*, H. Bothe, S.J. Ferguson, and W.E. Newton, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 303–309.

**N**

- Nakagawa, S., Saito, H., Tame, A., Hirai, M., Yamaguchi, H., Sunata, T., Aida, M., Muto, H., Sawayama, S., and Takaki, Y. (2017). Microbiota in the coelomic fluid of two common coastal starfish species and characterization of an abundant *Helicobacter*-related taxon. *Sci. Rep.* 7, 8764.
- Nelson, E., MacDonald, B., and Robinson, S. (2012). A Review of the Northern Sea Cucumber *Cucumaria frondosa* (Gunnerus, 1767) as a Potential Aquaculture Species. *Rev. Fish. Sci.* 20.
- Ngo, H.T., Nguyen, T.T.N., Nguyen, Q.M., Tran, A.V., Do, H.T.V., Nguyen, A.H., Phan, T.-N., and Nguyen, A.T.V. (2016). Screening of pigmented *Bacillus aquimaris* SH6 from the intestinal tracts of shrimp to develop a novel feed supplement for shrimp. *J. Appl. Microbiol.* 121, 1357–1372.
- Nguyen, H.T., Nguyen, T.T., Pham, H.T.T., Nguyen, Q.T.N., Tran, M.T., Nguyen, A.H., Phan, T.N., Bui, H.T.V., Dao, H.T.T., and Nguyen, A.T.V. (2018). Fate of carotenoid-producing *Bacillus aquimaris* SH6 colour spores in shrimp gut and their dose-dependent probiotic activities. *Plos One* 13, e0209341.
- Nowlan, J.P., Lumsden, J.S., and Russell, S. (2020). Advancements in Characterizing *Tenacibaculum* Infections in Canada. *Pathog. Basel Switz.* 9, E1029.

**O**

- O’Brien, P.A., Webster, N.S., Miller, D.J., and Bourne, D.G. (2019). Host-Microbe Coevolution: Applying Evidence from Model Systems to Complex Marine Invertebrate Holobionts. *MBio* 10, e02241-18, /mbio/10/1/mBio.02241-18.atom.
- O’Dwyer, D.N., Dickson, R.P., and Moore, B.B. (2016). The Lung Microbiome, Immunity and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 196, 4839–4847.
- Offret, C., Paulino, S., Gauthier, O., Château, K., Bidault, A., Corporeau, C., Miner, P., Petton, B., Pernet, F., Fabioux, C., et al. (2020). The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 96, fiae078.
- Offret, C., Jégou, C., Mounier, J., Fleury, Y., and Chevalier, P.L. (2019a). New insights into the haemo- and coelo-microbiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. *J. Appl. Microbiol.* 126, 1023–1031.
- Offret, C., Rochard, V., Laguerre, H., Mounier, J., Huchette, S., Brillet, B., Le Chevalier, P., and Fleury, Y. (2019b). Protective Efficacy of a *Pseudoalteromonas* Strain in European Abalone, *Haliotis tuberculata*, Infected with *Vibrio harveyi* ORM4. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11, 239–247.
- Offret, C., Desriac, F., Le Chevalier, P., Mounier, J., Jégou, C., and Fleury, Y. (2016). Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Mar. Drugs* 14.
- O’Hara, T., and Byrne, M. (2017). *Australian Echinoderms: Biology, Ecology and Evolution* (Csiro Publishing). 624 p.
- Onywera, H., and Meiring, T.L. (2020). Comparative analyses of Ion Torrent V4 and Illumina V3-V4 16S rRNA gene metabarcoding methods for characterization of cervical microbiota: taxonomic and functional profiling. *Sci. Afr.* 7, e00278.
- Osman, E.O., Suggett, D.J., Voolstra, C.R., Pettay, D.T., Clark, D.R., Pogoreutz, C., Sampayo, E.M., Warner, M.E., and Smith, D.J. (2020). Coral microbiome composition along the northern Red Sea suggests high plasticity of bacterial and specificity of endosymbiotic dinoflagellate communities. *Microbiome* 8, 8.
- Otero-Villanueva, M., and Vu, T. (2007). Sea cucumber fisheries around Phu Quoc Archipelago: A cross-border issue between South Vietnam and Cambodia. *SPC Beche--Mer Inf. Bull.* 25.

**P**



- Pagán-Jiménez, M., Ruiz-Calderón, J.F., Dominguez-Bello, M.G., and García-Arrarás, J.E. (2019). Characterization of the intestinal microbiota of the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *PLoS One* 14, e0208011.
- Paillard, C., Gueguen, Y., Wegner, K.M., Bass, D., Pallavicini, A., Vezzulli, L., and Arzul, I. (2022). Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 73, 225–232.
- Paillard, C., Gausson, S., Nicolas, J.-L., Le Pennec, J.P., and Haras, D. (2006). Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253, 25–38.
- Palladino, G., Rampelli, S., Scicchitano, D., Musella, M., Quero, G.M., Prada, F., Mancuso, A., Seyfarth, A.M., Turrioni, S., Candela, M., et al. (2021). Impact of Marine Aquaculture on the Microbiome Associated with Nearby Holobionts: The Case of *Patella caerulea* Living in Proximity of Sea Bream Aquaculture Cages. *Microorganisms* 9, 455.
- Paltzat, D.L., Pearce, C.M., Barnes, P.A., and McKinley, R.S. (2008). Growth and production of California sea cucumbers (*Parastichopus californicus* Stimpson) co-cultured with suspended Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 275, 124–137.
- Patwardhan, B., Mutalik, G., and Tillu, G. (2015). Chapter 8 - Health Supplements. In *Integrative Approaches for Health*, B. Patwardhan, G. Mutalik, and G. Tillu, eds. (Boston: Academic Press), pp. 201–227.
- Pédron, T., Mulet, C., Dauga, C., Frangeul, L., Chervaux, C., Grompone, G., and Sansonetti, P.J. A Crypt-Specific Core Microbiota Resides in the Mouse Colon. *MBio* 3, e00116-12.
- Pernet, F., Lupo, C., Bacher, C., and Whittington, R.J. (2016). Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371, 20150213.
- Petersen, J.M., and Osvatic, J. Microbiomes In Natura: Importance of Invertebrates in Understanding the Natural Variety of Animal-Microbe Interactions. *MSystems* 3, e00179-17.
- Pierce, M.L., and Ward, J.E. (2019). Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) and the Blue Mussel (*Mytilus edulis*): Temporal Variation and the Influence of Marine Aggregate-Associated Microbial Communities. *MSphere* 4, e00730-19, /msphere/4/6/mSphere730-19.atom.
- Pierce, M.L., Ward, J.E., Holohan, B.A., Zhao, X., and Hicks, R.E. (2016). The influence of site and season on the gut and pallial fluid microbial communities of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Bivalvia, Ostreidae): community-level physiological profiling and genetic structure. *Hydrobiologia* 765, 97–113.
- Plotieau, T., Lavitra, T., Gillan, D., and Eeckhaut, I. (2013). Bacterial diversity of the sediments transiting through the gut of *Holothuria scabra* (Holothuroidea; Echinodermata). *Mar. Biol.* 160.
- Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T., and Watson, M. (2018). The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus “Best Practice” for 16S Microbiome Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02627-17, /aem/84/7/e02627-17.atom.
- Prabhakaran Pillai, R., Venkatesan, R., Sundaresan, S., Ramprasath, T., Shyam, K.P., Ramu, A., and S, S. (2018). Characterization of agarolytic enzymes of *Arthrobacter* spp. AG-1 for the whole cell conversion of agar into 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactose in one pot. *Process Biochem.* 69, 52–63.
- Purcell, S.W., Mercier, A., Conand, C., Hamel, J.-F., Toral-Granda, M.V., Lovatelli, A., and Uthicke, S. (2013). Sea cucumber fisheries: global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing: Management of sea cucumber fisheries. *Fish Fish.* 14, 34–59.

Purcell, S.W., Samyn, Y., and Conand, C. (2012). Commercially important Sea Cucumbers of the World (Rome: FAO).

**R**

- Rakaj, A., Fianchini, A., Boncagni, P., Scardi, M., and Cataudella, S. (2019). Artificial reproduction of *Holothuria polii*: A new candidate for aquaculture. *Aquaculture* 498, 444–453.
- Rakaj, A., Fianchini, A., Boncagni, P., Lovatelli, A., Scardi, M., and Cataudella, S. (2018). Spawning and rearing of *Holothuria tubulosa* : A new candidate for aquaculture in the Mediterranean region. *Aquac. Res.* 49, 557–568.
- Ramirez-Gomez, F., and Garcia-Ararras, J. (2010). Echinoderm immunity. *Invertebr. Surviv. J.* 7.
- Ramofafia, C., Byrne, M., and Battaglione, S.C. (2003). Development of three commercial sea cucumbers, *Holothuria scabra*, *H. fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*: larval structure and growth. *Mar. Freshw. Res.* 54, 657.
- Rawson, K., and Hoagland, P. (2019). Sea cucumbers in a pickle: the economic geography of the serial exploitation of sea cucumbers. *Ecol. Soc.* 24.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rebollar, E.A., Gutiérrez-Preciado, A., Noecker, C., Eng, A., Hughey, M.C., Medina, D., Walke, J.B., Borenstein, E., Jensen, R.V., Belden, L.K., et al. (2018). The Skin Microbiome of the Neotropical Frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring Potential Bacterial-Host-Pathogen Interactions From Metagenomic Data. *Front. Microbiol.* 9, 466.
- Reich, A., Dunn, C., Akasaka, K., Wessel, G., 2015. Phylogenomic Analyses of Echinodermata Support the Sister Groups of Asterozoa and Echinozoa. *PLOS ONE* 10, e0119627.
- Reilly, P., O’Doherty, J.V., Pierce, K.M., Callan, J.J., O’Sullivan, J.T., and Sweeney, T. (2008). The effects of seaweed extract inclusion on gut morphology, selected intestinal microbiota, nutrient digestibility, volatile fatty acid concentrations and the immune status of the weaned pig. *Animal* 2, 1465–1473.
- Reveillaud, J., Maignien, L., Eren, M.A., Huber, J.A., Apprill, A., Sogin, M.L., and Vanreusel, A. (2014). Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *ISME J.* 8, 1198–1209.
- Reyman, M., van Houten, M.A., van Baarle, D., Bosch, A.A.T.M., Man, W.H., Chu, M.L.J.N., Arp, K., Watson, R.L., Sanders, E.A.M., Fuentes, S., et al. (2019). Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nat. Commun.* 10, 4997.
- Rinkevich, B., and Matranga, V. (2009). *Stem Cells in Marine Organisms* (Springer Science & Business Media).
- Risely, A. (2020). Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *J. Anim. Ecol.* 89, 1549–1558.
- Rodrigues, S., Paillard, C., Dufour, A., and Bazire, A. (2015). Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 Against *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, 45–51.
- Rodriguez Barreras, R., Tosado, E., and Godoy-Vitorino, F. (2021). Trophic niches reflect compositional differences in microbiota among Caribbean sea urchins. *PeerJ* 9.
- Rosenberg, E., and Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 6.



- Rosenberg, E., and Zilber-Rosenberg, I. (2016). Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: the Hologenome Concept. *MBio* 7, e01395.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., and Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 355–362.
- Rossbach, S., Cardenas, A., Perna, G., Duarte, C.M., and Voolstra, C.R. (2019). Tissue-Specific Microbiomes of the Red Sea Giant Clam *Tridacna maxima* Highlight Differential Abundance of *Endozoicomonadaceae*. *Front. Microbiol.* 10.
- Roterman, Y.R., Benayahu, Y., Reshef, L., and Gophna, U. (2015). The gill microbiota of invasive and indigenous *Spondylus* oysters from the Mediterranean Sea and northern Red Sea. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 860–867.
- Ruppert, K.M., Kline, R.J., and Rahman, M.S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob. Ecol. Conserv.* 17, e00547.

## S

---

- Salonen, A., Salojärvi, J., Lahti, L., and de Vos, W.M. (2012). The adult intestinal core microbiota is determined by analysis depth and health status. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 16–20.
- Samyn, Y. (2003). Towards an understanding of the shallow-water holothuroid fauna (Echinodermata: Holothuroidea) of the western Indian Ocean.
- Sanders, M.E. (2008). Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clin. Infect. Dis.* 46, S58–S61.
- Santacroce, L., Charitos, I.A., Ballini, A., Inchingolo, F., Luperto, P., De Nitto, E., and Topi, S. (2020). The Human Respiratory System and its Microbiome at a Glimpse. *Biology* 9, 318.
- Santos, R., Dias, S., Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Tecelão, C., Pedrosa, R., and Pombo, A. (2015). Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. *Aquac. Res.* 47, 2307–2323.
- Sarkar, A., Harty, S., Johnson, K.V.-A., Moeller, A.H., Archie, E.A., Schell, L.D., Carmody, R.N., Clutton-Brock, T.H., Dunbar, R.I.M., and Burnet, P.W.J. (2020). Microbial transmission in animal social networks and the social microbiome. *Nat. Ecol. Evol.* 4, 1020–1035.
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., Perez, T., Rodrigo, A., Schupp, P.J., Vacelet, J., et al. (2012). Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME J.* 6, 564–576.
- Schmitt, S., Weisz, J.B., Lindquist, N., and Hentschel, U. (2007). Vertical Transmission of a Phylogenetically Complex Microbial Consortium in the Viviparous Sponge *Ircinia felix*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2067–2078.
- Schwob, G., Cabrol, L., Poulin, E., and Orlando, J. (2020). Characterization of the Gut Microbiota of the Antarctic Heart Urchin (Spatangoida) *Abatus agassizii*. *Front. Microbiol.* 11.
- Sepulveda, A.J., Hutchins, P.R., Forstchen, M., Mckeeffry, M.N., and Swigris, A.M. (2020). The Elephant in the Lab (and Field): Contamination in Aquatic Environmental DNA Studies. *Front. Ecol. Evol.* 8.
- Sha, Y., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Sun, G., and Wang, L. (2016). Gut bacterial diversity of farmed sea cucumbers *Apostichopus japonicus* with different growth rates. *Microbiology* 85, 109–115.
- Shade, A., and Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome: The hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* 14, 4–12.

- Shedrawi, G., Kinch, J.P., Halford, A.R., Bertram, I., Molai, C., and Friedman, K.J. (2019). CITES listing of sea cucumber species provides opportunities to improve management of the beche-de-mer trade. 4.
- Slater, M.J., and Carton, A.G. (2009). Effect of sea cucumber (*Australostichopus mollis*) grazing on coastal sediments impacted by mussel farm deposition. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1123–1129.
- Smirnov, A. (2019). The origin of the class Holothuroidea (Eleutherozoa: Echinozoa). 10th European Conference on Echinoderms. Moscou.
- Smirnov, A. (2016). Parallelisms in the Evolution of Sea Cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Paleontol. J.* 50, 1610–1625.
- Smith, L.C., Hawley, T.S., Henson, J.H., Majeske, A.J., Oren, M., and Rosental, B. (2019). Methods for collection, handling, and analysis of sea urchin coelomocytes. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 357–389.
- Smith, L.C., Arizza, V., Barela Hudgell, M.A., Barone, G., Bodnar, A.G., Buckley, K.M., Cunsolo, V., Dheilly, N.M., Franchi, N., Fugmann, S.D., et al. (2018). Echinodermata: The Complex Immune System in Echinoderms. In *Advances in Comparative Immunology*, E.L. Cooper, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 409–501.
- Smith, L.C., Ghosh, J., Buckley, K.M., Clow, L.A., Dheilly, N.M., Haug, T., Henson, J.H., Li, C., Lun, C.M., Majeske, A.J., et al. (2010). Echinoderm Immunity. In *Invertebrate Immunity*, K. Söderhäll, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 260–301.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., and Herndl, G.J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12115–12120.
- Soliman, T., Yamazaki, Y., Niiyama, H., and Tsunoda, K. (2013). Spontaneous captive breeding and larval development in the green and red variants of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka 1867). *Aquac. Res.* 44, 738–746.
- de Souza Vandenberghe, L.P., Garcia, L.M.B., Rodrigues, C., Camara, M.C., de Melo Pereira, G.V., de Oliveira, J., and Soccol, C.R. (2017). Potential applications of plant probiotic microorganisms in agriculture and forestry. *AIMS Microbiol.* 3, 629–648.
- Srisapoome, P., and Areechon, N. (2017). Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials. *Fish Shellfish Immunol.* 67, 199–210.
- Sylvain, F.-É., and Derome, N. (2017). Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Sci. Rep.* 7, 5263.

## T

- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., and Coissac, E. (2018). *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring* (Oxford University Press).
- Tang, Y., Ma, S., Liu, Y., Pi, Y., Liu, Y., and Zhao, Y. (2021). Intestinal microbial diversity and functional analysis of *Urechis unicinctus* from two different habitats: pond polycultured with *Penaeus japonicus* and coastal zone. *Aquac. Environ. Interact.* 13, 211–224.
- Tarnecki, A.M., Wafapoor, M., Phillips, R.N., and Rhody, N.R. (2019). Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. *Sci. Rep.* 9, 4892.
- Theis, K.R. (2018). Hologenomics: Systems-Level Host Biology. *MSystems* 3, e00164-17, /msystems/3/2/msys.00164-17.atom.
- Theis, K.R., Dheilly, N.M., Klassen, J.L., Brucker, R.M., Baines, J.F., Bosch, T.C.G., Cryan, J.F., Gilbert, S.F., Goodnight, C.J., Lloyd, E.A., et al. (2016). Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-

- Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *MSystems* 1, e00028-16, /msys/1/2/e00028-16.atom.
- Thompson, L.R., Nikolakakis, K., Pan, S., Reed, J., Knight, R., and Ruby, E.G. (2017). Transcriptional characterization of *Vibrio fischeri* during colonization of juvenile *Euprymna scolopes*. *Environ. Microbiol.* 19, 1845–1856.
- Thursby, E., and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 474, 1823–1836.
- Tianero, M.D.B., Kwan, J.C., Wyche, T.P., Presson, A.P., Koch, M., Barrows, L.R., Bugni, T.S., and Schmidt, E.W. (2015). Species specificity of symbiosis and secondary metabolism in ascidians. *ISME J.* 9, 615–628.
- Tolon, M.T., Emiroglu, D., Gunay, D., and Ozgul, A. (2017). Sea cucumber (*Holothuria tubulosa* Gmelin, 1790) culture under marine fish net cages for potential use in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Indian J Mar Sci* 46, 9.
- Trabal, N., Mazón-Suástegui, J.M., Vázquez-Juárez, R., Asencio-Valle, F., Morales-Bojórquez, E., and Romero, J. (2012). Molecular Analysis of Bacterial Microbiota Associated with Oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in Different Growth Phases at Two Cultivation Sites. *Microb. Ecol.* 64, 555–569.
- Travers, M.-A. Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata* : approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Université de Bretagne Occidentale. 269 p.
- Turnbaugh, P.J., and Gordon, J.I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity: The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J. Physiol.* 587, 4153–4158.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., and Gordon, J.I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature* 449, 804–810.
- Tuwo, A., and Conand, C. (1992). Reproductive biology of the holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 72, 745–758.
- Tzuc, J.T., Escalante, D.R., Rojas Herrera, R., Gaxiola Cortés, G., and Ortiz, M.L.A. (2014). Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus* 3, 280.

## U

---

- Uthicke, S. (1999). Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria (Halodeima) atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Bull. Mar. Sci.* 64, 14.

## V

---

- Van de Water, J., Melkonian, R., Voolstra, C., Junca, H., Béraud, E., Allemand, D., and Ferrier-Pagès, C. (2017). Comparative Assessment of Mediterranean Gorgonian-Associated Microbial Communities Reveals Conserved Core and Locally Variant Bacteria. *Microb. Ecol.* 73, 466–478.
- Van Oppen, M.J.H., and Blackall, L.L. (2019). Coral microbiome dynamics, functions and design in a changing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 557–567.
- Vaughn, R., Garnhart, N., Garey, J.R., Thomas, W., and Livingston, B.T. (2012). Sequencing and analysis of the gastrula transcriptome of the brittle star *Ophiocoma wendtii*. *EvoDevo* 3, 19.
- Vergara, W., and Rodríguez, A. (2016). Nutritional Composition of Sea Cucumber *Isostichopus* sp. *Nat. Resour.* 07, 130–137.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671.

- Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., and Pruzzo, C. (2018). Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). *Microb. Ecol.* 75, 495–504.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., and Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 404–427.
- Visick, K.L., and McFall-Ngai, M.J. (2000). An Exclusive Contract: Specificity in the *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* Partnership. *J. Bacteriol.* 182, 1779–1787.

## W

---

- Wang, L., Li, X., Hu, D., Lai, Q., and Shao, Z. (2015). *Tenacibaculum holothuriorum* sp. nov., isolated from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* intestine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4347–4352.
- Wang, Q., Zhang, X., Chen, M., Li, W., and Zhang, P. (2018). Comparison of intestinal microbiota and activities of digestive and immune-related enzymes of sea cucumber *Apostichopus japonicus* in two habitats. *J. Oceanol. Limnol.* 36, 990–1001.
- Wang, S., Ryan, C.A., Boyaval, P., Dempsey, E.M., Ross, R.P., and Stanton, C. (2020). Maternal Vertical Transmission Affecting Early-life Microbiota Development. *Trends Microbiol.* 28, 28–45.
- Ward-Rainey, N., Rainey, F.A., and Stackebrandt, E. (1996). A study of the bacterial flora associated with *Holothuria atra*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 203, 11–26.
- Weigel, B.L. (2020). Sea cucumber intestinal regeneration reveals deterministic assembly of the gut microbiome. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00489-20..
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52, 487–511.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer International Publishing).
- Wijesinghe, W.A.J.P., Jeon, Y.J., Ramasamy, P., Wahid, M.E.A., and Vairappan, C.S. (2013). Anticancer activity and mediation of apoptosis in human HL-60 leukaemia cells by edible sea cucumber (*Holothuria edulis*) extract. *Food Chem.* 139, 326–331.
- Woo, S.L., and Pepe, O. (2018). Microbial Consortia: Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9, 1801.

## X

---

- Xing, K., Yang, H., and Chen, M. (2008). Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. *Aquat. Biol.* 2, 85–92.

## Y

---

- Yamazaki, Y., Sakai, Y., Yu, J., Mino, S., and Sawabe, T. (2020). Tracking the dynamics of individual gut microbiome of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during gut regeneration. *PeerJ* 8, e10260.
- Yamazaki, Y., Meirelles, P.M., Mino, S., Suda, W., Oshima, K., Hattori, M., Thompson, F.L., Sakai, Y., Sawabe, T., and Sawabe, T. (2016). Individual *Apostichopus japonicus* fecal microbiome reveals a link with polyhydroxybutyrate producers in host growth gaps. *Sci. Rep.* 6, 21631.
- Yang, G., Xu, Z., Tian, X., Dong, S., and Peng, M. (2015). Intestinal microbiota and immune related genes in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) response to dietary  $\beta$ -glucan supplementation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 98–103.
- Ye, S., Liu, M., Wang, L., Li, R., and Li, Q. (2018). Composition and Diversity of Intestinal Microbiota of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* from Different Habitats. *Int J Agric Biol* 20, 5.

- Yokoyama, H. (2013). Growth and food source of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* cultured below fish cages — Potential for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 372–375, 28–38.
- Yu, S., Yun, E.J., Kim, D.H., Park, S.Y., and Kim, K.H. (2020). Dual Agarolytic Pathways in a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain EJY3: Molecular and Enzymatic Verification. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e02724-19.
- Yu, Z., Liu, C., Fu, Q., Lu, G., Han, S., Wang, L., and Song, L. (2019). The differences of bacterial communities in the tissues between healthy and diseased Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). *AMB Express* 9, 148.

**Z**

---

- Zamora, L.N., and Jeffs, A.G. (2013). A Review of the Research on the Australasian Sea Cucumber, *Australostichopus mollis* (Echinodermata: Holothuroidea) (Hutton 1872), with Emphasis on Aquaculture. *J. Shellfish Res.* 32, 613–627.
- Zhang, H., Wang, Q., Liu, S., Huo, D., Zhao, J., Zhang, L., Zhao, Y., Sun, L., and Yang, H. (2019). Genomic and Metagenomic Insights Into the Microbial Community in the Regenerating Intestine of the Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*. *Front. Microbiol.* 10, 1165.
- Zhao, Y., Yuan, L., Wan, J., Sun, Z., Wang, Y., and Sun, H. (2016). Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 49, 237–242.
- Zhou, Y., Yang, H., Liu, S., Yuan, X., Mao, Y., Liu, Y., Xu, X., and Zhang, F. (2006). Feeding and growth on bivalve biodeposits by the deposit feeder *Stichopus japonicus* Selenka (Echinodermata: Holothuroidea) co-cultured in lantern nets. *Aquaculture* 256, 510–520.
- Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 723–735.

## Publications

### Acceptées et publiées :

Hélène Laguerre, Grégory Raymond, Patrick Plan, Nadia Améziane, Xavier Bailly, Patrick Le Chevalier. 2020. **First description of embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea), a new species for aquaculture in the north-eastern Atlantic.** *Aquaculture*, Volume 521, 2020, 734961. DOI : 10.1016/j.aquaculture.2020.734961.

Frank David, Cédric Hubas, Hélène Laguerre, Aicha Badou, Gwen Herault, Théo Bordelet, Nadia Améziane. 2020. **Food sources, digestive efficiency and resource allocation in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea): Insights from pigments and fatty acids.** *Aquaculture Nutrition*, Wiley, 2020, 26 (5), pp.1568-1583. DOI : 10.1111/anu.13103.

### Soumise :

Laguerre Hélène, Offret Clément, Noël Cyril, Jegou Camille, Yvin M. , Fleury Y. , Le Chevalier P. **Plasticity and specificity of the coelomic microbiota among three Echinoderms: the Sea Cucumber *Holothuria forskali*, the Sea Star *Marthasterias glacialis*, and the Sea Urchin *Sphaerechinus granularis*.** Soumise à AEM, octobre 2021.

## Présentation orale

- **Présentation orale lors du colloque 6th International Marine Conservation Congress (IMCC6), le 19 août 2020 – 20'**

Symposium Title: SSO-07 Current Conservation Issues in Global Sea Cucumber Fisheries and Aquaculture

**Title: The Black Sea Cucumber *Holothuria forskali*: a new species for Aquaculture in Europe**

Auteurs : Laguerre H., Jegou C., Raymond G., Bailly X., Ameziane N., Fleury Y., Le Chevalier P.

### Abstract

In the last decades, the increasing demand of holothurian species for the Asian market have led to an uncontrolled exploitation of marine wild stocks. It has resulted in the collapse of natural resources. Aquaculture of Indo-Pacific species such as *Apostichopus japonicus* and *Holothuria scabra* has been developed since the 80s. However, the demand continue to increase. In this context, developing sea-cucumbers farming in Europe appears as a sustainable way to supply the worldwide market demand. In a pilot-scale, some European species have been described for hatchery and cultivating procedures such as *H. mammata* and *H. polii*. Another candidate for Aquaculture in Europe is *H. forskali*, a native and non-exploited species from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea. The HOLOFARM project (2018-2021), financed by the European Maritime and Fisheries Fund in France, aims to control the life cycle of *H. forskali* and develop a new innovative aquaculture. In this project, the first complete and successful breeding was described in hatchery, from reproduction to settlement and micronursery (Laguerre et al., doi:10.1016/j.aquaculture.2020.734961). This study permitted to validate the breeding season in April for the Glenan Archipelago (South Brittany, France), to describe the spawning behaviour, the embryonic and larval development of *H. forskali*. Metamorphosis was reached in 42 days, and 4 centimetres juveniles have been obtained after 300 days. Even if this work was carried out in a lab-scale, these preliminary results are very encouraging for the domestication of this species, and additional works will improve zootechnical procedures. In parallel, the coelomic fluid microbiota of sea cucumber is analysed by both metabarcoding and cultivable approaches. The first results showed a cultivable microbiota of  $10^5$  CFU/ml, a higher biodiversity for the sea-cucumber microbiota compared to the seawater, and the presence of unique species with antimicrobial activity, suggesting potential uses as probiotics in aquaculture.



## Posters

- Présentation d'un poster dans le cadre de la journée Biogenouest / webinar du 17 novembre 2020

Titre: Exploring the coelomic microbiota of a wild population of the Sea-cucumber *Holothuria forskali* from Brittany, France

Auteurs : LAGUERRE Hélène, JEGOU Camille, FLEURY Yannick, LE CHEVALIER Patrick

# Exploring the coelomic microbiota of a wild population of the Sea-cucumber *Holothuria forskali* from Brittany, France

LAGUERRE Hélène, JEGOU Camille, FLEURY Yannick, LE CHEVALIER Patrick

Univ. Brest, Univ. Bretagne Sud, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, F-29334 Quimper, France  
Helen.laguerre@univ-brest.fr

---

### Context & objectives

*Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823) is an undomesticated sea-cucumber native to the NE Atlantic and the Mediterranean Sea, which represents a new candidate for aquaculture in Europe.

A French collaborative project – HOLOFARM – was built to control the life cycle of *H. forskali* and explore its microbiota. The first successful embryonic and larval rearing was carried out in 2018 (Laguerre et al., 2020).

To develop a new aquaculture and prevent disease, it is essential to focus on the microbiota contained in the coelomic fluid, a key compartment for immunity (Smith et al., 2015) and a potential reservoir of probiotics (León-Palmero et al., 2018).

➤ This present study explores the coelomic microbiota of 15 wild and healthy specimens of *H. forskali* collected in the Glenan Archipelago (Brittany, France), in February 2019.

### Material & methods

**SAMPLES COLLECTION**  
Sea cucumbers (n=15)  
+ seawater (n=3)

**COELOMIC FLUID SAMPLING**

- Samples of *H. forskali* (n=15) and seawater (n=3) were collected by scuba diving in the Glenan Archipelago (Brittany, France).
- The coelomic fluid was collected with a needle under aseptic conditions and then spun for 10' at 14000g.
- DNA from the pellets was extracted with the QIAamp DNA Stool Kit (Qiagen, Germany).

**TOTAL MICROBIOTA METABARCODING 16S r-rs**

Barcoding sequencing technology

**COMPOSITION & DIVERSITY**

- PCR with barcoded primers: BactD2-4w (p-ccatcaaccctccctccca) r/ r BactD2-rv (p-gaacacacacagccatctctc) r/ r (Taberlet et al., 2018) performed in the ABI316 platform (Geneva, France).
- DNA was sequenced by PACTERS (Geneva, Switzerland).
- The data were then analyzed by bioinformatics with the pipeline Trips available on the Galaxy server (Jaccard et al., 2018) and statistics with the package PhyloSeq (McIntyre and Holmes, 2013) and Vegan (Oksanen et al., 2016) on R.

---

### Results: Comparison of the coelomic microbiota of *H. forskali* and the bacterial communities of seawater

#### ALPHA-DIVERSITY

Fig. 1: Alpha-Diversity indices

Sample	Spies	Chao1	Obs	ACE	Simpson	Shannon
Coelomic fluid	366.288	374	23.07	289.73	0.04	2.34
Seawater	298.516	331	18.96	233.94	0.07	2.03

Alpha-diversity analyses exhibit differences between the 2 types of samples: an intrinsic richness and diversity higher for *H. forskali*.

#### TAXONOMICAL COMPOSITION OF BACTERIAL COMMUNITIES

The relative compositions of the coelomic microbiota and the bacterial communities in seawater were both dominated by the phylum Proteobacteria (~1/2 of the total abundance), Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes and Euryarchaeota; these 5 phyla accumulated 95% of the total abundance.

Fig. 4: The 15 most abundant orders in the coelomic microbiota of *H. forskali* and in the bacterial communities of seawater

At a lower taxonomic rank, the results showed different patterns:

- The most abundant orders were Flavobacteriaceae and Rhodobacteriales for both, but with different OTUs.
- The composition of bacterial communities in seawater varied between samples, while it is more homogeneous for *H. forskali*.
- In the coelomic microbiota of *H. forskali*, the major part of the OTUs was specific: only 109 OTUs were shared (14%), unlike seawater (74%).

---

#### BETA-DIVERSITY

The analysis of network (distance matrix of Bray-Curtis) revealed 2 distinct groups: the samples of coelomic fluid microbiota and the bacterial communities of seawater.

Fig. 6: Plot of the network representation of sample associations.

#### Venn Diagram of shared OTUs

Fig. 5: Venn Diagram of shared OTUs

---

### Conclusion & perspectives

#### CONCLUSIONS

Comparison between bacterial communities in the seawater and the coelomic microbiota of *H. forskali* from Brittany (France) demonstrated significant ecological differences, in terms of richness, diversity and composition:

- the coelomic microbiota of *H. forskali* exhibits the highest alpha-diversity;
- the phylum Proteobacteria and the order Flavobacteriales were dominant;
- specific assemblies of orders in bacterial composition.

#### HYPOTHESIS - PERSPECTIVES

Due to the taxonomical affiliation and the presence of abundant specific OTUs in the coelomic microbiota of *H. forskali*, we can hypothesize that there is a selected coelomic 'core microbiota':

- How is made this selection: by the microbiota, the host *H. forskali*, or the holobionts ?

### References

- Tardieu, F., Azer, S., Namati, M., Montalvano, M., Caspary, L., Witt, S., Korman, S., Herrero-Santos, G., Cornils, G., Neud, H., 2018. FRODO: Free Supply OTU with Online Selection. *Bioinformatics* 34, 1247-1254.
- Laguerre, H., Néron, G., Rice, D., Sarré, B., Le Gall, J., 2020. First description of embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuriidae) in a new species for aquaculture in the central eastern Atlantic. *Aquaculture* 521, 104811.
- León-Palmero, J., Unger, A., Álvarez, F.A., Martín-Fernández, A., Ferrás, J., Ferrás, J., 2018. Diversity and taxonomical potential of sea anemone and holothurian microbiomes. *PLOS ONE* 13, e0197678.
- McIntyre, A.B., Holmes, J.S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, e0127170.
- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McBratney, A., O'Hara, R., Simpson, G., Solow, R., Steiner, M., Taves, G., Warton, D., 2020. *vegan*: Community Ecology Package. R package version 2.0-3. https://doi.org/10.18179/vegan
- Smith, H., Dale, S., Pirovano, F., Wu, L., Jiang, C., Deshaie, C., Nettles, S., Ferrás, J., Ferrás, J., 2015. Sea cucumber microbiota (preprint): a key resource for expanding reproductive biology and molecular approach. *Aquac. Res.* 46, 2107-2115.
- Smith, G.D., Jones, K., Gopal, H., Vaidyanathan, S., Williams, R., McKee, J., Bailey, A., Brown, K., Hogg, G., 2015. *PhyloSeq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data*. *PLoS ONE* 10, e0127170.
- Taberlet, P., Broge, A., Druge, L., Olsson, K., 2018. Environmental DNA for Biodiversity Research and Monitoring. *Nature Reviews Ecology and Systematics*.

---

### Conclusion & perspectives

#### Acknowledgements & Funds

This work was funded by European Maritime and Fisheries Fund in France (HOLOFARM project, 18368) - Interregional Agreement of the Brittany region (HoloFarm project) and funded by the Pôle Mer Cluster. Hélène Laguerre was supported by a "Doctorant-Biologie Océanographique" grant (no. 1503). Thanks to Christine Michel (CNRS) and Etienne Michel (University).



- Présentation d'un poster animé au 10<sup>ème</sup> congrès de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne.

Du 15 au 19 novembre 2021- MARSEILLE (en distanciel)

**Titre : Diversité et plasticité du microbiote du concombre de mer *H. forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) au cours de son cycle de vie**

Hélène Laguerre 1, Cyril Noël 2, Camille Jegou 1, Yannick Fleury 1, Patrick Le Chevalier 1

1 : Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM EA 3884), Université de Bretagne Occidentale

2 : Sebimer, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER)

Référence : sciencesconf.org:afem-10:372575

---

Le microbiote joue un rôle essentiel dans la santé et le développement de l'hôte depuis ses premiers stades de vie. De nombreuses études ont été menées sur le microbiote des larves, des juvéniles et des stades adultes d'animaux marins, mais aucune sur l'évolution de ce microbiote tout au long de la vie. Le concombre de mer *H. forskali* est une espèce qui focalise l'attention en Europe, comme nouvelle espèce pour la diversification aquacole. Cette étude analyse le microbiote d'un cheptel de *Holothuria forskali* à différents stades de développement par metabarcoding 16S – V4: le microbiote cœlomique de géniteurs sauvages et de ces géniteurs après plusieurs mois de captivité, le microbiote chez d'embryons, de larves *Auricularia* et de juvéniles issus des reproductions. Les résultats mettent en exergue l'existence de microbiotes différenciés, à la fois spécifiques d'un stade de vie et également distincts des communautés bactériennes de l'environnement. Ainsi, le microbiote embryonnaire présente des abondances plus importantes en Spirochaetales et Enterobacterales et les juvéniles en Burkholderiales. Par ailleurs, il apparait des liens étroits entre les compositions des microbiotes des stades de vie précoces (embryons, larves) et de communautés bactériennes de l'eau d'élevage, soulevant en partie l'hypothèse d'un transfert horizontal. La présence de taxa abondants et prévalent à chaque stade de vie suggère une importance fonctionnelles de ces groupes bactériens pour l'hôte. Finalement, les microbiotes cœlomiques de géniteurs sauvages et de géniteurs stabulés pendant 7 mois en captivité présentent des différences significatives en terme de composition et diversité, démontrant l'effet de la captivité sur la microbiote de l'hôte.

---

Type : oral / poster animé

Thématiques : Interactions Biotiques. Concept d'Holobionte

Mots-Clés : *Holothuria forskali* ; concombre de mer ; microbiote ; cycle de vie ; Metabarcoding 16S ; Larves ; Juvéniles ; captivité

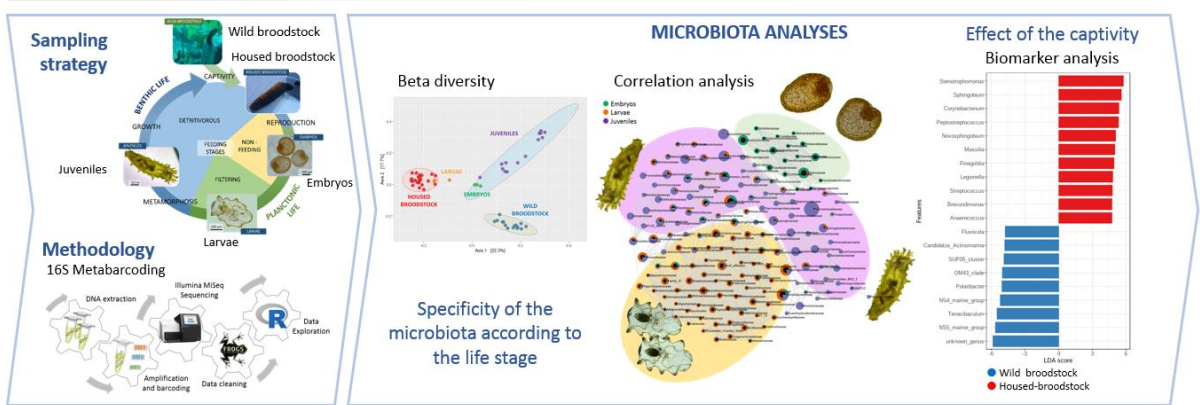
# Diversity and plasticity in the microbiota of *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) throughout its life cycle

Laguerre Hélène<sup>1\*</sup>, Noël Cyril<sup>2</sup>, Jégou Camille<sup>1</sup>, Fleury Yannick<sup>1</sup>, Le Chevalier Patrick<sup>1</sup>

1: University of Brest, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, 29334 Quimper, France

2: IFREMER-IRSI, Service de Bioinformatique (SeBiMER), 29280 Plouzané, France

\* Helene.laguerre@univ-brest.fr



**Titre :** Microbiote des Echinodermes : spécificité et plasticité des microbiotes de *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea)

**Mots clés :** microbiote, *Holothuria forskali*, échinodermes, metabarcoding 16S, microbiote cultivable, aquaculture

Le microbiote joue un rôle essentiel dans la santé et le développement de l'hôte, depuis ses premiers stades de vie. Avec le développement des techniques de séquençage de nouvelle génération, la compréhension des interactions complexes hôte – microbiote – environnement est devenue possible, notamment chez les invertébrés marins.

Parmi ceux-ci, les échinodermes constituent un groupe taxonomique exclusivement marin et particulièrement intéressant par leur position phylogénétique.

L'objectif principal de cette thèse a porté sur la caractérisation des variations du microbiote de *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) par metabarcoding 16S, et ce, à plusieurs échelles.

L'existence d'un microbiote spécifique associé à un hôte échinoderme, à un compartiment anatomique et à un stade de vie a été démontrée.

Par ailleurs, ces microbiotes varient en fonction des paramètres de l'environnement, notamment de la niche écologique, mais aussi en fonction de l'état physiologique de l'hôte.

En parallèle de ces travaux réalisés en métagénomique, le microbiote cultivable a été suivi et des souches ont été isolées afin de constituer une souchothèque d'intérêt pour l'aquaculture. Parmi ces souches, 142 souches antibactériennes ont été identifiées sur la base de leur ADNr 16S et sont affiliées majoritairement aux genres *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Vibrio*, très abondants dans les microbiomes marins.

Ainsi, les travaux de thèse ont mis en exergue la spécificité et la plasticité des microbiotes chez l'hôte *H. forskali*, mais également l'existence d'un core microbiote résidentiel composé de genres bactériens marins ubiquistes, jouant très probablement un rôle essentiel dans l'homéostasie de l'holobionte.

**Title:** The echinoderm Microbiota: specificities and plasticity in the microbiota of *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea)

**Keywords:** microbiota, *Holothuria forskali*, Echinoderms, 16S Metabarcoding, culturable microbiota, aquaculture

Microbiota plays an essential role in the health and the development of the host, from its earliest stages of life. With the development of next-generation sequencing technologies, understanding the complex host - microbiota - environment interactions has become possible, especially in marine invertebrates. Among them, the echinoderms constitute an exclusively marine taxonomic group and particularly interesting by their phylogenetic position.

The main objective of this thesis focused on the characterization of the variations in the microbiota of *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) by 16S metabarcoding, in multi-scale analyses.

The existence of a specific microbiota associated with an echinoderm host, an anatomical compartment and a life stage has been demonstrated.

Moreover, these microbiota vary according to environmental parameters, in particular with the ecological niche, but also according to the physiological state of the host.

In parallel to this work on metagenomics, the cultivable microbiota was also monitored and strains were isolated in order to constitute a strain library for aquaculture. Among these strains, 142 antibacterial strains were identified on the basis of their 16S rDNA and were mainly affiliated with the genera *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* and *Vibrio*, very abundant in marine microbiomes.

Thus, this thesis work highlighted the specificity and plasticity of the microbiota in the host *H. forskali*, but also the existence of a residential core microbiota composed by ubiquitous marine bacteria, probably playing an essential role in holobiont homeostasis.

