



HAL
open science

La spécificité parasitaire des monogènes pour leur(s) hôte(s) sparidés (téléostéens, perciformes) : approches expérimentales et fonctionnelles à l'échelle de l'holobionte

Judith Revault

► **To cite this version:**

Judith Revault. La spécificité parasitaire des monogènes pour leur(s) hôte(s) sparidés (téléostéens, perciformes) : approches expérimentales et fonctionnelles à l'échelle de l'holobionte. Microbiologie et Parasitologie. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS056 . tel-04713647

HAL Id: tel-04713647

<https://theses.hal.science/tel-04713647v1>

Submitted on 29 Sep 2024

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

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

Sorbonne Université

Thèse
pour obtenir le grade de
Docteur de Sorbonne Université

Préparée au sein de l'École Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme :
Évolution et Écologie (ED 227)

Unité de recherche
Biologie Intégrative des Organismes Marins (BIOM, UMR 7232)

Thèse de doctorat de Biologie

**La spécificité parasitaire des monogènes pour
leur(s) hôte(s) sparidés (téléostéens, perciformes) :
approches expérimentales et fonctionnelles à
l'échelle de l'holobionte**

Judith REVAULT

27/03/2024

Devant un jury composé de :

M. Juan Antonio BALBUENA	Professeur, Université de Valence	Rapporteur
M. Pierre SASAL	Chargé de recherche HDR, CNRS	Rapporteur
M. Pierre GALAND	Directeur de recherche, CNRS	Examineur
M. Nicolas NÈGRE	Professeur, Université de Montpellier	Examineur
Mme Myriam REVERTER	Maîtresse de conférences, Université de Plymouth	Examinatrice
Mme Elodie MAGNANOU	Ingénieure de recherche HDR, CNRS	Directrice de thèse
M. Yves DESDEVISES	Professeur, Sorbonne Université	Co-directeur de thèse
Mme Nathalie TAPISSIER	Maitresse de conférences HDR, UPVD	Co-encadrante de thèse

Remerciements

Je voudrais dans un premier temps remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Juan Antonio Balbuena, Pierre Sasal, Myriam Reverter, Nicolas Nègre et Pierre Galand.

Merci également à tous les membres de mon Comité de Suivi Individuel, Marcelino Suzuki, Nicolas Nègre et David Duval pour avoir accepté d'en faire partie, et pour vos conseils et encouragements.

Je voudrais ensuite exprimer toute ma gratitude envers mon équipe encadrante, qui a su me guider avec gentillesse et humour dans l'océan trouble du doctorat. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié ce sujet passionnant.

Merci Élodie Magnanou, pour ton optimisme à toute épreuve. Ton soutien m'a été d'une grande aide tout au long de ce travail et je n'oublierai pas ces 3 années à tes côtés.

Merci Nathalie Tapissier, pour tes encouragements constants et d'avoir eu la patience de m'apprendre la métabolomique *from scratch*.

Merci Yves Desdevises, le relecteur du Far(north)West, qui corrige plus vite que son ombre. Merci pour ton implication malgré ton emploi du temps délirant.

Merci Sophie Sanchez pour ta douceur et pour m'avoir fait découvrir Banyuls.

J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes et je vous souhaite plein de beaux projets (financés !!).

Merci à Mathilde Scheifler, sans qui je n'aurais sûrement pas fait cette thèse. Merci de m'avoir tout appris, transmis, de m'avoir tant aidée depuis mon master. Je te souhaite de réussir, même si je ne me fais aucun de souci pour toi.

Je tenais à remercier personnellement Pascal qui s'est beaucoup investi dans mon projet de thèse et qui a dû à plusieurs reprises, été comme hiver (et pour son plus grand bonheur, j'en suis sûre), capturer de nuit des poissons. Merci également à Valentin Logeux qui a été son compagnon de (ou d'in)fortune, ainsi qu'à tous les plongeurs et marins qui se sont quelques fois joints à eux.

Ce projet de thèse n'aurait pas été possible sans l'immense aide du service aquario, Pascal et Valentin (encore), mais aussi Rémi, qui m'ont tout appris avec rigueur, gentillesse et patience malgré des poissons récalcitrants et mon inexpérience totale dans ce domaine. Je n'oublie pas Nancy, Manon, Nanuk, Julien et Vincent. Merci à vous tous, pour votre bonne humeur, vos belles valeurs, et le temps consacré à apaiser aussi bien le stress des poissons que le mien. J'ai appris plein de choses passionnantes à vos côtés.

Quand on débarque de Paris, s'immerger dans le monde de la pêche n'est pas forcément évident. J'y ai pourtant pris un immense plaisir (malgré des réveils à 4h, vous imaginez), aux côtés des marins du labo, mais également auprès de George Jaumes et Laurent qui m'ont tous accueilli avec une gentillesse infinie. Même si vous vous amusez de me voir mal sur une mer à peine agitée, vous m'avez permis de découvrir un bout de votre métier (et des levers de soleil à couper de souffle) et je vous en remercie.

Merci à Marie-Line Escande, pour son implication et son humour. Notre persévérance a payé, et nous avons été les premières à découvrir la terrifiante beauté des larves de *Lamellodiscus*, merci pour cela. Je te souhaite plein de belles choses pour ta retraite. Merci aussi à Yonko Gorand qui m'a fait découvrir l'addiction au MEB (ce n'est pas une nouvelle drogue).

Merci à toutes les personnes du BIOM qui ont été présentes pour moi et qui ont pu m'aider ces trois dernières années, je pense notamment à Michaël Fuentes et à Marc Besson. Merci à Laurence, ma boomeuse préférée qui, même si elle ne sait pas qui est Baboo, reste une personne drôle et attachante.

Merci à la plateforme Bio2Mar et à tous ceux qui la font vivre, c'était un vrai plaisir de travailler dans ce cadre privilégié. Merci à Nyree West et Laurent Intertaglia pour leur aide.

Merci à toutes les personnes de l'UPVD qui m'ont formée et aidée en métabolomique, que ce soit dans les injections, les scripts ou l'analyse des données, je pense notamment à Delphine, Slimane, Christelle et Chloé.

Merci à tous les stagiaires qui m'ont beaucoup aidée sur le comptage et l'identification infinis de *Lamellodiscus*, merci à Nicolas, Mona, Tom et Emma. Merci à Océane, pour son aide précieuse en biologie moléculaire. Merci beaucoup à Thomas qui a lancé toutes les manip d'aquario et avec qui on a fait pondre les premiers *Lamellodiscus* sur des airs de petit bonhomme en mousse, tu verras les pokémons ne sont pas si mignons vu de près ! C'était pour moi un vrai plaisir de travailler avec vous tous (et j'espère que l'inverse est vrai).

Trois ans de thèse ça passe vite finalement, surtout si on a la chance d'être bien entourée comme je l'ai été dans ce coin si reculé qu'est Banyuls.

Je pense en premier au starter pack de qualité : Anaël, qui a été un vrai repère dès mon arrivée et à laquelle je me suis accrochée comme une moule à son rocher (la pauvre) et Léo le fumeur invétéré qui n'a pas épargné mes poumons (je te bats quand tu veux à la coinche).

Mais je pense aussi bien évidemment à tous mes collègues de pause, de repas, de quotidien Chinchilman, Loulou, Dave, Camille, Bastien, Florian, Émilaï et Lucile et à tous les autres copains ici ou plus loin. Je n'oublie pas mes deux acolytes, From du cirque des Triabricots et Cexou qui savent tous les deux dans quoi se reconvertir si la recherche ne leur plait plus.

Merci Lisa d'avoir été là, je suis bien triste de te voir partir aussi loin, mais ne crois pas te débarrasser de moi comme ça, tu connais ma persévérance.

Merci à ma sœur Louise pour ses innombrables relectures (mais gardons l'illusion, je ne suis si pas si mauvaise en orthographe), et à mes parents pour leur soutien et leur envie de me voir réussir.

Je voudrais terminer ces remerciements par deux personnes avec qui j'ai pu établir des symbioses particulièrement bénéfiques pour mon écosystème (il faut lire l'introduction pour comprendre).

Je pense bien évidemment à Karine, mon K, mon pilier pendant 2 ans de thèse, une rencontre qui marquera définitivement mon aventure banyulencque mais pas que, et elle le sait.

Enfin, et c'est loin d'être un détail, merci à Coline. We did it.

Activités connexes au doctorat

Communications scientifiques

- 24-29 juillet 2022 : Participation au congrès international « ISS10/holobiont3 » à Lyon ; **présentation d'un poster** : **Revault J**, Scheifler M, Tapissier-Bontemps N, Raviglione R, Sanchez-Brosseau S, Magnanou E, Desdevises Y (2022) The link between external microbiota and monogenean ectoparasites in Sparids (Teleostei)
- 15-18 novembre 2022 : Participation au congrès international « International Symposium on Ecology and evolution of marine parasites and diseases » à La Rochelle; **oral** : **Revault J**, Scheifler M, Tapissier-Bontemps N, Raviglione R, Sanchez-Brosseau S, Magnanou E, Desdevises Y (2022) Using molecular and experimental approaches to uncover how *Lamellodiscus* monogeneans establish specificity for their sparids (Teleostei) hosts
- 24-26 mai 2023 : Participation aux 15èmes journées scientifiques du réseau français de métabolomique et de fluxomique à Perpignan ; **présentation d'un poster** : **Revault J**, Raviglione R, Sanchez-Brosseau S, Desdevises Y, Magnanou E, Tapissier-Bontemps N (2022) The link between external microbiota, metabolome and monogenean ectoparasites in Sparids (Teleostei)

Formations

- 17-20 mai 2021 : Applications de R pour le prétraitement et l'analyse statistique multivariée de données produites par spectrométrie de masse ou par RMN : 30h – MNHN, Distanciel
- 4-6 mai 2022 : Microbiodiversité, entre écosystèmes, évolution et société : 18h – MNHN, Paris
- 9-17 janvier 2022 : Conception ou réalisation de procédures expérimentales sur modèle aquatique : 40h – CNRS, Marseille
- 2-5 novembre 2021 : Journées d'intégration et de préparation opérationnelle au projet professionnel (IPOPP) : 28h – MNHN, Concarneau
- 01 septembre - 30 novembre 2022 : Ethique et intégrité scientifique : 15h – Université de Lyon, Distanciel (MOOC)

Encadrements étudiants

- De mars à juin 2021 Thomas Tottoli, Université de Montpellier, stage de master 1
- Du 3 au 28 janvier 2022 : Mona Mesples, Université Grenoble Alpes, stage de licence 3
- Du 10/01 au 25/02/2022 : Tom Benel, Université de Nîmes, stage de licence 3
- Du 09/05 au 10/06/2022 : Nicolas Drieu La Rochelle, Université de Poitiers, stage de licence 3
- Du 01/01 au 30/06/2022 Océane Reneteaud, Université Côte d'Azur, stage de master 2
- Du 07/06/2022 au 29/07/2022 Emma Figuls, Université Paris Saclay, stage de licence 3

Enseignements

- Animation d'un TP « initiation au parasitisme chez les téléostéens » auprès d'élèves de troisième en stage d'observation. 1h30 – 10 séances
- Animation d'un TP auprès d'élèves de licence 2 de Sciences de la Vie (Sorbonne Université), UE DIMAR (Diversité des Interactions Marines). 2h – 2 séances

Diffusions grand public

- 02/10/2021, 15/10/22 et 14/10/23 : Création et animation d'un atelier lors de la **fête de la science** « Parasites : jamais sans mon poisson ».
- 19/12/2021 : Présentation « Le parasitisme chez les téléostéens » lors d'un séminaire de l'**Association des Amis du Laboratoire Arago (AALA)**

Résumé

Alors que les poissons téléostéens représentent les deux tiers des vertébrés marins, l'interaction entre leur microbiote externe et leur environnement reste peu étudié, en particulier chez les populations sauvages. Ainsi, le lien entre le microbiote et les ectoparasites n'est pas bien compris. Le microbiote peut agir comme une barrière protectrice contre les pathogènes et/ou être impliqué dans la reconnaissance de l'hôte par les parasites. Les associations hôte-parasite devraient désormais être considérées comme des interactions tripartites où le microbiote façonne le phénotype de l'hôte et sa relation avec les parasites. Ces interactions ont déjà été décrites chez certaines espèces de téléostéens qui peuvent être parasitées par des monogènes (Plathelminthes) qui sont des ectoparasites à cycle de vie direct que l'on trouve couramment sur leur peau et leurs branchies. Leurs larves nagent activement, s'orientent et repèrent leur hôte grâce à des stimuli chimiques. Les communautés bactériennes sont soupçonnées de contribuer à la production de ces signaux et pourraient donc jouer un rôle important dans les mécanismes de spécificité parasitaire.

L'objectif de cette thèse était d'explorer les mécanismes qui sous-tendent la spécificité des monogènes pour leur(s) hôte(s) en caractérisant le microbiote, la composition chimique du mucus externe des téléostéens (peau et branchies), et en développant des approches expérimentales pour mieux caractériser le rôle des stades précoces des *Lamellodiscus* dans cette spécificité. Nous nous sommes concentrés sur l'association entre les Sparidae, une famille de poissons retrouvée en Méditerranée, et les monogènes du genre *Lamellodiscus* qui présentent des profils de spécificité variés pour leurs hôtes.

Au cours de cette thèse, nous avons tout d'abord (i) étudié l'évolution des communautés bactériennes du mucus externe de deux espèces sauvages de sparidés présentant des charges parasitaires en *Lamellodiscus* contrastées. Nous avons ensuite (ii) caractérisé les communautés bactériennes et la composition chimique du mucus externe de quatre espèces de sparidés sauvages et étudié l'influence de différents facteurs sur leur variabilité (environnementaux ou propres à l'hôte). Nous nous sommes ensuite concentrés sur une espèce qui n'est jamais parasitée par les monogènes du genre *Lamellodiscus*. Nous avons exploré si cette espèce se distinguait des trois autres par une signature bactérienne et chimique particulière qui pourrait expliquer sa protection vis à vis des *Lamellodiscus*. Enfin, l'objectif de la dernière partie (iii) était de développer des approches expérimentales pour comprendre quels facteurs sont susceptibles de favoriser l'établissement et le maintien des différents stades de vie du parasite sur son hôte. Un système non-invasif de collecte d'œufs de *Lamellodiscus* a d'abord été développé. À partir de là, nous avons pu établir des conditions optimales de maintien in vitro d'œuf de *Lamellodiscus* pour favoriser leur éclosion. Nous avons, alors, réalisé une première caractérisation morphologique des stades de vie précoces d'une espèce de *Lamellodiscus* à l'aide de microscopie optique et électronique à balayage. En parallèle, nous avons développé une méthode pour, à terme, étudier le comportement et la préférence larvaire pour des mucus de différentes espèces de sparidés.

Mots clés : Sparidae, Mucus externe, Microbiote, Ectoparasite, Metabarcoding, Metabolomique

Abstract

While teleost fishes represent two-third of all marine vertebrates, the interaction between their external microbiota and their environment remains poorly studied, especially for wild populations. Hence, the role of their microbiota in relationship with ectoparasites is largely unknown. Microbiota can act as a protective barrier against pathogens, and/or be involved in host recognition by parasites, and host-parasite associations should be considered as a tripartite interplay where the microbiota shapes the host phenotype and its relation to parasites. These interactions have already been described in some teleost species that can be parasitized by Monogeneans (Platyhelminthes) which are direct life cycle ectoparasites commonly found on their skin and gills. Their larvae actively swim towards their host based on chemical stimuli. Bacterial communities are suspected to contribute to these cues and could play a significant role in host-parasite specificity mechanisms.

The objective of this thesis was to explore the mechanisms involved in the specificity of monogenean for their host(s) through the characterization of wild teleost external mucus (skin and gills) microbiota and metabolite production and the development of experimental approaches to better characterize the role of early life stages of *Lamellodiscus* in host specificity. We used as biological model a well-known association formed by Sparidae, a fish family found in Mediterranean Sea, and *Lamellodiscus* monogeneans, a species-rich genus that exhibits various patterns of host specificity.

During this thesis, we first (i) studied the evolution of bacterial communities in the external mucus of two wild sparid species with contrasting *Lamellodiscus* monogeneans parasitic loads. We have then (ii) characterized the bacterial communities and chemical composition of the external mucus of four wild sparid species and studied the influence of different environmental or host-specific factors on their variability. One of these species, never parasitized by the *Lamellodiscus* monogeneans, was especially studied to determine whether it has a distinct bacterial and chemical signature that could explain its protection against *Lamellodiscus*. The objective of the last part (iii) was to develop experimental approaches to investigate the factors that promote the establishment and maintenance of different life stages of monogeneans on their host. A non-invasive system was developed for collecting *Lamellodiscus* eggs in aquariums. From there, we cultured larvae in vitro by establishing optimal conditions to maintain *Lamellodiscus* eggs and induce their hatching. We conducted an initial morphological characterization of the early stages of a *Lamellodiscus* species using light and scanning electron microscopy. We have, in parallel, developed a method to ultimately study in vitro oncomiracidia behavior and preference for mucus from different sparid species.

Key words: Sparidae, External mucus, Microbiota, Ectoparasite, Metabarcoding, Metabolomic

Table des matières

Introduction générale	- 1 -
A. Les interactions entre les organismes	- 1 -
1. Les symbioses	- 1 -
2. Le microbiote et le concept d'holobionte	- 2 -
3. Le parasitisme.....	- 3 -
• Définition	- 3 -
• Déterminants de la spécificité parasitaire	- 4 -
4. L'hôte, le microbiote, les parasites : une interaction tripartite.....	- 5 -
B. Les téléostéens	- 7 -
1. Le mucus.....	- 7 -
2. Le microbiote du mucus	- 8 -
• Fonctions du microbiote	- 8 -
• Variabilité du microbiote	- 9 -
3. Les parasites des téléostéens et leur lien avec le mucus de leur(s) hôte(s).....	- 11 -
4. Les monogènes.....	- 13 -
• Biologie des monogènes.....	- 13 -
• La spécificité des monogènes	- 14 -
• Le mucus externe et le microbiote associé : quels rôles dans la relation hôte-monogènes ?..	- 16 -
C. Cadre conceptuel et méthodologie	- 19 -
1. Les méthodes d'études.....	- 19 -
• Le metabarcoding 16S	- 19 -
• La métabolomique.....	- 20 -
2. Modèle d'étude	- 21 -
3. Objectifs de la thèse	- 25 -
Chapitre I.....	- 29 -
Communautés bactériennes du mucus externe de sparidés sauvages, une comparaison intraspécifique chez des d'hôtes à charge parasitaire contrastée	- 29 -
1. Contexte	- 29 -
2. Principaux résultats	- 30 -
3. Travail réalisé.....	- 30 -
4. Manuscrit.....	- 30 -
5. Conclusion, perspectives	- 66 -
Chapitre II.....	- 69 -
Composition du mucus externe de sparidés sauvages, une comparaison entre espèces parasitées ou non par des <i>Lamellodiscus</i>	- 69 -
1. Contexte :	- 69 -
2. Principaux résultats :	- 70 -
3. Travail réalisé.....	- 70 -
4. Manuscrit.....	- 70 -
5. Conclusion, Perspectives	- 106 -
Chapitre III.....	- 109 -
Quels facteurs favorisent l'établissement et le maintien des différents stades de vie du parasite sur son hôte ?.....	- 109 -
A. Mise au point de méthodologies pour des approches <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	- 109 -
1. Contexte	- 109 -
2. Capture et maintien de sparidés sauvages en aquarium	- 110 -

3.	Collecteurs d'œufs de <i>Lamellodiscus</i>	- 111 -
4.	Maintien des œufs <i>in vitro</i>	- 114 -
5.	Conclusion, perspectives	- 115 -
B.	Tests de préférence larvaire.....	- 116 -
1.	Contexte	- 116 -
2.	Dispositifs testés au cours de ce travail.....	- 116 -
3.	Conclusion, perspectives	- 121 -
C.	Optimisation d'un protocole pour déparasiter les espèces cibles : sparidés/<i>Lamellodiscus</i> ..	- 123 -
1.	Contexte :	- 123 -
2.	Test de 3 agents antiparasitaires sur l'espèce <i>Diplodus vulgaris</i>	- 123 -
	• Les agents antiparasitaires	- 123 -
	• Modèle d'étude	- 124 -
	• Méthodes et Résultats.....	- 124 -
3.	Confirmation de l'efficacité du peroxyde d'hydrogène sur l'espèce <i>Pagellus erythrinus</i>	- 129 -
	• Modèle d'étude	- 129 -
	• Méthodes et Résultats.....	- 129 -
4.	Conclusion, perspectives	- 131 -
D.	Caractérisation morphologique des stades de vie de <i>Lamellodiscus</i>	- 132 -
1.	Contexte	- 132 -
2.	Principaux résultats	- 132 -
3.	Travail réalisé.....	- 133 -
4.	Manuscrit.....	- 133 -
5.	Conclusion, Perspectives	- 153 -
	Discussion générale	- 159 -
	Perspectives	- 165 -
	Conclusion	- 171 -
	Annexe	- 172 -
	Références.....	- 177 -

Introduction générale

A. Les interactions entre les organismes

1. Les symbioses

Si le terme « symbiose » peut être utilisé pour désigner des interactions bénéfiques entre deux organismes, il désigne historiquement une interaction étroite et durable entre différents organismes sans prendre en compte le caractère positif ou négatif de cette interaction (de Bary 1879 ; Combes 1995). Ces interactions durables entre organismes sont situées le long d'un continuum selon les effets qui s'appliquent à l'un ou à l'autre des partenaires. Ainsi, lorsque les deux partenaires tirent parti de leur association, on parle de mutualisme. Ces interactions à bénéfices réciproques sont communément retrouvées dans les écosystèmes, et participent par exemple au fonctionnement fondamental de nombreuses plantes qui s'associent avec des champignons mycorhiziens au niveau de leur racine, où chaque partenaire contribue aux besoins nutritionnels de l'autre (Smith & Read 1997). Ce type d'interaction existe également dans le milieu aquatique avec, par exemple, une association mutualiste obligatoire entre les poissons clowns et les anémones de mers (Fautin 1991). L'anémone offre un habitat protecteur au poisson clown, qui lui fournit en échange une partie de ses besoins nutritionnels essentiels émanant de ses déjections ou de ses restes de nourriture (Cleveland *et al.* 2011) et l'aide à maintenir un flux d'oxygène grâce à ses déplacements entre les tentacules, favorisant la croissance de l'anémone (Porat & Chadwick-Furman 2004).

Des associations initialement interprétées comme mutualistes peuvent dans certaines conditions basculer vers une relation où l'un des partenaires vit aux dépens de l'autre. On parle alors de parasitisme, défini comme une relation à bénéfice non réciproque où le parasite cause des effets délétères à l'hôte (Combes 2001). On peut par exemple citer l'association qui réunit les poissons labres nettoyeurs et leurs poissons clients qui cherchent à se débarrasser de leurs ectoparasites (Grutter 2001). Bien que cela offre une source de nourriture pour l'un et un moyen de contrôler sa charge parasitaire pour l'autre, cet équilibre peut se rompre si la charge parasitaire du poisson client devient trop faible (Cheney & Côté 2005). Dans ces conditions, les labres nettoyeurs se nourrissent volontiers du mucus de leur client (Grutter &

Bshary 2003), engendrant alors un coût pour ce dernier et faisant évoluer cette interaction du mutualisme vers le parasitisme (Leung & Poulin 2008).

D'autres types d'interactions sont régulièrement décrites dans la littérature (e.g., commensalisme, neutralisme, amensalisme) mais ce système de classification, bien qu'utile, ne reflète pas la dynamique des interactions symbiotiques, lesquelles peuvent varier en réponse à des changements environnementaux ou liés à l'un des deux partenaires (Leung & Poulin 2008). Ces interactions sont indispensables pour la dynamique, la structure et la stabilité des écosystèmes (Ings *et al.* 2009 ; Chomicki *et al.* 2022), mais aussi pour le développement propre des organismes qui sont en permanence associé à des symbiotes microbiens (Archie & Theis 2011).

2. Le microbiote et le concept d'holobionte

Les biologistes ont longtemps étudié le rôle que jouent les microorganismes dans des domaines comme la santé ou les cycles biogéochimiques de l'environnement, mais la considération des microorganismes dans la biologie des organismes multicellulaires est plus récente et a conduit à l'émergence du concept d'« holobionte ». Bien que ce terme ait été proposé pour la première fois par Margulis (Margulis & Fester 1991), ce concept émergeait déjà une quarantaine d'années plus tôt avec un lexique similaire (« holobiosis ») dans les travaux de Meyer-Abich (1943) (Baedke *et al.* 2020). Ce terme regroupe l'hôte et son microbiote, *i.e.* l'ensemble des microorganismes (bénéfiques ou non) avec lesquels il est associé dans une relation durable (Archie & Theis 2011). Ce concept d'holobionte s'intègre alors au sein d'une vision holistique de la biologie et de l'écologie, remplaçant l'hôte-microbiote comme super-organisme dont la biologie est le résultat de l'interaction étroite entre ces parties (Bordenstein & Theis 2015). En colonisant un hôte, les microorganismes disposent d'un habitat et d'une source de nourriture régulière et donc d'un environnement favorable à leur croissance et leur maintien. Les bénéfiques pour leurs hôtes peuvent être extrêmement divers, et les symbiotes microbiens sont aujourd'hui considérés comme essentiels à la vie animale et « végétale » (McFall-Ngai *et al.* 2013 ; Bordenstein & Theis 2015). Parmi les services rendus par le microbiote pour son hôte, on peut citer de manière non exhaustive leur capacité à : faciliter l'absorption de nutriments et la synthèse de vitamines (Clemente *et al.* 2012 ; Rosenbaum *et al.* 2015), favoriser le développement du système immunitaire (Naik *et al.* 2012), protéger l'hôte contre les pathogènes (Kumari & Yadav 2020 ; Hussain & Ghosh Sachan

2023), communiquer avec des partenaires (Theis *et al.* 2013 ; Mazorra-Alonso *et al.* 2021) et modifier leur comportement (Ezenwa *et al.* 2012). Cependant, le microbiote associé à l'hôte ne lui est pas nécessairement bénéfique et inclut parfois des associations qui peuvent devenir délétères dans certaines conditions (Jochum & Stecher 2020). Par exemple, une étude a montré que *Enterococcus faecalis* pouvait agir comme un agent colitogène et comme un microbe protecteur en fonction de la composition de la communauté bactérienne restante dans l'intestin de souris (Lengfelder *et al.* 2019).

L'association avec des microorganismes apparait fondamentale dans tous les aspects de la vie des hôtes, que ce soit dans leur développement propre ou dans les interactions qu'ils entretiennent avec leur environnement abiotique et biotique tels que les parasites.

3. Le parasitisme

- **Définition**

Les parasites sont omniprésents dans tous les écosystèmes et représentent le mode de vie le plus répandu sur terre (Price 1980 ; Lafferty 2008). Ils ont le potentiel d'exercer une influence significative sur les populations hôtes, pouvant se traduire par des effets marqués sur la mortalité, la fécondité, la croissance et le comportement de ces hôtes (Marcogliese 2004). À ce titre, les parasites sont d'importants régulateurs démographiques qui peuvent affecter différemment des populations hôtes et créer un équilibre dans la coexistence des espèces, nécessaire au maintien de la biodiversité (Poulin & Morand 1999). Ainsi, les parasites sont nécessaires à la stabilité et au bon fonctionnement des écosystèmes (Marcogliese 2004 ; Hudson *et al.* 2006 ; Hatcher *et al.* 2012).

Un parasite peut être défini selon son cycle de vie (Bush *et al.* 2001). On parle de cycle de vie direct, ou cycle monoxène, lorsque le parasite n'a besoin que d'un seul hôte pour boucler son cycle (Bush *et al.* 2001). Au contraire on parlera de cycle de vie indirect, ou cycle hétéroxène, lorsque le parasite nécessite plusieurs hôtes successifs (un ou plusieurs hôtes intermédiaires) avant d'atteindre un hôte définitif sur lequel il deviendra mature sexuellement et se reproduira (Bush *et al.* 2001). Les parasites peuvent également être définis selon leur position sur l'hôte, ils peuvent vivre à l'intérieur de l'hôte auquel cas ils sont appelés endoparasites, ou sur la surface externe, en tant qu'ectoparasites (Bush *et al.* 2001). Enfin, un parasite peut être défini par sa spécificité, qui peut notamment représenter le nombre d'hôtes qu'il est capable d'infester (Combes 2001), et pouvant refléter des mécanismes de coévolution entre ces deux

parties. Les parasites spécialistes n'exploitent qu'une seule espèce hôte, alors que les parasites généralistes sont capables d'en coloniser plusieurs. Pour autant, les parasites généralistes peuvent présenter une spécificité étroite envers des hôtes apparentés ou une spécificité plus large (Combes 1995, 2001). Si la spécificité d'un parasite peut refléter son degré d'adaptation à un ou plusieurs hôtes, des variations peuvent être observées tant dans la probabilité d'infection (prévalence) que dans le nombre de parasites présents au sein de chaque hôte (charge parasitaire), ce qui peut également être considéré comme des mesures de spécificité (Rohde 1994). Comprendre ce qui limite la gamme d'hôtes peut s'avérer crucial notamment pour prédire la transmission des parasites dans un contexte d'invasions biologiques, de perte d'habitats naturels et de changement climatique (Dunn 2009 ; Agosta *et al.* 2010).

- **Déterminants de la spécificité parasitaire**

La spécificité parasitaire semble être sous l'influence d'une multitude de déterminants qui peuvent être interconnectés et agir de manière simultanée, et qui peuvent notamment être liés au parasite, à l'hôte ou à leurs interactions. Parmi ces déterminants, les caractéristiques du cycle de vie du parasite sont susceptibles de jouer un rôle significatif ; par exemple, une spécificité plus stricte est généralement observée chez les parasites au cycle de vie direct par rapport à ceux qui possèdent un cycle de vie indirect (Poulin 1992 ; Adamson & Caira 1994). Cela peut s'expliquer par le fait que les parasites avec un cycle de vie direct sont plus activement engagés dans la recherche de leur hôte, contrairement aux parasites au cycle de vie indirect dont la transmission se fait principalement à travers des mécanismes de prédation (Poulin 1992). La complexité du cycle de vie du parasite semble également influencer une part de cette spécificité, où différents stades de développement du parasite peuvent présenter des niveaux variables de spécificité vis-à-vis de leurs hôtes successifs (Bellay *et al.* 2013). Des processus de spécialisation peuvent également s'expliquer par des phénomènes de compétition interspécifique entre les espèces de parasites partageant le même écosystème et donc les mêmes hôtes potentiels (Adamson & Caira 1994 ; Rohde 1994). La spécificité parasitaire peut également être expliquée par des facteurs liés à l'hôte, tels que son âge ou sa taille (Sasal *et al.* 1999 ; Cardon *et al.* 2011). En effet, il a été observé que les parasites se spécialiseraient davantage sur des hôtes de grande taille, phénomène interprété comme une spécialisation sur une ressource perçue comme prédictible (Sasal *et al.* 1999). Le nombre

d'hôtes disponibles dans le milieu, et donc les opportunités de colonisation qui s'offrent au parasite, semble également expliquer une partie de la spécificité parasitaire (Poulin 1992). Cette notion rejoint l'idée que certains parasites se concentrent sur un hôte abondamment disponible dans le milieu et pourraient élargir leur niche écologique si l'effectif de cet hôte principal venait à diminuer. L'écologie de l'hôte, notamment son régime alimentaire, va aussi conditionner les mécanismes de spécificité, particulièrement chez les parasites au cycle de vie indirect dont la transmission d'un hôte à un autre repose sur leur comportement alimentaire (Adamson & Caira 1994).

La spécialisation peut dériver de l'interaction que les parasites ont avec leur hôte. Par exemple, l'interaction intensive d'un parasite avec le système immunitaire de l'hôte peut mener à des spécialisations (Adamson & Caira 1994). En effet, les stratégies d'évitement ou d'exploitation des défenses de l'hôte ne sont pas facilement généralisables d'un hôte à un autre, et rendent difficile la capacité de ces parasites à survivre sur des hôtes non habituels (Adamson & Caira 1994 ; Buchmann 1999). Une spécialisation morphologique peut également être observée chez certains parasite pour exploiter au mieux l'hôte infesté tout en restreignant le spectre d'hôtes potentiellement exploitables (Mendlová & Šimková 2014). Ces mécanismes de spécialisations peuvent être à l'origine de biologies particulières chez les parasites s'adaptant à l'écologie et à la stabilité de leurs hôtes potentiels dans les écosystèmes, et favorisant des stratégies de reproductions (e.g., nombre et taille des œufs, développement embryonnaire, enkystement) tout en limitant le spectre d'hôtes accessibles (Koprivnikar & Randhawa 2013 ; Doherty *et al.* 2022).

Enfin, parmi les pistes explorées pour expliquer les variations de spécificité de l'hôte, un nombre croissant d'études suggèrent l'implication du microbiote dans les interactions hôte-parasite (Hahn & Dheilly 2016 ; Stevens *et al.* 2021 ; Speer 2022).

4. L'hôte, le microbiote, les parasites : une interaction tripartite

Si de nombreuses études ont identifié des différences de microbiote entre des organismes parasités et non parasités (Lee *et al.* 2014 ; Federici *et al.* 2015 ; Afrin *et al.* 2019 ; Kashinskaya *et al.* 2021 ; Lutz *et al.* 2022 ; Rajarajan *et al.* 2022), il est néanmoins compliqué d'établir si ces différences sont une cause ou une conséquence des infestations parasitaires. Lorsque les différences préexistent à l'infestation parasitaire, le microbiote peut favoriser l'attraction,

l'établissement et la survie du parasite sur l'hôte. Par exemple, les bactéries qui colonisent les plaies des vertébrés à sang chaud semblent attirer les mouches parasites qui pondent leurs œufs ou leurs larves sur les plaies infectées ou nécrosées (Hall 1995). Une expérience *in vitro* a montré que plusieurs bactéries semblaient guider et attirer les parasites nématodes du genre *Strongyloides* vers leur hôte (Chavez *et al.* 2021). D'autres exemples de bactéries du microbiote impliquées dans la détection des hôtes existent dans les études sur la préférence des moustiques pour des hôtes particuliers. En effet, des expériences en laboratoire ont révélé que le moustique *Anopheles gambiae*, l'un des principaux vecteurs du paludisme chez l'homme, était plus attiré par les individus dont les communautés bactériennes cutanées étaient moins diversifiées et comprenaient la bactérie *Staphylococcus epidermis* (Verhulst *et al.* 2010). D'autres composants du microbiote cutané humain comme *Pseudomonas* spp et *Variocotax* semblent au contraire expliquer la protection de certains individus face aux moustiques (Verhulst *et al.* 2010). Ainsi, le microbiote préexistant aux infestations parasitaires peut également être impliqué dans une protection contre le parasitisme. Par exemple, le genre bactérien *Spiroplasma* protège *Drosophila neotestacea* contre les effets stérilisants d'un nématode parasite (Jaenike *et al.* 2010), et ce même genre bactérien s'est également montré efficace pour protéger une autre espèce de drosophile des guêpes parasites (Xie *et al.* 2010). Enfin, la restauration de bactéries (*Janthinobacterium lividum*) provenant d'espèces d'amphibiens sauvages à des amphibiens en captivité a permis d'augmenter la survie de ces derniers face au champignon parasite *Batrachochytrium dendrobatidis* (Kueneman *et al.* 2016).

A l'inverse, les différences de microbiote peuvent être le résultat d'une infestation parasitaire. Une étude récente a démontré que l'infection par un crustacé ectoparasite était responsable d'un changement du microbiote de la nageoire d'un poisson d'eau douce, et que ce changement était limité à la zone où le parasite s'ancrait (Mathieu-Bégné *et al.* 2023). Ces changements peuvent être provoqués par un stress immunitaire (Ilgová *et al.* 2021), ou par une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte induit par le parasite (Cotton *et al.* 2012 ; Cooper & Eleftherianos 2016 ; Rausch *et al.* 2018), réduisant sa résistance à d'autres microorganismes opportunistes. Il est également possible que le parasite engendre des changements histopathologiques dans les tissus de l'hôte qui sont susceptibles de perturber le microbiote établi et de favoriser l'installation de nouveaux microorganismes (Rahman *et al.*

2015 ; Zhang, Li, *et al.* 2015 ; Zhang *et al.* 2018). Enfin, le parasite pourrait agir comme vecteur de microorganismes via son microbiote (Chavez *et al.* 2021), les transportant directement sur l'hôte qu'il infeste (Dheilly 2014).

L'ensemble de ces études mettent en évidence les liens complexes qui s'établissent entre l'hôte, son microbiote et les parasites. Ainsi, les associations hôte-parasite doivent désormais être considérées comme des interactions tripartites où le microbiote gouverne une partie des mécanismes de spécificité parasitaire et façonne la relation de l'hôte avec ses parasites.

B. Les téléostéens

1. Le mucus

Les téléostéens sont présents dans tous les milieux aquatiques et représentent plus de la moitié des vertébrés, avec plus de 28 000 espèces décrites (Nelson *et al.* 2016). La grande majorité des téléostéens sont recouverts d'une couche de mucus continuellement produite tant sur leurs surfaces internes (e.g., intestin) qu'externes (e.g., peau et branchies) (Shephard 1994 ; Esteban 2012).

Ce mucus est une matrice composée majoritairement de glycoprotéines appelées mucines, jouant un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques et écologiques pour l'hôte (Shephard 1994 ; Reverter *et al.* 2018). Ses fonctions sont très diverses et incluent notamment la protection contre le rayonnement solaire (Zamzow 2007), la réduction de résistance à la nage (Zhang *et al.* 2022), l'alimentation des alevins (Chong *et al.* 2006), et la communication entre conspécifiques (Leonard *et al.* 2012).

Ce mucus constitue aussi une barrière physique nécessaire pour limiter l'installation de pathogènes, comme cela a été observé chez les poissons-perroquets *Chlorurus sordidus*, qui, pendant la nuit, sécrètent des cocons muqueux notamment pour se protéger contre les isopodes gnathiidés (Grutter *et al.* 2011). Chez les carpes communes, *Cyprinus carpio*, augmenter la sécrétion de mucus semble être un mécanisme de défense face à un environnement présentant une charge bactérienne élevée (van der Marel *et al.* 2010).

Outre son rôle de barrière physique, le mucus constitue aussi une barrière chimique essentielle dans la défense contre les pathogènes. Cette protection est en grande partie médiée par des molécules de l'immunité innée, qui est la principale voie d'immunité chez les poissons (Arts & Kohler 2009). Ainsi, des molécules telles que des lyzozymes, des

immunoglobulines, des protéines du complément, des lectines, des cytokines, sont retrouvées en nombre dans le mucus des téléostéens (Salinas 2015 ; Brinchmann 2016 ; Dash *et al.* 2018 ; Reverter *et al.* 2018 ; Díaz-Puertas *et al.* 2023). Cette immunité est également soutenue par de nombreuses molécules bioactives ayant des activités antibactériennes, antifongiques et antiparasitaires (Hellio *et al.* 2002 ; Colorni *et al.* 2008 ; Fuochi *et al.* 2017 ; Wang *et al.* 2019 ; Kumari & Yadav 2020 ; Hussain & Ghosh Sachan 2023). Par exemple, une étude récente a démontré le rôle bactéricide du mucus cutané de deux espèces de poissons-chats asiatiques contre des bactéries gram-positives et gram-négatives pathogènes (Bhatnagar *et al.* 2023). Le mucus des téléostéens constitue également un environnement propice au recrutement et au maintien d'une grande diversité de microorganismes en agissant comme un milieu de culture plus riche que la colonne d'eau, généralement appauvrie en nutriments et matières organiques (Chiarello *et al.* 2018).

2. Le microbiote du mucus

- **Fonctions du microbiote**

Les téléostéens évoluent en permanence dans des environnements riches en microorganismes (Ducklow & Kirchman 2000 ; Díaz-Puertas *et al.* 2023), et leur microbiote, en particulier externe, ne semble pas être un simple reflet des communautés microbiennes planctoniques, mais résulter d'un assemblage complexe avec des microorganismes pas forcément détectables dans l'eau environnante (Larsen *et al.* 2013 ; Chiarello *et al.* 2018). Bien que ces microorganismes soient moins bien décrits que ceux présents sur d'autres vertébrés, notamment terrestres (Ley *et al.* 2008 ; Barko *et al.* 2018), plusieurs études ont démontré l'importance de ce microbiote et en particulier du compartiment bactérien (qui est le plus abondant dans le mucus des poissons) dans de nombreux processus physiologiques pour les poissons (Gomez *et al.* 2013 ; Llewellyn *et al.* 2014). Ces communautés peuvent par exemple participer à l'excrétion de l'ammoniac ou d'autres déchets azotés produit lors des échanges gazeux en recrutant au niveau des branchies des bactéries fixatrices d'azotes comme cela a été montré chez la sériole (Legrand *et al.* 2018), la carpe commune et le poisson-zèbre *Danio rerio* (Van Kessel *et al.* 2016). Ces communautés peuvent aussi faciliter le développement de l'immunité de l'hôte (Lee & Mazmanian 2010 ; Kelly & Salinas 2017) comme l'a démontré l'étude de Sepahi *et al.* (2016) en identifiant une bactérie (*Flectobacillus major*) dans le mucus externe de la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, capable d'induire la production

d'immunoglobuline T chez l'hôte, pour moduler la croissance d'autres symbiotes. Il a été montré que le microbiote intestinal intervenait dans la digestion des poissons en modulant le métabolisme du cholestérol et en synthétisant des vitamines et des enzymes digestives (Sullam *et al.* 2012). Elles peuvent également participer à un rôle de défense contre les pathogènes en produisant des peptides antimicrobiens (Sanchez *et al.* 2012 ; Stevens *et al.* 2016). Par exemple, des bactéries avec des effets inhibiteurs sur la croissance de champignons pathogènes (Lowrey *et al.* 2015) ou sur la bactérie pathogène *Flavobacterium psychrophilum* (Takeuchi *et al.* 2021) ont été identifiées dans le microbiote cutané de la truite arc-en-ciel.

L'ensemble de ces études mettent en évidence que les microorganismes capables de participer à l'homéostasie et à la défense de l'hôte semblent spécifiquement recrutés au niveau du mucus des téléostéens.

- **Variabilité du microbiote**

Bien qu'ils soient impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques essentielles pour l'hôte, les assemblages microbiens du mucus des téléostéens sont des structures dynamiques, susceptibles d'être influencées par de nombreux facteurs intrinsèques (i.e. liés à l'hôte) ou extrinsèques (i.e. liés à l'environnement biotique et abiotique). Des caractéristiques propres à l'hôte, telles que son âge et son niveau de maturation ont déjà été identifiées comme des facteurs structurants les communautés microbiennes de plusieurs espèces de poissons comme le bar et la daurade d'élevage (Rosado *et al.* 2021). Le régime alimentaire est également connu pour influencer les communautés microbiennes de l'intestin (Sullam *et al.* 2012 ; Escalas *et al.* 2021), et des travaux comme ceux de Chiarello *et al.* (2018) sur 44 espèces de poissons de récifs coralliens suggèrent également son rôle sur les communautés microbiennes du mucus externe. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'impact du régime alimentaire sur le microbiote externe des poissons. La première est que des assemblages microbiens intestinaux spécifiques induits par un régime alimentaire particulier sont transmis indirectement à la peau, notamment via les fèces (Chiarello *et al.* 2018). Une autre hypothèse est de considérer que le microbiote intestinal des poissons est fortement lié à leur immunité (Butt & Volkoff 2019 ; López Nadal *et al.* 2020). Ainsi, un régime alimentaire particulier influencerait des réactions physiologiques chez le poisson, comme l'expression de gènes immunitaires conduisant à la production de métabolites particuliers, qui à leur tour influencerait le recrutement du microbiote externe (Ghehdarijani *et al.* 2016 ;

Reverter *et al.* 2017b). L'assemblage des communautés microbiennes du mucus externe des téléostéens semble également très dépendant du facteur espèce. Plusieurs études ont mis en évidence que des individus appartenant à une même espèce hébergent un microbiote plus proche que deux individus de deux espèces différentes (Pratte *et al.* 2018 ; Sylvain *et al.* 2020 ; Scheifler *et al.* 2022a ; Sadeghi *et al.* 2023). Ces différences peuvent être attribuées aux besoins physiologiques spécifiques de chaque espèce, entraînant une composition chimique particulière du mucus externe, et donc des assemblages microbiens différents. Des concentrations spécifiques en lipides et en métabolites ont d'ailleurs été identifiées chez plusieurs espèces de poissons-clowns et de demoiselles (Heim *et al.* 2023). De même, trois autres espèces de téléostéens couramment utilisées en aquaculture, le maigre (*Argyrosomus regius*), le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) et la daurade royale (*Sparus aurata*), présentent des concentrations différentes en cortisol, lactate et protéines (Fernández-Alacid *et al.* 2018). Ces différences de concentration en métabolites entre les espèces pourraient donc façonner des micro-habitats spécifiques induisant des colonisations microbiennes distinctes.

Les facteurs environnementaux sont également susceptibles d'agir sur la structure des communautés microbiennes retrouvées dans le mucus externe des téléostéens. Par exemple un changement de salinité appliqué au saumon Atlantique (Lokesh & Kiron 2016) ou au molly noir (*Poecilia sphenops* ; (Schmidt *et al.*, 2015)) induit un changement du microbiote de leur mucus cutané. Des changements du microbiote externe ont également été observés lors d'un changement de pH (Sylvain *et al.* 2016) ou de température (Larsen *et al.* 2015).

De toute évidence, la diversité et la composition du microbiote du mucus des téléostéens est sous l'influence d'une multitude de facteurs liés à l'hôte et à l'environnement dans lequel il évolue. Bien que les interactions de l'holobionte téléostéen avec l'environnement abiotique soient de plus en plus étudiées, les interactions des téléostéens avec leur environnement biotique tel que les parasites sont souvent négligées car complexes à évaluer et quantifier particulièrement en milieu sauvage.

3. Les parasites des téléostéens et leur lien avec le mucus de leur(s) hôte(s)

Les téléostéens jouent un rôle central dans les écosystèmes aquatiques, notamment au sein des chaînes alimentaires qui sont souvent longues et complexes (Barber *et al.* 2000). Ils offrent également une grande surface de colonisation ainsi qu'une mobilité qui peut favoriser la dispersion de certains stades de vie des parasites (Barber *et al.* 2000). Ainsi, les téléostéens semblent offrir des conditions idéales pour le maintien et l'évolution des cycles de vie des parasites (Barber *et al.* 2000).

Les conséquences physiologiques de ces associations sur les poissons peuvent varier considérablement, allant de manifestations légères à sérieuses. Dans les populations naturelles, les parasites semblent exploiter de façon prudente leurs hôtes pour obtenir des bénéfices durables (Frank 1996). Ainsi, naturellement, un équilibre semble s'établir entre l'hôte et le parasite avec une exploitation modérée de l'un sur l'autre pour ne pas entraîner la perte des deux (Frank 1996). Des conséquences graves peuvent survenir chez des poissons qui sont les hôtes intermédiaires de certaines larves de parasites, lesquelles peuvent adopter une stratégie d'attente passive (enkystement) ou conduire à une « manipulation » de l'hôte pour faciliter sa prédation par un hôte définitif (Lafferty 2008). Des augmentations de virulence responsables d'énormes pertes économiques (Shinn *et al.* 2015) sont également souvent répertoriées chez les poissons maintenus en aquaculture (Kennedy *et al.* 2016). En effet, les poissons sont souvent maintenus à de fortes densités ce qui, d'une part, augmente la probabilité de contact et facilite la transmission à de nouveaux hôtes potentiels, et, d'autre part, augmente leur niveau de stress de façon chronique avec un impact direct sur le système immunitaire et leur capacité à résister à des infestations (Tort 2011). De plus, la grande concentration de poissons dans un lieu donné favorise un déséquilibre en faveur du parasite, qui peut exploiter son hôte de façon plus virulente que dans la nature car d'autres sont disponibles en nombre (Mennerat *et al.* 2010).

Les poissons sont susceptibles d'être les hôtes d'une grande diversité taxonomique de parasites dont les cycles de vie sont plus ou moins complexes (Poulin & Morand 2004). On peut par exemple retrouver des parasites au cycle de vie indirect, qui dépendent principalement du comportement alimentaire de leurs hôtes intermédiaires ou définitifs. Cela peut se faire de façon passive, comme la transmission d'*Anguillicoloides crassus*, un nématode hématophage des anguilles japonaises qui a été introduit en Europe dans les années 1980

(Koops & Hartmann 1989). L'hôte intermédiaire, un copépode, est mangé par les anguilles et les parasites se développent dans la vessie natatoire de ces dernières, affectant leur nage, leur migration, leur reproduction, et entraînant des taux élevés de mortalité au sein des populations sauvages et d'élevages (Székely *et al.* 2021). D'autres parasites peuvent modifier le comportement de leur hôte intermédiaire pour favoriser les mécanismes de prédation, comme observé chez *Cainocreadium labracis*, un digène (Plathelminthes) qui, au stade cercaire, va se fixer sur les yeux ou les nageoires de leur deuxième hôte intermédiaire, un téléostéen benthique (e.g., le gobie), les rendant plus vulnérables aux attaques de prédateurs comme *Dicentrarchus labrax*, un des hôtes définitifs du parasite (Maillard 1971).

Il est à noter que les parasites et les stades de vie qui ne reposent pas sur des mécanismes passifs ou de prédation pour leur transmission, mais qui impliquent une recherche active de leur hôte semblent particulièrement réceptifs par la présence du mucus de leur hôte. Par exemple, le copépode *Lernaeocera branchialis* possède un cycle de vie qui nécessite deux hôtes, un hôte intermédiaire comme par exemple un poisson de l'ordre des pleuronectiformes (e.g., limande, sole) sur lequel le développement des larves et l'accouplement des adultes ont lieu, et un deuxième poisson de la famille des Gadidae (e.g., morue, merlan, merlu, lieu jaune) sur lequel la femelle adulte se nourrit et se reproduit (Brooker *et al.* 2013). Une étude a montré que les stades adultes femelles montraient une aversion pour des extraits du mucus de limande (hôte intermédiaire), mais étaient au contraire réceptifs à des extraits provenant du mucus de merlan (hôte définitif) en augmentant leur vitesse de nage et en effectuant des trajectoires plus longues et plus complexes (Brooker *et al.* 2013). Le même type de comportement a été observé en présence d'eau ayant contenu des saumons d'Atlantique chez les copépodes *Lepeophtheirus salmonis* (Fraile *et al.* 1993 ; Devine *et al.* 2000). De la même manière le mucus et la peau de plusieurs poissons hôtes intermédiaires, semblent stimuler la reconnaissance et la pénétration de la peau par les stades cercaires du digène *Diplostomum spathaceum* (Haas *et al.* 2002).

Alors que le mucus semble attirer plusieurs espèces de parasites, il a également montré comme ayant un rôle protecteur contre certaines d'entre eux. Une étude sur le stade de vie libre de deux ectoparasites ciliés, *Cryptocaryon irritans*, responsables de la maladie des points blancs, chez les poissons marins (Vaughan & Hutson 2021), et *Ichthyophthirius multifiliis* chez les poissons d'eau douce (Buchmann & Jørgensen 2021), a montré un effet létal d'un

polypeptide antimicrobien identifié dans les branchies des bars rayés sur ces deux ectoparasites (Colorni *et al.* 2008). Des mécanismes de protection contre les parasites sont également soupçonnés d'être présents dans le mucus externe des poissons nettoyeurs *Labroides dimidiatus*. En effet, alors qu'ils évoluent en permanence au contact d'ectoparasites crustacés ou monogènes de leurs poissons « clients », aucun n'a jamais été répertorié comme parasités par ces derniers (Ab Rahman *et al.* 2012).

De toute évidence, plusieurs espèces de parasites de téléostéens, malgré leur éloignement taxonomique et leur diversité de cycles de vie, semblent être étroitement liés au mucus de leur(s) poisson(s) hôte(s). Ces interactions ont été particulièrement explorées chez les parasites de la classe des monogènes (Plathelminthes), qui s'avèrent être un très bon modèle pour l'étude des déterminants de la spécificité parasitaire.

4. Les monogènes

- **Biologie des monogènes**

Parmi les organismes qui sont susceptibles de parasiter les poissons, les monogènes sont une classe de parasites particulièrement répandue dans tous les milieux aquatiques et retrouvés abondamment sur la peau et les branchies des téléostéens. Ce sont des ectoparasites à cycle de vie direct, morphologiquement et écologiquement très diversifiés (Poulin & Cribb 2002), dont les espèces sont en grande partie déterminées en se basant sur la morphologie de leur organe d'accrochage appelé hapter ou opistohapter (Figure 1). Bien que différents systèmes de classification existent chez les monogènes, basés notamment sur des analyses phylogénétiques (Boeger & Kritsky 1993), ils sont communément divisés en deux groupes selon leur morphologie, leur régime alimentaire et leur type de hapter (Kearn 2004a). Les Monopistocotylea sont caractérisés par un hapter simple comportant des crochets et ils se nourrissent en ingérant de l'épithélium, alors que les Polyopisthocotylea présentent un hapter doté de pinces et regroupent quasiment exclusivement des organismes hématophages (Kearn 2004a ; Reed *et al.* 2012) (Figure 1). A l'exception des *Gyrodactylus*, les monogènes sont ovipares et possèdent des stades de vie libre (œufs et larves) et des stades de vie fixé (post-larves et adultes). Les adultes pondent des œufs qui sont entraînés dans la colonne d'eau et vont s'accrocher de façon passive au substrat environnant. Une fois mature, l'œuf libère une larve ciliée appelée oncomiracidium qui nage et recherche activement son

hôte sur de courtes périodes afin de coloniser sa peau. Une fois fixée, la larve perd sa ciliature et développe son hapter pour migrer (la plupart du temps) vers les branchies du poisson parasité. Les monogènes sont généralement très spécifiques pour leur hôte, c'est-à-dire que le parasite ne va parasiter qu'une ou quelques espèce(s) d'hôte(s) (Sasal *et al.* 1999 ; Rohde 2005).

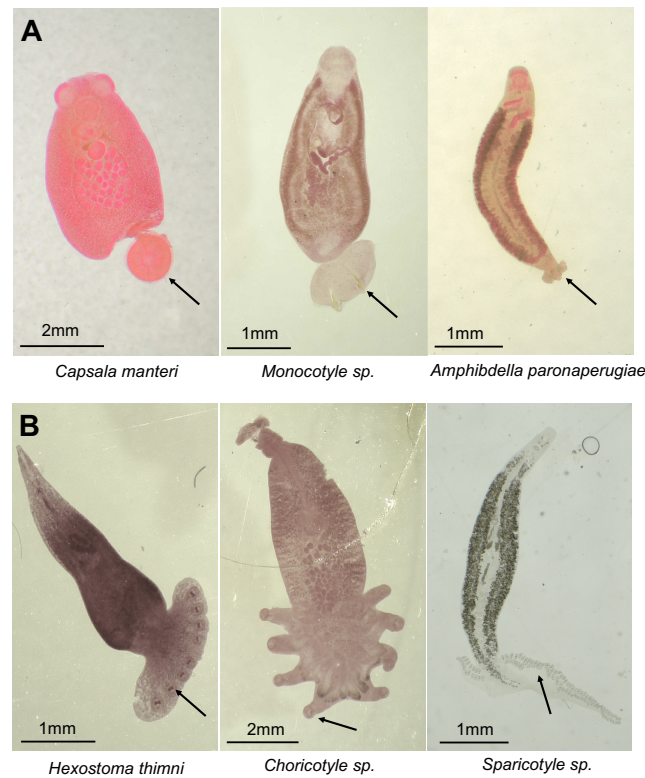


Figure 1. Diversité des monogènes et de leur organe d'accrochage (flèches noires) chez les (A) Monopisthocotylea et chez les (B) Polyopisthocotylea.

- **La spécificité des monogènes**

Cette spécificité restreinte et le temps de vie court des stades larvaires suggèrent que plusieurs mécanismes doivent être mis en jeu pour favoriser le succès de l'infestation des monogènes. Ces mécanismes peuvent être liés au monogène lui-même qui, à travers le comportement et le cycle de vie de son hôte, s'est adapté pour optimiser par exemple son rythme de ponte et/ou la durée du développement embryonnaire en fonction des facteurs environnementaux. Par exemple, Villar-Torres *et al.* (2018) ont observé des effets de la température du milieu sur les stratégies de reproduction d'un monogène retrouvé sur la daurade *Sparus aurata*, *Sparicotyle chrysophrii*. Ces auteurs ont proposé que le développement embryonnaire rapide et la survie plus courte du parasite étaient favorisés

dans les eaux plus chaudes car les daurades juvéniles y sont facilement accessibles, regroupées dans les eaux peu profondes. En revanche, un développement plus lent et une survie prolongée se produisent dans les eaux plus froides où les daurades adultes sont dispersées dans des zones plus profondes et donc a priori moins accessible.

Il est également admis que les rythmes d'éclosion des monogènes sont liés au comportement de l'hôte (Whittington & Kearn 2011). Par exemple, la photopériode influencerait l'émergence des larves avec une occurrence élevée pendant les périodes où les hôtes sont moins actifs. Ainsi les larves de *Entobdella solea*, spécifiques de *Solea solea*, un hôte actif la nuit, ont tendance à émerger quelques temps après avoir été mis à la lumière, mimant le moment où l'hôte se repose dans le sable (Kearn 1973). Au contraire, les larves *Entobdella hippoglossi*, spécifiques du flétan de l'Atlantique *Hippoglossus hippoglossus*, émergent peu de temps après une mise à l'obscurité correspondant au moment où l'hôte, qui chasse et se nourrit le jour, se repose (Kearn 1974). De la même manière, les éclosions des larves de *S. chrysophrii* se produisent davantage lors des périodes d'obscurité, lorsque la daurade royale est moins active, ce qui la rend plus facile à atteindre (Repullés-Albelda *et al.* 2013 ; Villar-Torres *et al.* 2018).

Les stratégies d'éclosion décrites ci-dessus semblent donc avoir évolué de façon à maximiser les possibilités de cooccurrence, dans l'espace et dans le temps, des oncomiracidia avec un hôte potentiel, et participeraient ainsi à une forme de spécificité. Une fois écloses, les larves semblent également répondre à de nombreux stimuli environnementaux afin d'augmenter leurs chances d'infestation. Par exemple, de nombreuses larves de monogènes montrent un phototactisme positif après leur éclosion, ce qui a été proposé par certains auteurs comme un moyen de dispersion ou une façon d'atteindre plus facilement des hôtes lorsque ces derniers sont pélagiques (Shirakashi *et al.* 2021). Des larves de monogènes peuvent présenter des comportements de nage adaptés au comportement de l'hôte, en répondant à des signaux géotactiques comme montré chez *Entobdella hippoglossi* (Yoon 1998) et *Sparicotyle chrisophrii* (Villar-Torres *et al.* 2018), rhéotactiques (Whittington 1987 ; Hodova *et al.* 2010) ou à des températures particulières (Villar-Torres *et al.* 2023).

- **Le mucus externe et le microbiote associé : quels rôles dans la relation hôte-monogènes ?**

Un des facteurs qui semble expliquer la spécificité des monogènes repose sur la présence du mucus à la surface de l'hôte. En effet, chez certaines espèces de monogènes comme *Acanthocotyle lobianchy* (MacDonald 1974) ou *Discocotyle sagittata* (Gannicott & Tinsley 1997), le mucus stimule l'éclosion des larves. Ce mucus semble également impliqué dans l'attraction des larves pour leurs hôtes et, à la fin des années 60, Kearns a montré que les larves du monogène *Entobdella solea* étaient attirées par le mucus de leur hôte spécifique *Solea solea* mais pas par l'épithélium cornéen (qui est dépourvu de cellules muqueuses), ce qui suggère que le facteur d'attraction est bien associé aux cellules muqueuses (Kearns 1967). Buchmann et Bresciani (1997) ont également montré que *Gyrodactylus derjavini* sélectionnait spécifiquement les nageoires riches en cellules muqueuses lors de l'invasion initiale de la truite arc-en-ciel, soulignant l'importance du mucus dans la relation hôte-monogène. Les larves d'*Heterobothrium okamotoi* sont attirées par des blocs d'agar tamponnés à des pH proches du pH du mucus de leur hôte spécifique *Takifugu rubripes* plutôt que par des pH plus élevés correspondant à ceux retrouvés à la surface d'hôtes non spécifiques (*Seriola dumerili* et *Pagrus major*) (Hirazawa *et al.* 2003).

Bien que les larves de monogènes semblent présenter un comportement complexe en réponse à de nombreux stimuli, les structures morphologiques associées à ces mécanismes sont peu étudiées. Si certaines structures présentes chez les larves sont soupçonnées d'avoir un rôle de récepteur sensoriel (Whittington 1987 ; Buchmann 2002 ; Hodova *et al.* 2010) aucune étude ne les a clairement identifiées. Pourtant une meilleure connaissance de la morphologie des larves et notamment de leurs organes sensoriels pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour comprendre certains déterminants de la spécificité des monogènes pour leurs hôtes.

Plusieurs études ont essayé de caractériser la nature des molécules présentes dans le mucus des poissons pouvant expliquer la spécificité des monogènes. Ainsi, au début des années 2000, deux études ont décrit que l'attachement des larves de *Neonebedenia girellae* (Yoshinaga *et al.* 2000) et *Benedenia seriola* (Yoshinaga 2002) était provoqué par des glycoprotéines présentes dans le mucus de leurs hôtes. La nature de l'une de ces glycoprotéines a depuis été identifiée dans le mucus cutané de plusieurs hôtes de *N. girellae* (Ohashi *et al.* 2007). Une

étude sur les larves d'*Heterobotrium okamotoi* a montré que cette espèce de monogène semble exploiter le système de défense de son hôte *Takifugu rupribes* en se liant spécifiquement aux anticorps IgM de ce dernier via notamment des motifs D-mannose qui seraient présents à la surface des larves, provoquant leur déciliation (Igarashi *et al.* 2017). Cependant, la capacité de liaison au D-Mannose ne semble pas être le seul élément responsable de la déciliation des larves *H. okamotoi* car des IgM spécifiques du mannose provenant d'autres espèces non-hôtes ne déclenchent pas ce processus de déciliation (Matsui *et al.* 2020). Ainsi, le domaine Fc de l'IgM semble également important pour la reconnaissance de l'hôte par les oncomiracidia (Matsui *et al.* 2020). La nature des molécules contenues dans le mucus externe apparaît donc de première importance en induisant l'attraction et la reconnaissance des larves de monogènes pour leur hôte.

Une étude récente suggère qu'une partie des molécules impliquées dans la spécificité des monogènes pour leur hôte seraient produites par les microorganismes présents dans le mucus de ce dernier (Reverter *et al.* 2020). Cette étude s'est intéressée à une famille de poissons-papillons au sein de laquelle une espèce n'est jamais parasitée par des monogènes de la famille des Dactylogyridea (Reverter *et al.* 2020). Les résultats de cette étude suggèrent que cette protection pourrait être médiée par la présence au sein des branchies d'importantes concentrations de bactéries Fusobacteria. Ces bactéries pourraient augmenter la production de mucus via la production de butyrate, ce qui entraînerait une plus faible concentration d'oxygène dans les micro-habitats, et conduirait à des niveaux plus élevés d'hémoglobine. Ces hémoglobines seraient ensuite clivées par des protéases microbiennes en sous-unités jouant un potentiel rôle protecteur contre les Dactylogyridea.

En outre, les stimuli chimiques responsables de l'attraction et de la reconnaissance du parasite pour son hôte ne semblent pas être les seuls responsables de l'établissement et du maintien des monogènes sur un hôte particulier. En effet, des études montrent que certaines larves de monogènes connues comme spécifiques pour un hôte sont capables de parasiter d'autres espèces de poissons mais de manière transitoire seulement (Whittington *et al.* 2000 ; Igarashi *et al.* 2017 ; Matsui *et al.* 2020). Le Brun *et al.* (1988) ont montré que des oncomiracidia de *Diplozoon paradoxum* étaient capables de s'attacher aux filaments branchiaux de différentes espèces de poissons, alors que ce parasite est connu pour être spécifique de la brème commune (*Abramis brama*). Cependant, le développement et la maturation des oncomiracidia n'ont été observés que sur *A. brama* alors que leur nombre diminuait

rapidement chez les autres espèces de poissons, jusqu'à leur disparition complète en quelques jours (Le Brun *et al.* 1988). De même, le monogène *Heterobothrium okamotoi*, connu pour être hautement spécifique de *Takifugu rubripes*, est capable d'infecter la peau et les branchies d'autres espèces de poissons téléostéens, mais disparaît quelques jours plus tard (Ohhashi *et al.* 2007). Récemment, Sato *et al.* (2023) ont identifié que la présence de protéines fucosylées à la surface des branchies d'hôtes non spécifiques comme *T. niphobles* induisaient le détachement de *H. okamotoi*. Des résultats obtenus par notre équipe (Scheifler *et al.* 2022b) à l'aide du metabarcoding du gène ADNr 18S des parasites ont également montré que des espèces de monogènes du genre *Lamellodiscus*, qui ne sont pas retrouvées à l'état adulte dans les branchies de certaines espèces hôtes sparidés, étaient identifiées au niveau de la peau.

Toutes ces observations suggèrent que différents facteurs sont impliqués dans la spécificité des monogènes, et que leur établissement sur l'hôte a de multiples niveaux de régulation, impliquant deux stades cruciaux : lorsque les larves repèrent, atteignent et se fixent sur leur hôte et lorsque les larves se déplacent sur la peau et s'établissent dans les branchies (Figure 2). L'établissement des monogènes et les mécanismes de reconnaissance de l'hôte seraient donc le résultat de plusieurs facteurs concordants et il est possible que les communautés de monogènes soient liées aux assemblages bactériens du mucus externe de deux tissus (i.e., la peau et les branchies) des hôtes.

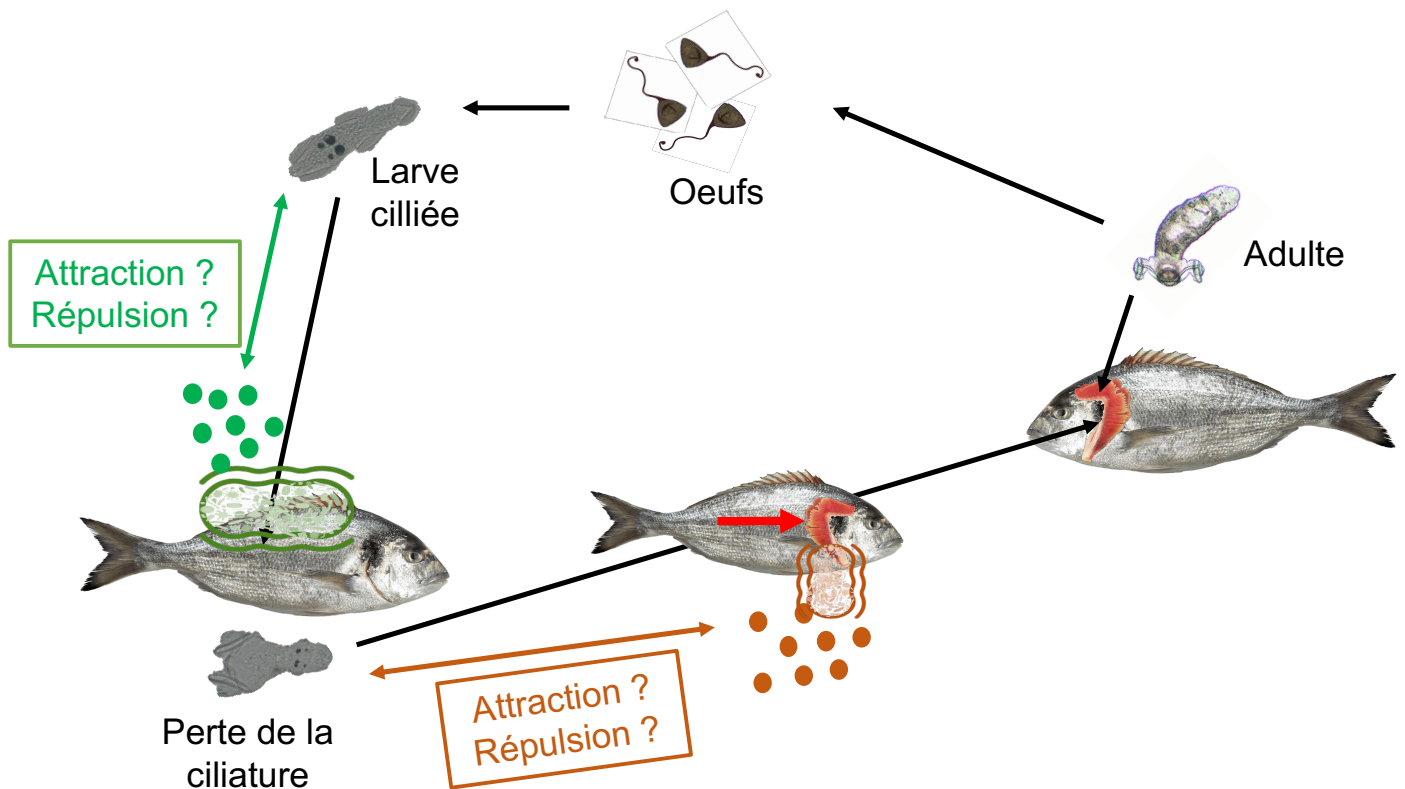


Figure 2. Schéma du cycle de vie des monogènes avec l'implication potentielle du microbiote et des molécules associées du mucus cutané (vert) et branchiale (orange).

C. Cadre conceptuel et méthodologie

1. Les méthodes d'études

L'étude des interactions qui s'établissent entre l'hôte, ses communautés bactériennes et les parasites nécessite des approches disciplinaires variées afin de capturer la complexité de ces interactions. Ainsi, au cours de ces travaux de thèse, plusieurs approches ont été combinées et ont notamment inclus des techniques de séquençage et d'analyse chimique dont les principes sont rapidement présentés ici.

- **Le metabarcoding 16S**

Décrypter les interactions dans lesquelles les microorganismes associés à un hôte sont impliqués était, avant l'avènement des approches dites « omiques », restreinte aux microorganismes cultivables et concernait donc une infime partie (< 2 %) de ces assemblages

(Vartoukian *et al.* 2010). Au milieu des années 2000, l'apparition de nouvelles technologies de séquençage à haut débit (Next Generation Sequencing, NGS) a considérablement amélioré la caractérisation de la diversité de microorganismes dans un environnement donné (Caporaso *et al.* 2011). Le metabarcoding, méthode couramment utilisée pour décrire la diversité des communautés microbiennes (e.g, (Larsen *et al.* 2013 ; Staley *et al.* 2013 ; Chiarello *et al.* 2015 ; Scheifler *et al.* 2019), consiste à analyser les séquences d'un gène marqueur bactérien, le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S, dont la structure est conservée chez les bactéries. L'utilisation d'amorces ciblant des régions hypervariables de ce gène, comme la région V3-V4, permet une discrimination efficace des taxons bactériens (Klindworth *et al.* 2013 ; Thijs *et al.* 2017) et est, à ce titre, couramment utilisée pour décrire les bactéries associées à divers organismes (Moisander *et al.* 2015 ; Fredensborg *et al.* 2020 ; Pei *et al.* 2021 ; Clerissi *et al.* 2023). L'utilisation du séquençage du gène ARNr 16S en écologie microbienne a notamment permis de caractériser et suivre l'évolution du microbiote associé à de nombreux organismes face à des changements biotiques comme une infestation par des parasites (Llewellyn *et al.* 2017 ; Legrand *et al.* 2018 ; Afrin *et al.* 2019 ; Rosado *et al.* 2021 ; Lutz *et al.* 2022). Cependant, cette approche permet d'étudier la structure des communautés microbiennes d'un point de vue taxonomique, mais ne permet pas de saisir entièrement l'implication fonctionnelle de ces communautés, limitant l'interprétation des phénomènes biologiques dans lesquels elles sont impliquées.

- **La métabolomique**

Ainsi, pour obtenir plus d'information sur les interactions fonctionnelles qui existent entre le microbiote et son hôte, ces approches peuvent être complétées par d'autres techniques « omiques » comme la métabolomique, qui est l'étude des petites molécules produites (généralement < 1000 Da) dans un lieu et temps donné. Les métabolites étant les produits finaux des processus de régulation, leurs niveaux peuvent être considérés comme la réponse ultime des systèmes biologiques à des changements et comme des marqueurs de l'état fonctionnel de ces systèmes (Kosmidis *et al.* 2013 ; Reverter *et al.* 2018). La métabolomique non-ciblée est particulièrement pertinente pour évaluer sans a priori des changements globaux d'un système biologique sans nécessairement caractériser les molécules impliquées. La métabolomique basée sur la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS) est un outil analytique puissant permettant la séparation et l'analyse

d'une large gamme de métabolites dans un échantillon biologique, même à de faibles concentrations. Ainsi, l'étude de ces métabolites s'avère particulièrement utile pour comprendre les interactions chimiques qui existent entre un holobionte et son environnement biotique ou abiotique. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem permet ensuite d'élucider la structure de certains composés via l'étude des fragments obtenus, et d'identifier de nouveaux biomarqueurs.

Ces deux approches ouvrent donc de nouvelles perspectives pour comprendre notamment les interactions fonctionnelles entre les communautés bactériennes, leur hôte, et les parasites, et seront utilisées dans des Chapitres I et II. Cependant ces deux méthodes restent relativement descriptives et ne peuvent pas suffire pour décrire la fonction et le rôle des microorganismes associés à un hôte. Ainsi, des approches *in vitro* telles que celles présentées dans le Chapitre III doivent venir les compléter pour décrire au mieux dans quelle mesure le microbiote est impliqué dans les relations de l'hôte avec son environnement biotique et abiotique.

2. Modèle d'étude

Cette étude s'est concentrée sur une association téléostéens-monogènes connue, l'association entre les Sparidés et les ectoparasites du genre *Lamellodiscus*.

La famille des Sparidae (Perciformes) comprend une centaine d'espèces répartis en 38 genres qui fréquentent les eaux tropicales et tempérées. Plusieurs espèces sont connues pour leur commercialisation et leur élevage en aquaculture (sar commun, sar à museau pointu, daurade royale, pagre). Cette famille est bien représentée dans le nord-ouest de la Méditerranée, en particulier dans le Golfe du Lion où 19 espèces sont répertoriées avec une grande diversité d'écologies, tant au niveau de leur régime alimentaire que de leur habitat ou encore de leur comportement social (Figure 3).

La plupart des Sparidae sont parasités par des monogènes du genre *Lamellodiscus* (Monopisthocotylea, Diplectanidae), de petits ectoparasites branchiaux qui se nourrissent en ingérant l'épithélium branchial du poisson. Les espèces de *Lamellodiscus*, qui mesurent entre 200 et 1200 μm , peuvent être identifiées sous microscope optique grâce à leurs pièces copulatrices mâles ainsi qu'aux parties sclérifiées de leur haptéur (Figure 4).

Le profil de spécificité des espèces du genre *Lamellodiscus* a été étudié durant de nombreuses années et peut ainsi être considéré comme bien connu chez les sparidés (Euzet & Oliver 1966, 1967 ; Oliver 1973, 1974 ; San FD 1978 ; Euzet 1984 ; Neifar 1995 ; Desdevises 2001 ; Amine *et al.* 2006, 2007 ; Boudaya *et al.* 2009 ; Diamanka *et al.* 2011) (Tableau 1). Au sein des sparidés de Méditerranée, deux espèces, *Boops boops* et *Dentex dentex*, ne sont jamais parasitées par des *Lamellodiscus spp.* 16 espèces de *Lamellodiscus* sont des spécialistes stricts et parasitent une seule espèce de sparidé. Sur les 28 espèces du golfe du Lion, les 12 autres sont généralistes, capables de coloniser jusqu'à 6 hôtes (Tableau 1).

	Espèces de Sparidae																		Spécificité parasitaire	
	<i>Boops boops</i>	<i>Dentex dentex</i>	<i>Diplodus annularis</i>	<i>Diplodus cervinus</i>	<i>Diplodus puntazzo</i>	<i>Diplodus sargus</i>	<i>Diplodus vulgaris</i>	<i>Lithognathus mormyrus</i>	<i>Oblada melanura</i>	<i>Pagellus acarne</i>	<i>Pagellus bogaraveo</i>	<i>Pagellus erythrinus</i>	<i>Sarpa salpa</i>	<i>Sparus aurata</i>	<i>Pagrus pagrus</i>	<i>Spondyliosoma cantharus</i>	<i>Spicara maena</i>	<i>Spicara flexuosa</i>		<i>Spicara smaris</i>
<i>Lamellodiscus abbreviatus</i>						■														1
<i>Lamellodiscus baeri</i>																■				1
<i>Lamellodiscus bidens</i>					■															1
<i>Lamellodiscus coronatus</i>			■	■		■														3
<i>Lamellodiscus drummondi</i>										■										1
<i>Lamellodiscus diplodi</i>						■	■													2
<i>Lamellodiscus elegans</i>			■						■					■		■				6
<i>Lamellodiscus ergensi</i>			■		■		■													4
<i>Lamellodiscus erythrini</i>												■								1
<i>Lamellodiscus falcus</i>						■	■													2
<i>Lamellodiscus fraternus</i>			■				■													2
<i>Lamellodiscus furcosus</i>						■														2
<i>Lamellodiscus gracilis</i>			■						■											3
<i>Lamellodiscus gussevi</i>						■														1
<i>Lamellodiscus hillei</i>					■															1
<i>Lamellodiscus ignoratus</i>			■		■	■	■						■							6
<i>Lamellodiscus impervius</i>					■															1
<i>Lamellodiscus knoepffleri</i>																■	■	■	■	4
<i>Lamellodiscus mirandus</i>						■														1
<i>Lamellodiscus mormyri</i>							■													1
<i>Lamellodiscus neifari</i>						■	■													2
<i>Lamellodiscus obeliae</i>										■										1
<i>Lamellodiscus oliveri</i>							■													1
<i>Lamellodiscus parisi</i>													■							1
<i>Lamellodiscus tomentosus</i>						■	■													2
<i>Lamellodiscus verberis</i>							■													1
<i>Lamellodiscus virgula</i>										■										1
<i>Furnestinia echeensis</i>														■						1
Richesse spécifique	0	0	7	1	5	13	9	3	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1

Tableau 1. Répartition des espèces du genre *Lamellodiscus* sur les 19 espèces de Sparidés du golfe du Lion. La richesse spécifique et la spécificité parasitaire sont indiquées pour chaque espèce (Euzet & Oliver 1966, 1967 ; Oliver 1973, 1974, 1987 ; San FD 1978 ; Euzet 1984 ; Euzet *et al.* 1993 ; Neifar 1995 ; Desdevises 2001)



Denté, *Dentex dentex*
Carnivore
Solitaire
Benthopélagique



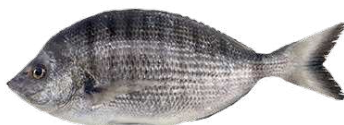
Bogue, *Boops boops*
Omnivore
Grégaire
Démersale, Pelagique



Sparailon, *Diplodus annularis*
Carnivore
Grégaire
Benthopélagique



Sar tambour, *Diplodus cervinus*
Omnivore
Solitaire
Benthopelagique



Sar à museau pointu, *Diplodus puntazzo*
Omnivore
Grégaire
Benthopelagique



Sar commun, *Diplodus sargus*
Carnivore
Grégaire
Démersale



Sar à tête noire, *Diplodus vulgaris*
Carnivore
Grégaire
Benthopélagique



Marbré, *Lithognatus mormyrus*
Carnivore
Grégaire
Démersal



Oblade, *Oblada melanura*
Omnivore
Grégaire
Benthopélagique



Pageot acarne, *Pagellus acarne*
Omnivore
Grégaire
Benthopélagique



Pageot rose, *Pagellus bogaraveo*
Omnivore
Grégaire
Benthopélagique



Pageot commun, *Pagellus erythrinus*
Omnivore
Grégaire
Benthopélagique



Pagre, *Pagrus pagrus*
Carnivore
Solitaire
Benthopélagique



Dorade grise, *Spondyliosoma cantharus*
Omnivore
Grégaire
Benthopélagique



Daurade royale, *Sparus aurata*
Carnivore
Solitaire
Demersale



Saupe, *Sarpa salpa*
Herbivore
Grégaire
Benthopélagique



Mendole, *Spicara maena*
Omnivore
Grégaire
Pélagique



Picarel, *Spicara smaris*
Omnivore
Grégaire
Pélagique



Gerle, *Spicara flexuosa*
Démersale

Figure 3. Espèces de sparidés présentes en Mer Méditerranée et certains de leurs traits écologiques

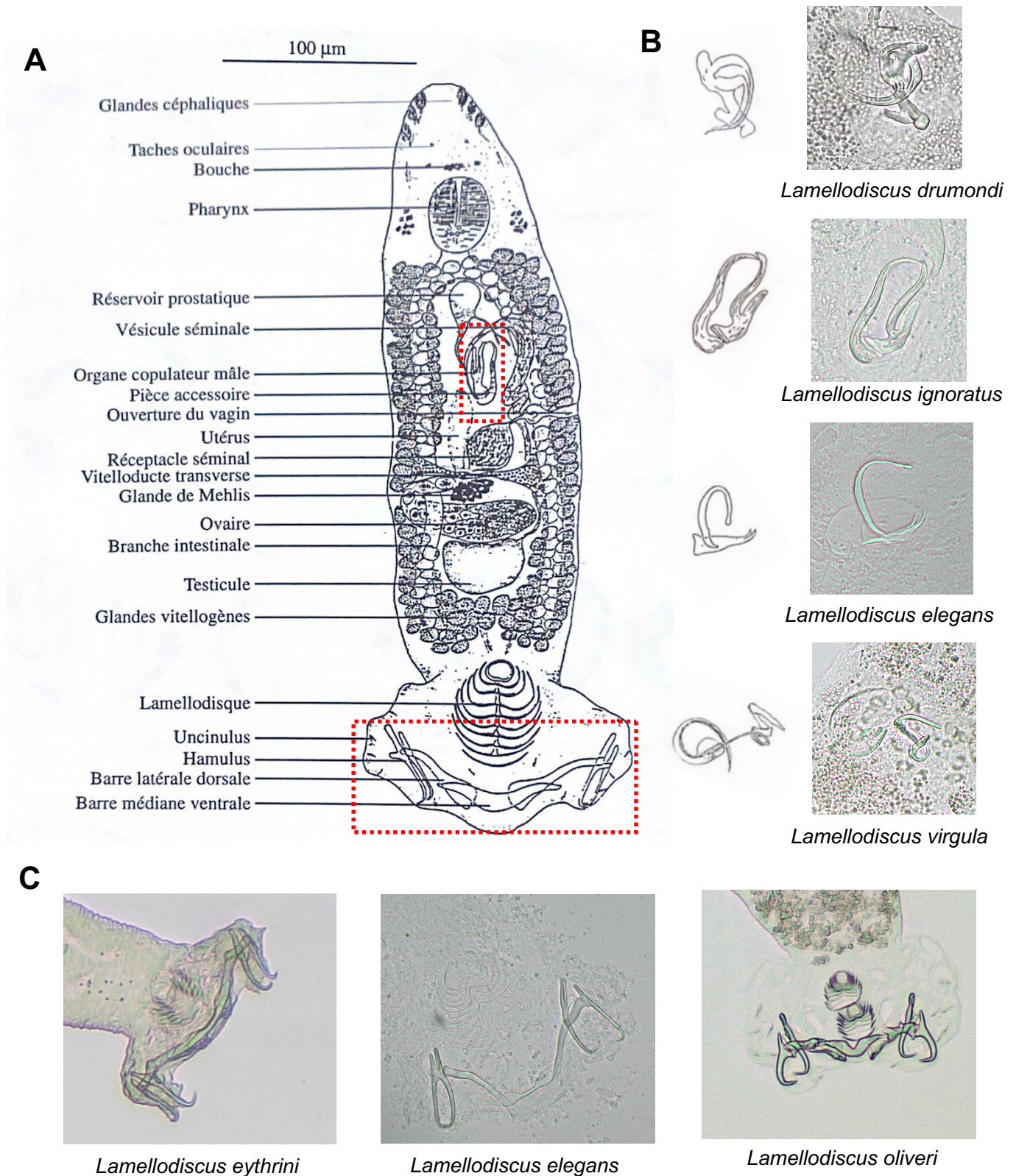


Figure 4. Photographies et schémas de *Lamellodiscus* spp et de leur parties sclérifiées. (a) Schéma d'un *Lamellodiscus ignoratus* dont les pièces sclérifiées sont entourées en rouge. (B) Comparaison de 4 formes de pièces copulatrices mâles. (C) Comparaison de 3 formes de hapteur (schémas adaptés d'Euzet & Oliver 1966 ; Desdevises 2000 ; Amine et al. 2007)

3. Objectifs de la thèse

Cette thèse de doctorat a pour objectif général de comprendre dans quelles mesures le microbiote du mucus externe des téléostéens est impliqué dans les mécanismes de spécificité parasitaire des monogènes pour leurs hôtes. Pour cela trois axes de travail ont été développés.

Le premier axe s'est concentré sur **deux espèces de sparidés sauvages** qui présentaient **des charges parasitaires** en monogènes *Lamellodiscus* contrastées. Nous avons caractérisé l'évolution des communautés bactériennes du mucus externe le long de ce gradient à l'aide de séquençage du gène ARNr 16S. Nous avons étudié les **relations potentielles entre l'abondance de *Lamellodiscus* et l'abondance de certains taxons bactériens** au sein du mucus branchial d'individus appartenant à la même espèce. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Chapitre I sous le format d'un article scientifique qui a été soumis.

Dans le second axe, nous avons comparé la composition du mucus externe de **différentes espèces de sparidés sauvages**. Nous avons notamment caractérisé la **composition en métabolites** à l'aide d'analyses métabolomique non ciblées (LC-HRMS) et la **composition des communautés bactériennes** à l'aide du séquençage du gène marqueur de l'ARNr 16S. Nous avons cherché quels **facteurs biotiques et abiotiques structurent ces compartiments** et nous nous sommes intéressés plus en détail à **une espèce de sparidé** connue pour ne **jamais être parasitée** par les monogènes du genre *Lamellodiscus*. Nous avons identifié les **métabolites et les communautés bactériennes spécifiquement associés au mucus externe** de cette espèce pour comprendre si ces **assemblages peuvent être liés à la non infestation de cette espèce par les *Lamellodiscus***. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Chapitre II sous le format d'un article prêt à être soumis.

Le troisième et dernier axe a été la mise en place d'approches expérimentales pour comprendre *in fine* et *in vitro* les **facteurs associés au mucus qui sont susceptibles de favoriser l'établissement et le maintien des monogènes *Lamellodiscus* sur leurs hôtes sparidés**. Pour comprendre l'existence d'un filtre de spécificité pour certains mucus au stade larvaire des monogènes et pour suivre l'évolution du microbiote en réponse à une infestation artificielle en monogènes, un système de maintien en **aquarium de sparidés sauvages**, un système non invasif de **collecteurs d'œufs** et de **maintien d'œufs pour favoriser leur éclosion** ainsi qu'un **protocole de déparasitage de sparidés** de leurs *Lamellodiscus* ont été mis en place

et sont décrit dans le détail dans le Chapitre III de ce travail. Ce chapitre inclus également une étude **morphologique des stades œuf et larve d'une espèce de *Lamellodiscus* observés au microscope électronique à balayage et optique**, dont le but était de caractériser les récepteurs sensoriels qui peuvent être impliqués dans des mécanismes de reconnaissance de l'hôte. Les résultats de cette étude sont présentés sous le format d'un article scientifique qui est prêt à être soumis.

Chapitre I

Communautés bactériennes du mucus externe de sparidés sauvages, une comparaison intraspécifique chez des d'hôtes à charge parasitaire contrastée

1. Contexte

Comme mentionné précédemment, la relation des téléostéens avec leur environnement biotique reste peu étudiée, particulièrement en milieu sauvage. Par conséquent, l'interaction de leur microbiote avec les ectoparasites monogènes est très peu connue. Les différences de microbiote de l'hôte avant infection pourraient moduler la susceptibilité de l'hôte à une infestation par des ectoparasites, rendant le microbiote de l'hôte central pour prédire les risques d'infections individuels. Au contraire, ces différences pourraient être une conséquence de l'infestation par les ectoparasites, qui modifierait le microbiote associé au mucus de l'hôte.

Dans cette étude, nous avons caractérisé les communautés bactériennes du mucus externe de deux espèces de sparidés sauvages, *Diplodus annularis* (sparaillon) et *Pagellus acarne* (pageot acarné), par séquençage à haut débit (Illumina MiSeq). Bien que prélevés à des lieux et des périodes relativement restreintes, les individus d'une même espèce présentaient au sein de leurs branchies des charges en *Lamellodiscus* très contrastées. Cet échantillonnage a donc permis de caractériser l'évolution du microbiote externe en lien avec ces charges parasitaires afin d'évaluer la potentielle implication du microbiote dans les mécanismes de spécificité des parasites *Lamellodiscus* pour des individus d'une même espèce. Nous avons étudié l'existence de relations entre les charges parasitaires en *Lamellodiscus* et l'abondance de taxons bactériens particuliers au sein des branchies des deux espèces, là où s'établit le parasite adulte. Nous avons également identifié les déterminants exogènes (date et site de collecte) pouvant expliquer la variabilité de ces microbiotes à l'échelle de chaque espèce.

2. Principaux résultats

Dans cette étude, nous avons mis en évidence qu'une augmentation de la charge parasitaire en *Lamellodiscus* était liée à une augmentation de la diversité bactérienne dans le mucus cutané des sparraillons. Chez cette espèce, la date de capture des individus semble influencer la charge en *Lamellodiscus* dans les branchies. Des corrélations entre l'abondance de taxons bactériens et la charge en *Lamellodiscus* ont été trouvées dans le mucus branchial des deux espèces. L'abondance de la famille bactérienne Flavobacteriaceae était fortement corrélée à la charge en *Lamellodiscus* dans le mucus branchial des deux espèces, ainsi que le genre bactérien potentiellement pathogène *Tenacibaculum* dans le mucus branchial des sparraillons. Des corrélations négatives ont été observées entre la charge parasitaire en *Lamellodiscus* et l'abondance en Vibrionaceae dans le mucus branchial des sparraillons, et l'abondance en Fusobacteria dans le mucus branchial des pageots acarné, suggérant une implication potentielle de ces bactéries dans l'atténuation des infestations parasitaires chez les sparidés.

3. Travail réalisé

Cette étude a été réalisée avec l'aide de plusieurs stagiaires pour le comptage et l'identification des parasites et d'une stagiaire pour une partie de la biologie moléculaire (extraction ADN, PCRs). J'ai réalisé tout le reste cette étude, l'échantillonnage, le traitement et les analyses de données de séquençage et la rédaction du manuscrit ci-dessous.

4. Manuscrit

Link between bacterial communities and contrasted loads in ectoparasitic monogeneans from the external mucus of two wild sparid species (Teleostei)

Revault Judith¹, Desdevises Yves¹, Magnanou Élodie¹

¹Sorbonne Université, CNRS ; Biologie Intégrative des organismes marins, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

Submitted to *Animal Microbiome*

Abstract

Background: While teleost fishes represent two thirds of marine vertebrates, the role of their external microbiota in relationship with their environment remains poorly studied, especially in wild populations. Hence, the interaction of their microbiota with ectoparasites is largely unknown. Microbiota can act as a protective barrier against pathogens, and/or be involved in host recognition by parasites. Thus, host-parasite associations should now be considered as a tripartite interplay where the microbiota shapes the host phenotype and its relation to parasites. Monogeneans (Platyhelminthes) are direct life cycle ectoparasites commonly found on teleost skin and gills. The role of bacterial communities within skin and gill mucus which either pre-exist monogeneans infestation or follow it remain unclear. This is investigated in this study using the association between Sparidae (Teleostei) and their specific monogenean ectoparasites of the *Lamellodiscus* genus. We are exploring specificity mechanisms through the characterization of the external mucus microbiota of two wild sparid species using 16s rRNA amplicon sequencing. We investigated how these bacterial communities are related to contrasted *Lamellodiscus* monogeneans parasitic load.

Results: Our results revealed that the increase in *Lamellodiscus* load is linked to an increase in bacterial diversity in the skin mucus of *D. annularis* specimens. The date of capture of *D. annularis* individuals appears to influence the *Lamellodiscus* load. Correlations between the abundance of bacterial taxa and *Lamellodiscus* load were found in gill mucus of both species. Abundance of Flavobacteriaceae family was strongly correlated with the *Lamellodiscus* load in gill mucus of both species, as well as the potentially pathogenic bacterial genus *Tenacibaculum* in *D. annularis* gill mucus. Negative correlations were observed between *Lamellodiscus* load and the abundance in Vibrionaceae in gill mucus of *D. annularis*, and the abundance in Fusobacteria in gill mucus of *P. acarne* specimens, suggesting potential applications of these bacteria in mitigating parasitic infections in fish.

Conclusions: Our findings highlight the dynamic nature of fish microbiota, in particular in relation with monogeneans infestations in two wild sparid species. More generally, this study emphasizes the links between hosts, bacterial communities and parasites, spanning from the dynamics of co-infection to the potential protective role of the host's microbiota

Keywords: External mucus, Microbiota, Sparidae, Monogenean, Lamellodiscus, Metabarcoding, Tripartite interaction

List of abbreviations: ASV: Amplicon Sequence Variant; LP: Lightly Parasitized; HP: Heavily Parasitized; ANOVA: Analysis Of Variance; KW: Kruskal-Wallis; CI: Conover-Iman; PCoA: Principal Coordinates Analysis; LEfSe: Linear discriminant analysis Effect Size; LDA: Linear Discriminant Analysis; PERMANOVA: Permutational Multivariate Analysis Of Variance; BC: Bray-Curtis dissimilarity index; WU: Weighted Unifrac distance.

Declarations

Ethic approval: The Oceanological Observatory of Banyuls-sur-Mer (FR3724) holds the authorization for fishing and housing wild Mediterranean teleosts (Decision n°100/2019, Inter-regional direction of Mediterranean Sea). Wild fish were caught by a competent person and in accordance with the European Union Regulations concerning the protection and welfare of experimental animals (European directive 91/492/CCE).

Consent for publication: Not applicable

Availability of data and material: Sequence data will be available upon publication in the NCBI Sequence Read Archive (SRA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) database under the BioProject PRJNA1050994 (<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA1050994?reviewer=1au0f72tav24kfm8qkk40jktbq>)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Funding: CNRS

Authors' contribution: YD, and EM contributed to the methodology. JR, YD and EM helped in the investigation. JR conducted the formal analysis, data curation, and writing of the original manuscript. YD, EM supervised the study and helped with data interpretation. JR, YD and EM contributed to reviewing and editing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements: We would like to thank Mathilde Scheifler and the Bio2Mar platform (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr>) for the access to the instrumentation and the advices provided to carry out this project, as well as the “Service des Moyens à la Mer (FR3724) de l’Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer” for fish sampling.

Introduction

Any organism is likely to host one or more parasitic species during its lifetime [1]. However, this does not mean that all hosts are equal face to parasitism: variability can be observed in the probability of infection (prevalence) and in the number of parasites within each host (parasitic load). Recently, among the avenues explored to explain these variations in host specificity, an increasing number of studies [2–4] suggest a role of the microbiota in host-parasite interactions. Indeed, several studies have shown that parasitized hosts possess a specific microbiota that differs from non-parasitized hosts, emphasizing the putative involvement of the microbiota in host-parasite interactions [5–9]. However, it remains unclear whether some of these differences in host bacterial communities are a cause or a consequence of parasitic infections.

Certain bacteria have been shown to protect the host against parasitic infections. This is the case, for example, in bumblebees, where several studies have shown a protective effect of the gut microbiota against a trypanosomatid parasite [10, 11]. Conversely, bacteria pre-existing the infection could favor the establishment and survival of parasite by creating favorable conditions. In 2010, Hayes *et al.* (2010) showed that reducing the number of bacteria in the large intestine of mice significantly reduced the number of hatched nematode eggs. Other authors have shown that the microbiota can be involved in the attraction of parasites toward their host via chemical cues. This has for example been shown for mosquitos that are attracted by the skin microbiota of certain human hosts [13]. Another recent study has shown that cane toad skin secretions (i.e., substances produced by amphibians and their microbiota) attract lungworm larvae and enhance their infection success [14]. Interestingly, these authors showed that, depending on the geographical area, these same skin secretions could also reduce the longevity and infection success of the parasite larvae.

Differences in bacterial communities also seems to be the result of parasite infestation. In the case of helminth infestation, it has been shown that parasites induce a change in the composition of the microbiota [15], reducing airway inflammation in mice to prevent their expulsion, and that this mechanism is suppressed in hosts that have received antibiotics [16, 17]. A recent study suggests that infection by a crustacean ectoparasite (*Tracheliastes polycolpus*) induced a shift of the fin microbiota in a freshwater fish (*Leuciscus burdigalensis*), and this shift was restricted to the fin where the parasite anchored [18]. Thus, microbiota has been shown to reflect the infection status of the host [3].

Deciphering the role of the microbiota in parasitic infection can be pertinent in fields such as aquaculture, where parasites are responsible for considerable annual economic losses [19]. This is the case for monogeneans [20], ectoparasites abundant on teleost skin and gills. Teleost skin and gills are covered with a mucus colonized by stable communities of microorganisms that form the external microbiota. Several studies have shown that monogeneans detect their hosts via cues emitted by fish mucus [21–24] such as mucosal macromolecules (IgM) [25] and glycoproteins [26, 27]. Recent work suggests that the molecules involved in the monogeneans' host recognition system are produced by the host microbiota [28]. Among the many roles assumed by the microbiota for its host fish [29–31] its link with pathogens and parasites is not well understood. One of the difficulties is to disentangle causes from consequences, particularly in wild populations where the microbiota is under the influence of numerous biotic and abiotic factors [32–35].

In the Mediterranean Sea, the association between the Sparidae (Perciformes) fish family and their specific monogeneans belonging to *Lamellodiscus* genus is a relevant model to study fish-monogenean association. *Lamellodiscus* monogeneans are ectoparasites with a direct life cycle often abundant on the skin and gills of sparids. The establishment of monogeneans on their host is regulated at multiple levels, involving two critical stages: when the swimming larvae (oncomiracidia) seek out, reach and attach on fish skin, and when the larvae move, attach and establish in the gills. Previous studies have shown that certain highly specific monogenean larvae are able to parasitize fish species not recorded as their host species [24, 36]. Ohhashi and coll. [24] have proposed that these monogenean larvae could only survive for a few days and finally detach from their non-specific host, being unable to mature to the adult stage in the gills.

The aim of this study was to characterize the differences in bacterial communities patterns in the external mucus (skin and gill) of two Mediterranean sparid species (*Diplodus annularis* and *Pagellus acarne*) with contrasting *Lamellodiscus* monogeneans parasitic loads. *Lamellodiscus* abundance and diversity were assessed to investigate their effect on the structure and diversity of bacterial communities in each individual's external microbiota (i.e., the skin and gill mucus). The effect of sampling conditions (i.e., location and date of capture) on these two microbiota was also investigated. We focused our analysis on gill microbiota, where the parasites settle definitively as adults, to look for correlations between the abundance of a given bacterial taxa and *Lamellodiscus* abundance in both sparid species.

Material and Methods

Fish sampling, DNA extraction, 16s RNA sequencing and processing

Details of the protocols for fish sampling, DNA extraction, 16S rRNA sequencing and sequence processing protocols, can be found in [35]. Briefly, fish sampling was conducted in June, July 2021 and March 2022 in the bays of Banyuls-sur-Mer and Argelès-sur-Mer (northwestern Mediterranean Sea, France) (Supplementary table S1.1). All fish were collected from a net with gloves and immediately taken to the laboratory for dissection; skin mucus and gill mucus were collected with sterile spatula and immediately placed in sterile tubes and either frozen at -80°C until DNA extraction. For convenience, we will refer to gills and skin in this study as "tissues". A total of 28 fish individuals were sampled for their skin and gill mucus, all belonging to two sparid species: 12 individuals identified as *Diplodus annularis* and 16 individuals to *Pagellus acarne* (Table 1.1). Two liters of seawater were collected in a sterile container at 4 sampling dates in Banyuls-sur-Mer and filtered through a 0.2 µm nitrocellulose filter which was stored at -80°C prior to DNA extraction.

DNA was extracted by using the Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep Kit (Zymo Research, Orange, California) PCR amplification was carried out in triplicate and performed using primers targeting the hypervariable V3-V4 region of the 16S rRNA gene: 341F (5'CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')[37, 38]. A second PCR was performed to add barcodes to each amplified sample and the Illumina adapters. The concentration of all PCR products was normalized with a 96 well SequalPrep Normalization Plate (Thermofisher, France). Amplicons were sequenced using Illumina 2×300 bp MiSeq sequencing (FASTERIS SA, Switzerland).

The analysis of the raw sequences was done using the QIIME2 software and the standard pipeline of DADA2 [39–41]. Raw reads were demultiplexed, quality checked and trimmed to remove primer regions, paired ends were assembled, chimeric sequences were discarded, and reads were denoised. DADA2 generate a list of Amplicon Sequence Variants (ASVs). Sequences were aligned against the SILVA 138 reference database distributed by the Silva project [42, 43]. The MAFFT program was used to align the sequences and FastTree to build a phylogenetic tree. Based on the classification, ASVs matching "Archaea", "Eukaryota" and "Unassigned" or represented by a single sequence in all samples were removed.

Table 1.1: Total number of fish samples used in this study.

	Gill mucus			Skin mucus			Total
	LP	HP	Total	LP	HP	Total	
<i>Diplodus annularis</i>	6	6	12	6	6	12	24
<i>Pagellus acarne</i>	8	8	16	8	8	16	32
Water	-	-	-	-	-	-	4

Characterization of gill parasites

To characterize *Lamellodiscus* species diversity and abundance, *Lamellodiscus* individuals were recovered from three outermost gill arches for each fish individual and counted under a dissecting microscope. In this study, we will consider the total *Lamellodiscus* load without considering their species affiliation. Based on our previous results [35, 44] we determined that the mean intensity of *Lamellodiscus* in *D. annularis* specimens caught during the same season as ours was 13 *Lamellodiscus* per 3 gill arches. In *P. acarne* specimens caught during same seasons than ours, the mean intensity of *Lamellodiscus* was 21 per 3 gill arches. Consequently, for downstream analyses, individuals of each fish species were grouped into two categories: those with *Lamellodiscus* spp. intensity below the previously reported mean in the three dissected gill arches were classified as 'lightly parasitized' (LP); those with higher *Lamellodiscus* spp. mean intensity were classified as 'heavily parasitized' (HP). For simplicity, we will use the terms 'heavily' or 'lightly' parasitized to refer specifically to the parasite loads in *Lamellodiscus* spp.

Data analyses

The influence of location and date of capture on *Lamellodiscus* abundance in the fish was assessed using a Mann-Whitney-Wilcoxon rank sum test in R, supported by permutation tests for robustness. α -diversity measures were estimated with Faith's phylogenetic and Shannon indexes using the dataset normalized to the total number of sequences per samples and the phyloseq R package [45]. We performed one-way ANOVA (or non-parametric Kruskal-Wallis tests when data were not normally distributed) to compare alpha diversity between tissues (i.e., skin mucus, gill mucus and water) and groups (i.e., collection date, capture location and parasitism). When the ANOVA (or Kruskal-Wallis test) rejected the null hypothesis, we computed pairwise comparisons between group levels using Tukey post hoc tests (or post hoc

Conover-Iman (CI) test) with Benjamini-Hochberg correction to detect significant differences between groups. Correlations between *Lamellodiscus* parasitic load (i.e., total abundance) and gill mucus microbiota diversity (Faith's and Shannon index) were computed and their significance assessed using Pearson's correlation tests. Finally, the number of shared ASVs among gill mucus microbiota of LP and HP individuals from both fish species was calculated and represented using a Venn diagram [46] using a rarefied dataset (rarefaction performed to the minimum library size of *D. annularis* samples, 5691 reads).

Principal Coordinates Analysis (PCoA) using both Bray-Curtis, based on ASVs' abundance, and weighted Unifrac distance, which takes into account both the ASVs' abundance and their phylogenetic relationships, was used to assess the differences between the microbiota of the different fish species. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA (function `adonis`, `vegan` R package) and pairwise comparisons for Bray-Curtis and Weighted Unifrac indices (1000 permutations) were used to evaluate statistically significant differences of PCoA groups between tissues, parasitism (i.e., LP or HP) and environmental variables (i.e., date and place of capture).

To assess how each bacterial taxon contributed to the dissimilarity between HP and LP gill or skin mucus bacterial communities, we performed a Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) [47]. LEfSe provides Linear Discriminant Analysis (LDA) scores for the bacteria taxa contributing the most to the differences between bacterial communities. We calculated relative abundances (i.e., total sum scaling) of bacterial taxa (i.e., phyla, class, order, family and genus) showing a significant contribution to the dissimilarity between HP and LP bacterial communities.

Spearman's rank correlation was used to investigate the putative link between the abundance of *Lamellodiscus* spp. and the composition of gill bacterial communities at family and genus taxonomic level. A correlation between the abundance of a *Lamellodiscus* spp. and the abundance of a bacterial taxa was considered to be significant when $p\text{-value} < 0.05$. Only taxa with abundance $> 5\%$ and present in at least 2 samples were considered.

Results

For this study, 12 individuals belonging to *Diplodus annularis* species were sampled between June and July 2021. Between 0 and 90 *Lamellodiscus* spp. were found in the 3 dissected gill arches depending on the fish individual; 6 were classified as "lightly parasitized" (LP) and the other 6 were classified as "heavily parasitized" (HP). We also collected 16 *Pagellus acarne* individuals between June 2021 and March 2022. We found between 0 and 189 *Lamellodiscus* individuals in the 3 dissected gill arches, 8 fish individuals were classified as LP and the 8 remaining as HP (Supplementary Table S1.1). In total, 511 721 sequences assigned to bacteria binned into 4299 ASVs were retrieved from 56 fish samples and 4 water samples.

General patterns of bacterial composition

For the two fish species, the predominant bacterial phylum in gill and skin microbiota was *Proteobacteria* (67.74±14.48% in relative abundance (i.e., total sum scaling method) in gill of *D. annularis*, 51.93±22.39% for skin of *D. annularis*, 69.05±20.74% for gills of *P. acarne* and 51.07±16.92% for skin of *P. acarne*) (Figure 1.1 and Table 1.2). In *D. annularis*, the second most abundant phylum for gills was *Verrucomicrobiota* (12.23±15.70%) and *Actinobacteria* (12.53±10.23%) for skin (Figure 1.1 and Table 1.2). *Bacteroidota* was the third most abundant phylum for both tissue in this species (9.15±12.26% for gills and 12.14±9.58% for skin) (Figure 1.1 and Table 1.2). In *P. acarne*, *Bacteroidota* was the second most abundant phylum found on the gills (8.30±8.93%) and the skin (16.76±9.39%) and *Firmicutes* the third most abundant in both tissues (6.85±15.02% in gill and 9.28±7.48% in skin) (Figure 1.1 and Table 1.2).

Bacterial diversity of gill mucus and skin mucus

Two alpha diversity metrics were used to measure diversity within communities: the Faith's phylogenetic index (phylogenetic richness) and the Shannon diversity index (taxonomic richness and evenness). When comparing diversity metrics, we found significant differences between the bacterial community of the *P. acarne* skin mucus, gill mucus and the surrounding water with both statistical tests (ANOVA; KW test, $p < 0.05$). This results from a highest bacterial diversity in skin mucus (Supplementary figure S1.1) but for both alpha diversity metrics, there was no significant differences in diversity between water and gill mucus (ANOVA; KW test, $p < 0.05$; CI tests, $p > \alpha/2 = 0.025$, Post hoc Tukey $p < 0.05$) (Supplementary figure S1.1).

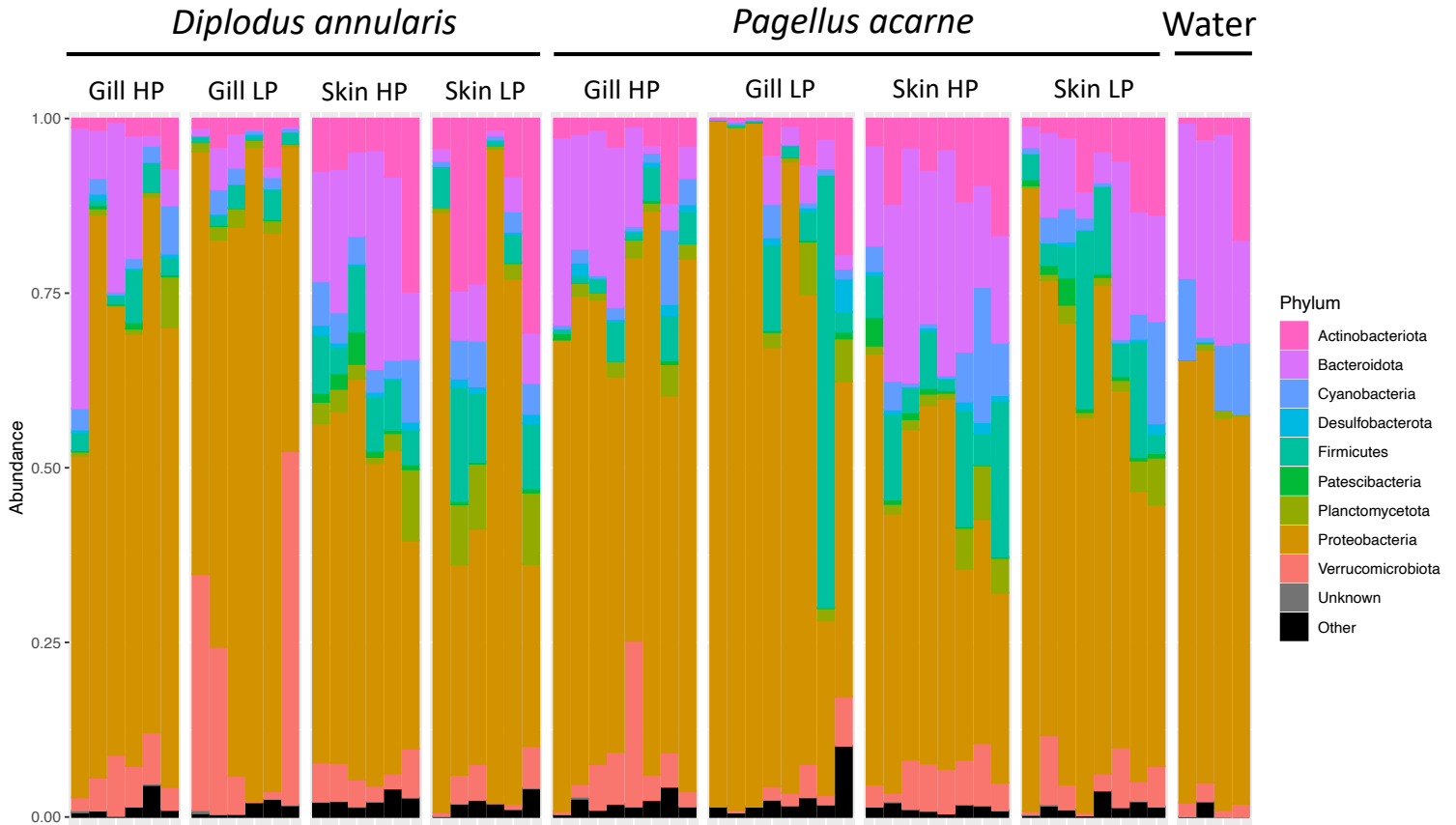


Figure 1.1: Relative abundance of bacterial phyla within lightly parasitized (LP) and heavily parasitized (HP) gill mucus or skin mucus of *Diplodus annularis* and *Pagellus acarne*

Table 1.2: Relative abundance (percentage) of the 7 more represented bacterial phyla in *Diplodus annularis*, *Pagellus acarne* and water microbiota (%)

	<i>Diplodus annularis</i>		<i>Pagellus acarne</i>		Water
	Gill	Skin	Gill	Skin	
Actinobacteriota	2.70	12.53	4.18	7.76	5.80
Bacteroidota	9.15	12.14	8.30	16.76	23.99
Cyanobacteria	2.07	4.17	1.83	4.59	8.04
Firmicutes	2.59	7.30	6.85	9.28	0.057
Planctomycetota	1.61	4.45	2.11	2.70	0.59
Proteobacteria	67.74	51.93	69.05	51.07	59.04
Verrucomicrobiota	12.23	3.56	4.25	4.85	1.82

In *D. annularis*, no significant differences between bacterial communities in skin, gill mucus and water were found regardless the analysis (ANOVA; KW test, $p > 0.05$).

HP and LP *D. annularis* gill and skin mucus bacterial communities were significantly different from each other when considering Faith's index (KW test; ANOVA, $p < 0.05$ respectively), with a higher bacterial diversity in HP individuals (Figure 1.2). For *D. annularis*, collection date significantly influences skin community (ANOVA test, $p < 0.05$) when considering the Faith index. Indeed, fish caught in July 2021 appear to have greater bacterial diversity in their skin mucus than those caught in June 2021 (Figure 1.2). In addition, the date of collection seems to have an influence on the parasitic load in *D. annularis* individuals (Mann-Whitney-Wilcoxon rank sum, $p < 0.01$). Finally, in *P. acarne*, no significant effect of parasitism was found on gill or skin mucus communities' diversity regardless of the index considered (ANOVA; KW test, $p > 0.05$). Collection site seems to have a significant effect on the diversity of gill community (ANOVA, $p < 0.05$) when considering Faith index, with greater bacterial diversity in the mucus of fish caught in Argelès-sur-Mer (Figure 1.2). However, place and date of capture did not significantly influence *Lamellodiscus* abundance (Mann-Whitney-Wilcoxon rank sum, $p = 0.11$, $p = 0.83$ respectively) in *P. acarne* individuals.

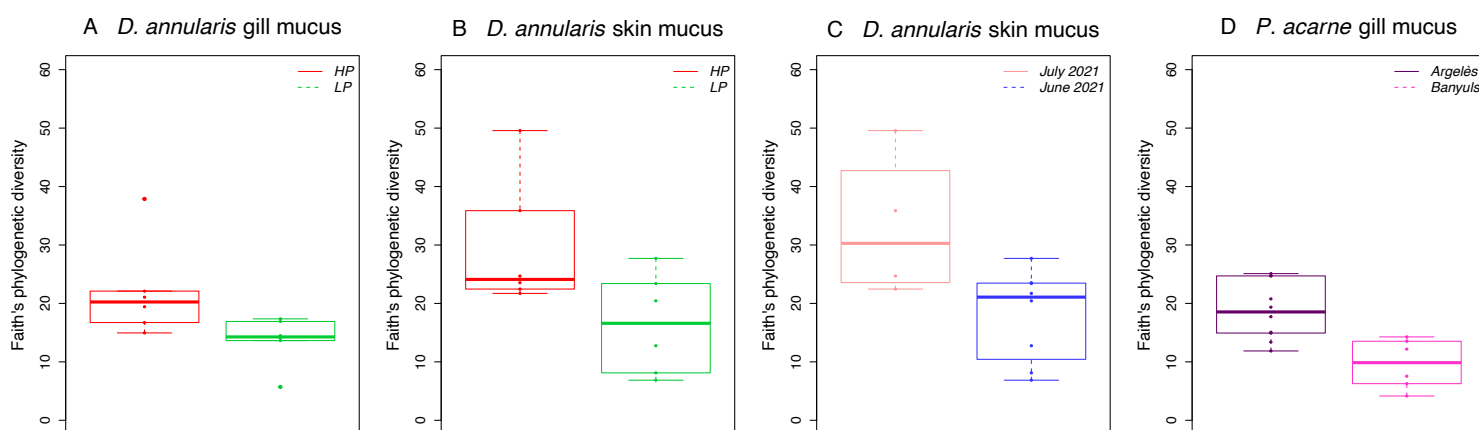


Figure 1.2: Faith's phylogenetic diversity index for lightly parasitized (LP, green) and heavily parasitized (HP, red) in gill and skin mucus (A, B) of *D. annularis*; for date of collection in skin mucus of *D. annularis* (C); for capture location in gill mucus of *P. acarne* (D)

Factors explaining the dissimilarity of bacterial communities

To determine the factors explaining the variability between and within skin mucus, gill mucus and water microbiota, we used two metrics: the Bray-Curtis dissimilarity index (BC), which takes into account the relative abundances of each ASV, and the weighted Unifrac distance (WU), which incorporates both the relative abundances of each ASV and phylogenetic relationships between ASVs. Principal coordinate analysis (PCoA) was used to plot both BC and WU distances.

First, an effect of host species within gill and skin mucus on bacterial communities based on BC dissimilarities can be observed (PERMANOVA on BC distances, $p < 0.01$, $0.07 < R^2 < 0.09$). In both species, dissimilarity of communities was explained by the type of tissue considered (PERMANOVA on BC distances, $p < 0.05$, $R^2 = 0.06$ for *P. acarne* and $R^2 = 0.10$) (Table 1.3).

Despite the relatively close sampling of *Diplodus annularis* individuals over time, a significant effect of collection date on the variability of skin and gill mucus bacterial communities was found based on BC and WU dissimilarities (PERMANOVA, $p < 0.01$, $0.30 < R^2 < 0.74$) (Table 1.3). Significant differences between bacterial communities from LP and HP *D. annularis* gill and skin mucus was found (PERMANOVA on BC and WU distances, $p < 0.05$; for BC distances $R^2 = 0.16$, $R^2 = 0.24$ respectively; for WU distances $R^2 = 0.41$, $R^2 = 0.68$) (Table 1.3, Supplementary figure S1.2).

In *P. acarne*, sampling conditions had a significant effect on variability of bacterial communities in gill and skin mucus when considering BC dissimilarities. If we consider the differences of diversity between July 2021 and March 2022 (as a single one individual was captured in June 2021), sampling date seem to have a stronger effect (PERMANOVA, $p < 0.001$, $R^2 = 0.19$, $R^2 = 0.26$ respectively) compared to the sampling location (PERMANOVA, $p < 0.001$, $R^2 = 0.11$, $R^2 = 0.2$) on gill and skin mucus bacterial communities (Table 1.3). When phylogenetic relationships between ASVs were taken into account (WU dissimilarities), no significant differences were found in the skin microbiota of *P. acarne* fish over time ($p > 0.05$) in contrast to the gills where sampling date seemed to have a weak but significant effect on microbiota ($p < 0.05$, $R^2 = 0.07$).

Moreover, *P. acarne* individuals captured at both sites harbor a closely related gill microbiota (PERMANOVA, WU dissimilarities $p > 0.05$) but a significative effect of the location was found on skin microbiota ($p < 0.05$, $R^2 = 0.37$) (Table 1.3). In *P. acarne*, parasitism (i.e., LP or HP) does not seem to explain

the dissimilarity of gill mucus bacterial communities (PERMANOVA on BC and WU distances, $p > 0.05$). However, a significant difference was observed in skin microbiota only when WU distances are considered (PERMANOVA, $p < 0.05$, $R^2 = 0.41$) (Table 1.3).

		Gill mucus				Skin mucus			
		Bray-curtis		W unfrac		Bray-curtis		W unfrac	
		p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²
Both species	Species	<0.001	0.07	0.75	-	0.003	0.09	0.07	-
<i>Diplodus annularis</i>	Collection date	0.002	0.74	0.005	0.55	0.005	0.30	0.03	0.39
	HP vs LP	0.002	0.16	0.006	0.41	0.008	0.24	0.003	0.68
<i>Pagellus acarne</i>	Collection date	0.001	0.19	0.02	0.07	<0.001	0.26	0.067	-
	Sampling location	<0.001	0.11	0.67	-	<0.001	0.2	0.01	0.37
	HP vs LP	0.218	-	0.537	-	0.270	-	0.008	0.41

Table 1.3: Results of PERMANOVAs on factors explaining the variability in composition of bacterial communities. Significant p - values are highlighted in bold (PERMANOVA, $p < 0.05$)

Gills of HP or LP *D. annularis* and HP or LP *P. acarne* harbor specific bacterial taxa (20.5%, 9.5%, 10.4%, 24.5% of ASVs respectively) (Figure 1.3). These four compartments shared 3.9% of ASVs, mainly composed of *Proteobacteria* (*Alpha* and *Gammaproteobacteria*), followed by *Bacteroidota* as many *Firmicutes* as *Cyanobacteria*. The greatest compositional similarity was observed between LP and HP *D. annularis* (16.7%). It can be noted that LP individuals of both species share 121 ASVs (13.1%), of which 26 are shared solely between them, while HP individuals of both species share 91 ASVs (9.8%), of which 23 are shared solely between them (Figure 1.3).

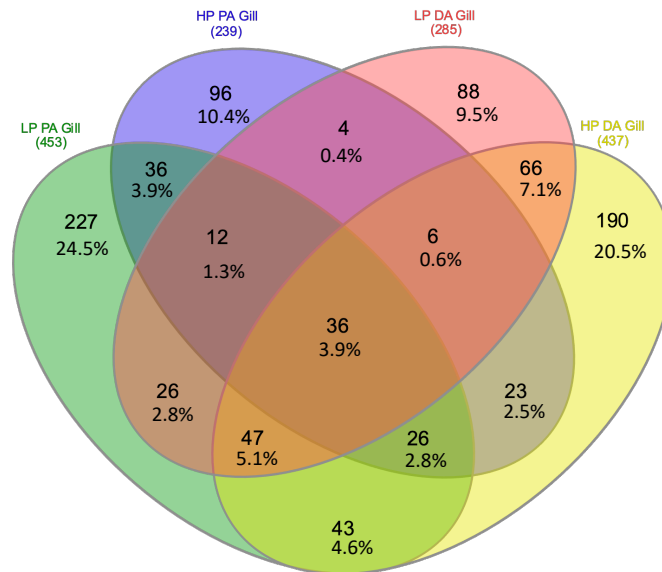


Figure 1.3: Venn diagram representing shared ASVs between lightly parasitized (LP) *Pagellus acarne* gill mucus (green), heavily parasitized (HP) *P. acarne* gill mucus (blue), LP *Diplodus annularis* gill mucus (green) and HP *D. annularis* gill mucus (yellow). PA = *P. acarne*, DA= *D. annularis*. Based on 0.005% abundance cutoff

Correlations between bacterial communities and parasitic load in gills

The microbiota diversity assessed using Faith phylogenetic index in the skin mucus of *D. annularis* was positively correlated with *Lamellodiscus* load (Pearson correlation test, $p < 0.05$, $R = 0.885$) (Supplementary figure S1.3). However, at gill level, no correlation was found between changes in parasite load and microbiota diversity for *D. annularis* or *P. acarne* ($p > 0.05$).

Then, we quantified how the relative abundance of bacterial taxa in gill mucus microbiota was related to parasite abundance. The abundance of all ASVs was aggregated to family or genus rank and then tested using Spearman's rank correlation with the proportion of *Lamellodiscus* sp. found in the gills (parasitic load). The abundances of parasitic load of *Lamellodiscus* spp. displayed significant positive or negative correlations with the relative abundance of given bacterial taxa (Figure 1.4). Significant differences in relative abundances of bacterial ASV among LP and HP fish were found (in both species and both tissues (linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe), Figure 1.5).

Firstly, we observed that HP *D. annularis* gill microbiota was significantly more enriched in *Bacteroidota* (15.99% mean relative abundance (i.e., total sum scaling method) vs average of 2.32% in other LP fish) (LEfSe analysis, Figure 1.5) and this proportion increased with parasite load in gill microbiota of both species (positive Spearman rank correlation, $p = 0.001$, $\rho = 0.844$

for *D. annularis* and $p = 0.0132$, $\rho = 0.604$ for *P. acarne*) (Figure 1.4, Supplementary table S1.2). A medium positive correlation was found between the bacterial order *Flavobacteriales*, the bacterial family *Flavobacteriaceae* and the parasitic load of *Lamellodiscus* sp. in gills of *P. acarne* hosts ($p = 0.021$, $\rho = 0.571$ for both taxonomic rank) and a strong positive correlation in gills of *D. annularis* host ($p = 0.001$, $\rho = 0.826$; $p=0.003$, $\rho=0.779$) (Figure 1.4, Supplementary table S1.2). In addition, this family was found in higher proportion in HP *D. annularis* gill microbiota (14.11% vs 1.28%) and HP *P. acarne* gill microbiota (9.99% vs 2.23%) (LEfSe analysis, Figure 1.5).

The bacterial families *Rhodobactereaceae* and *Puniceicoccaceae* were positively correlated with the abundance of *Lamellodiscus* sp. in the gills of *D. annularis* ($p= 0.001$, $\rho = 0.829$ and $p= 0.002$, $\rho = 0.803$ respectively) as well as one unidentified *Rhodobactereaceae* genus in gill microbiota ($p= 0.003$, $\rho = 0.769$ respectively) of *D. annularis* (Figure 1.4, Supplementary table S1.2).

In both tissue of *D. annularis*, a strong positive correlation was observed between parasitic load and the family *Pseudoalteromonadaceae* and more specifically with the genus *Pseudoalteromonas* ($p = 0.001$, $\rho = 0.802$ for both taxonomic rank in gill and $p= 0.001$, $\rho = 0.811$ for both taxonomic rank in skin) (Figure 1.4, Supplementary table S1.2). Indeed, this bacterial family and genus were totally absent in gill microbiota of LP individuals (3.72% vs 0% for both taxonomic rank) (LEfSe analysis, Figure 1.5).

In contrast, the gill mucus microbiota of LP *D. annularis* contained significantly higher abundances of *Vibrionaceae* (32.9%), whereas this family was much less represented in other HP fish (9.95%) (LEfSe analysis, Figure 1.5). These results were supported by strong negatives correlations between the abundance of *Lamellodiscus* sp. and the bacterial family *Vibrionaceae* or with the genus *Photobacterium* ($p=0.001$, $\rho=-0.890$ and $p= 0.028$, $\rho=-0.631$ respectively) (Figure 1.4, Supplementary table S1.2). Negative correlations were found with the genus *Enterovibrio* in gills ($p=0.016$, $\rho=-0.674$) and skin ($p=0.038$, $\rho=-0.603$) microbiota of *D. annularis* (Figure 1.4, Supplementary table S1.2).

Another negative correlation was found between *Lamellodiscus* abundance and the *Micrococcales* order ($p=0.025$, $\rho =-0.638$) and more specifically with the *Microbacteriaceae* family ($p=0.011$, $\rho =-0.699$) in *D. annularis* gills (Figure 1.4, Supplementary table S1.2). In this family, the abundance of a non-identified genus is correlated with the parasitic load in both tissue of *D. annularis* ($p= 0.007$, $\rho =-0.727$ in gill and $p=0.05$, $\rho= -0.581$ in skin) (Figure 1.4,

Supplementary table S1.2). This genus appears to be significantly more abundant in the gill microbiota of LP fish (LEfSe analysis, Figure 1.5). The abundance of the genus *Blastopirellula* also decreased with parasitic load in *D. annularis* gill microbiota ($p=0.035$, $\rho = -0.609$) (Figure 1.4, Supplementary table S1.2).

In *P. acarne* individuals with low parasite load, gill microbiota appeared enriched with *Fusobacteria* (0.69% vs 0.05%), *Fusobacteriaceae* family (0.69% vs 0.05%) and *Propionigenium* genus, which is absent in HP gill microbiota (0.32% vs 0%) (LEfSe analysis, Figure 1.5). A negative correlation was in particular observed for the family *Fusobacteriaceae* (Spearman' rank order correlation, $p=0.048$, $\rho=-0.501$) in *P. acarne* gill microbiota (LEfSe analysis, Figure 1.5) (Figure 1.4, Supplementary table S1.2). A medium correlation between the parasitic load and the abundance of the family *Saprospiraceae* was found in the gills of *P. acarne* ($p=0.03$, $\rho=0.54$ and $p=0.002$, $\rho=0.716$ respectively) (Figure 1.4, Supplementary table S1.2).

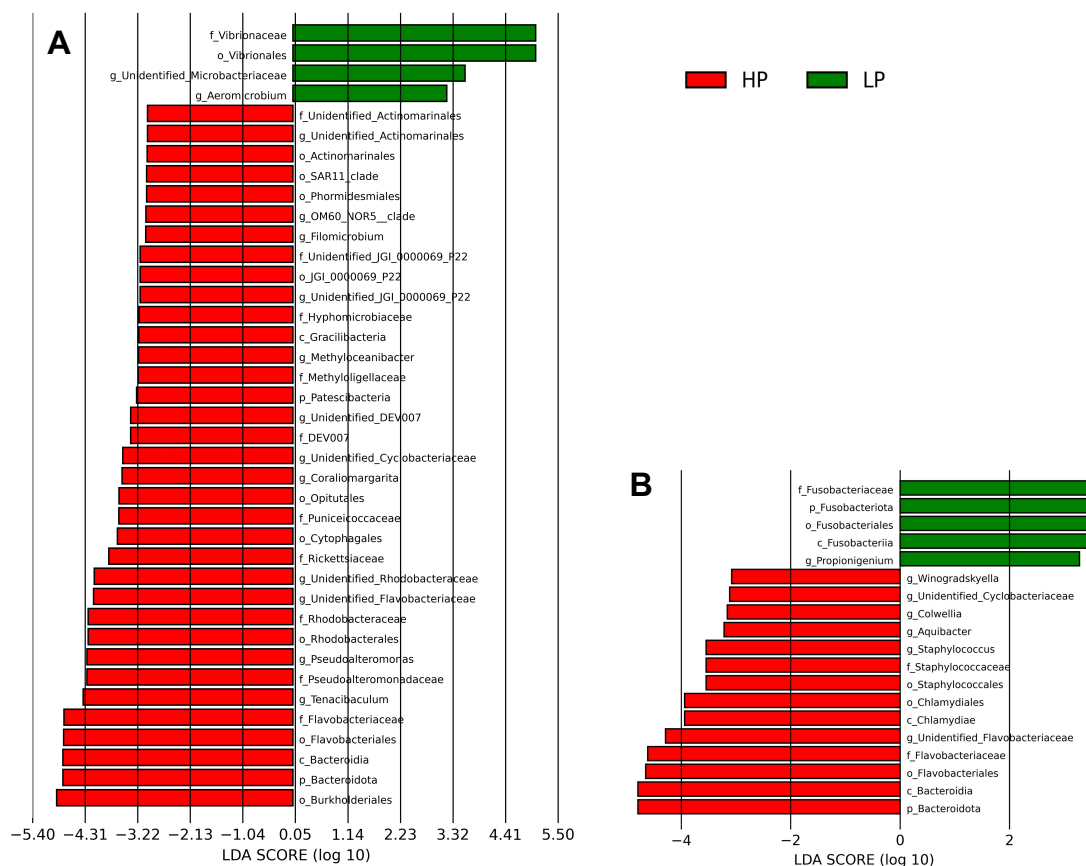


Figure 1.5: Most contributing taxa to differences between HP gill (red) and LP gill (green) bacterial communities. **A** *Diplodus annularis*. **B** *Pagellus acarne*. LDA scores were calculated using Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe), only bacterial taxa that raised an LDA score > 3 are shown

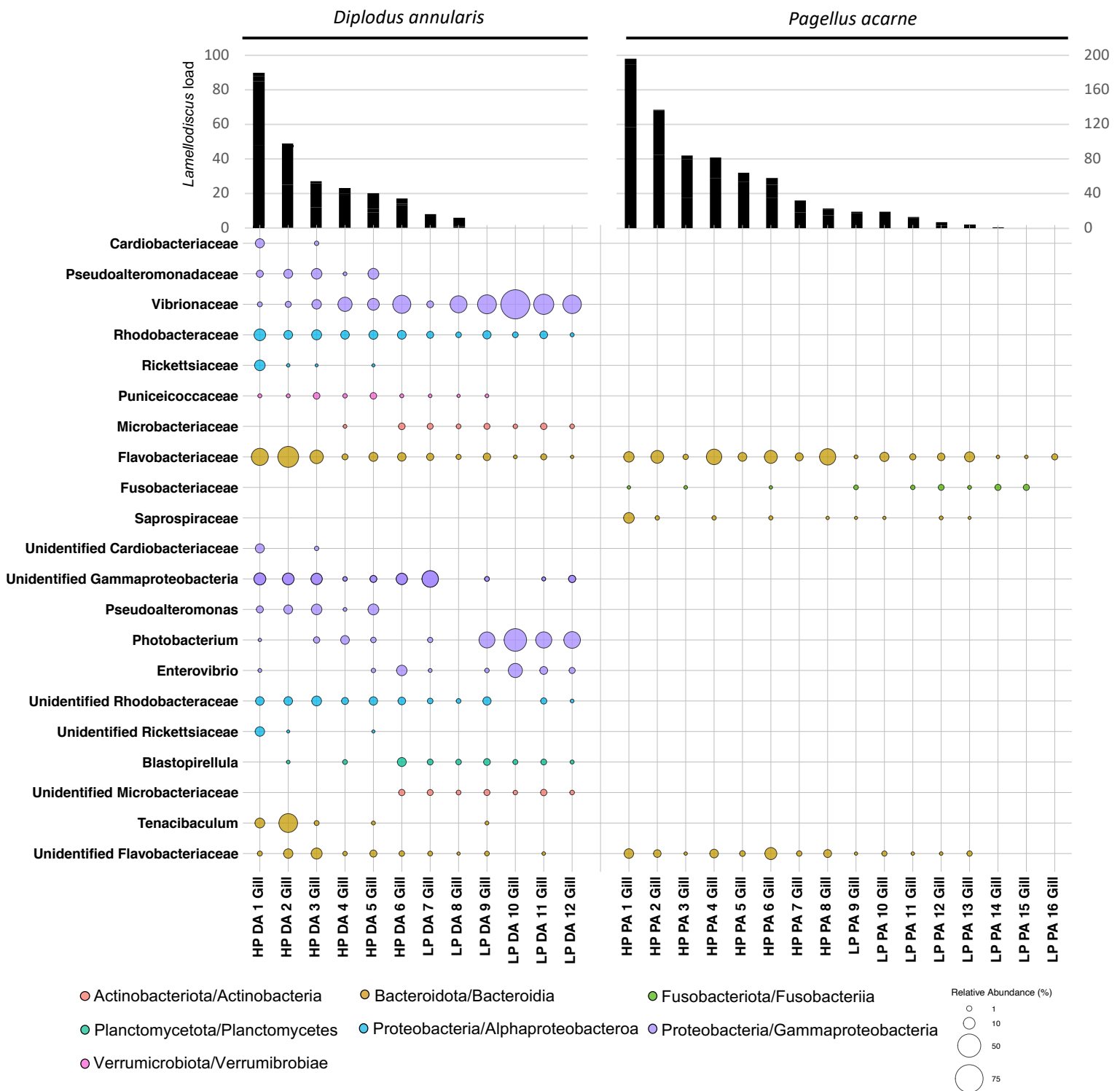


Figure 1.4: Significant correlations (Spearman rank correlation) between each taxonomic rank and parasitic load in gills. DA, *Diplodus annularis*; PA, *Pagellus acarne*. LP, lightly parasitized; HP, heavily parasitized

Discussion

In this study, we examined the associations between gill and skin mucus bacterial communities of two wild sparid species, *D. annularis* and *P. acarne*, with contrasting parasitic loads of *Lamellodiscus* monogeneans.

Regarding general trends, *Proteobacteria* largely dominates the external microbiota of all individuals, which is consistent with previous studies [33–35]. For both species we detected a significant effect of sampling date and location on the external microbiota, suggesting that the microbiota is variable and dynamic, shaped by environmental conditions. Gill and skin mucus also contain tissue-specific and species-specific assemblages. These results are consistent with previous studies that shown that both environmental [48, 49] and host-associated factors shape fish microbiota [29, 34, 50, 51].

We identified differences in the diversity of the microbiota between LP and HP gills of *D. annularis*, with the HP gill mucus appearing to be richer and more diverse than the LP gill mucus. A positive correlation between parasitic load and microbiota diversity was found for skin mucus. This is not in line with the results of [35] who found that an increase of parasite diversity is linked to a decrease of gill microbiota diversity. Nevertheless, other studies highlighted that an increase in alpha diversity indices follows parasitic infestation. Llewellyn and coll. [52] showed that the experimental infection of Atlantic salmon with salmon lice resulted in an increased diversity of the skin microbiota in infected fish. Zhang and coll. [53] showed that a group of rainbow trout experimentally parasitized by *Ichthyophthirius multifiliis* presented higher values for alpha diversity in skin microbiota than a control group. Overall, these results suggest that the relation between parasites and diversity of the external microbiota greatly varies depending on the host and parasite species.

The effect of the sampling date on parasitic load is not the same depending on the host species considered. In the case of *D. annularis*, sampling date had a significant effect on the parasite load in *Lamellodiscus*, even though the sampling period was limited in time (2 summer months). In the case of *P. acarne*, sampling was carried out over two months in different seasons, but without any effect on the parasite load in *Lamellodiscus*. These results suggest that several factors are involved in the occurrence and abundance of monogeneans in fish, such as environmental factors like salinity [54] or water temperature [55, 56]. However, the effect of water temperature does not seem to be the same for all monogenean species. Some authors have shown that some *Dactylogyrus* species seem to prefer warm temperatures (*D.*

vastator, *D. ctenopharyngodonis*) while others seem to prefer colder temperatures (*D. lamellatus*, *D. extensus*) [57, 58].

Using the analysis of bacterial communities, we identified bacterial families and genera that correlated positively or negatively with the parasite load in *Lamellodiscus*. We found a strong correlation between the abundance of *Flavobacteriaceae* and the parasite load in the gill mucus of both species. Similar results have already been reported: this family of bacteria is often found after a parasitic infection. For example, Zhang and coll. [53] showed that experimental infection with *Ichthyophthirius multifiliis* (ciliate) reduced the abundance of skin commensals and increased the intensity of *Flavobacteriaceae* in rainbow trout skin. Similarly, an *in vivo* study showed that Atlantic salmon infected with sea lice, the ectoparasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*, were susceptible to skin colonization by known pathogenic bacteria genera, belonging in particular to the *Flavobacteriaceae* family [52]. Among these bacterial genera was *Tenacibaculum sp.*, a genus that we found correlated with the parasitic load in the gills of *D. annularis*. Unfortunately, we could not identify the nature of all the bacteria belonging to the *Flavobacteriaceae* family from our dataset as most remain unidentified at the species or even the genus level. As a result, it remains difficult to speculate on the pathogenicity of these bacteria associated with fish with high parasitic loads. However, numerous studies have shown that fish infected with ectoparasites [59, 60] and especially with monogeneans are more susceptible to numerous pathogenic bacteria [61, 62]. It is therefore likely that the increase in *Flavobacteriaceae* abundance with the parasitic load observed in our samples involves potentially pathogenic bacteria belonging in particular to this family. Several hypotheses have been proposed to explain the increased susceptibility of parasitized fish to bacterial infections. Firstly, the artificial abrasion created by the attachment and feeding mode of parasite can induce histopathological changes in host tissues, which are likely to create a gateway for secondary infections [22, 53, 63, 64]. Thus, skin and gill injuries caused by monogeneans would increase the adhesion of pathogenic bacteria. It is also possible that primary infection by a pathogen induces immune stress in the host, reducing its resistance to opportunistic bacterial infections [65]. This could also be the result of the modulation of the immune system by the parasite. Several studies have shown that a variety of strategies can be implemented to circumvent and/or reduce the host immune response, leading to reduced resistance to secondary bacterial infections [66–70]. It has been shown for

the monogenean *Eudiplozoon nipponicum*'s excretory-secretory products (cysteine peptidase inhibitors) lead to a down-regulation of two cytokines produced by macrophages which may prevent inflammation at the invasion site and increased susceptibility to concomitant bacterial infections [71]. Another example of immunomodulation was identified during an infestation of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by the monogenean *Sparicotyle chrysophrii*. The parasite was found to inhibit the humoral immune system, slowing down the assembly process of its host's complement complex [72] and a splenic down-regulation of genes implicated in inflammation or apoptosis [73], which may result in a delayed response to secondary infections. Finally, an experimental study showed that a primary infection of *Carassius auratus* by *Dactylogyrus intermedius* induced the down-regulation of two immune-related factors (TGF beta and C3). The same study also found that parasitized fish exhibited significantly higher loads of *Flavobacterium columnare*, suggesting that parasitic infection can enhance bacterial invasion [64]. Taken together, these studies suggest that the effects of *Lamellodiscus* monogeneans on the epithelium and host immunity can be responsible for the observed changes in bacterial communities and the increase in potentially pathogenic bacterial taxa. However, other bacterial families and genera that were positively correlated with the parasite load in *Lamellodiscus* monogeneans could not be attributed to any known pathogen and their association with parasitism remains difficult to determine. One hypothesis is that these bacteria could attract parasites in particular through their metabolites. For example, an *in vitro* experiment with *Strongyloides* nematodes showed that several isolated bacteria act as key chemosensory cues to guide parasite movement but further studies are needed to characterize the metabolites involved [74].

The origin of the bacteria linked to parasitic infection remains unclear; they could be opportunistic bacteria naturally present in the marine environment or belong to the parasite's microbiota. Parasite could act as a vector for bacteria, carrying them directly to the host. A recent study showed that the microbiota of infected *Leuciscus burdigalensis* fins was highly similar to that of the adult and larval crustacean ectoparasite *Tracheliastes polycolpus* [18]. The authors suggested that the bacteria shared between the infected fin and the crustacean ectoparasite result from a co-infection dynamic between the parasite and its associated microbiota. It has also been shown that the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* can transmit the bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri* to channel catfish [75]. To our knowledge, microbiota associated with monogeneans is not yet known, although the presence of bacteria

on their surfaces has long been observed [76]. Several studies on ectoparasitic copepods have reported the presence of *Flavobacteriaceae* in their microbiota. For example, a study in 2020 showed that the microbiota of the Atlantic salmon ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis* was dominated by the order *Flavobacteriales* [77]. Similar results were found in the microbiota of the copepod *Caligus rogercresseyi*, which is also known to parasitise the Atlantic Salmon [78]. Interestingly, these authors identified several taxa with the ability to secrete bioactive compounds, such as the genus *Pseudoaltermonas*, on the copepod microbiota. In the present study, we found that this bacterial genus was positively correlated with parasite load in the skin and gills of *D. annularis*. These microorganisms are known to secrete bioactive compounds with antialgae and antimicrobial properties [79]. A possible role of this bacterial genus could be to increase their resistance and persistence in the fish host. However, it is difficult to determine their exact role in the infestation process as all the bacterial species present in our samples could not be identified. Whether the change in microbiota between parasitized and non-parasitized hosts is due to opportunistic bacteria in the environment or to the contribution of the parasite's microbiota, it is crucial to understand the dynamics of co-infection between bacterial pathogens and monogeneans. Indeed, these co-infections are often associated with greater damage than that resulting from the isolated presence of just one of either pathogen alone [61, 64, 80, 81].

Interestingly, we found that *Vibrionaceae* were significantly enriched and negatively correlated to the parasitic load in gills of LP *D. annularis* fish and *Fusobacteria* in gills of LP *P. acarne*. Similar result was already reported in 2020, who found higher abundance of *Fusobacteria* and *Vibrionaceae* in gill mucus of unparasitized butterflyfish *Chaetodon lunulatus* compared to other *Chaetodon* species parasitized by *Haliotrema* monogeneans [28]. The authors proposed that *Fusobacteria* increase the mucus production in fish, possibly leading to a thicker layer of mucus on their gills. This thickening could lead to lower oxygen levels, potentially promoting higher hemoglobin levels. Furthermore, a positive correlation was identified between *Fusobacteria* and three hemoglobin-derived peptides, which may act as antimicrobial and antiparasitic agents and could be produced by extracellular protease microbes that specifically cleave hemoglobin. Similarly, it has been shown that the bogue (*Boops boops*), a sparid species never parasitized by *Lamellodiscus* monogeneans, had a higher abundance of *Fusobacteria* and *Vibrionaceae* in their gill mucus microbiota than sparids

parasitized [35]. Similarly, a study of three tropical fish species - *Epinephelus fuscoguttatus*, *Epinephelus sexfasciatus* and *Atule mate-* have reported negative correlations between intestinal endoparasites (such as digeneans, nematode or cestodes) and the abundance of *Vibrio* and *Photobacterium* [82]. We also found a strong negative correlation between the *Photobacterium* genus and the parasitic load in *D. annularis* gill microbiota. Interestingly, particularly high relative abundances of *Photobacterium* spp. were found in the only four individuals without *Lamellodiscus* in their gills.

To date, *Vibrionaceae* have primarily been investigated due to their pathogenic potential to humans and aquatic animals but some members of this family are known to display antibacterial effects via secondary metabolites [83, 84]. Little is known on their effect on eukaryotic organisms such as monogeneans. In a 2014 study, a lethal effect of two *Vibrionaceae* species, *Photobacterium halotolerans* and *Vibrio coralliilyticus*, have been observed on two eukaryotic species (*Artemia* sp. and *Caenorhabditis elegans*) [85]. However, the secondary metabolites or specific mechanisms involved in this toxicity could not be determined. Finally, *Vibrionaceae* have already been described as being able to inhibit the settlement and attachment of cyprids in macroalgae, but the mechanisms involved have not yet been deciphered [86]. These studies suggest that members of the *Vibrionaceae* family are capable of secreting potentially host-protective bioactive compounds. Future studies are needed to test the effect of these bioactive compounds on the host specificity of monogeneans.

References

1. Combes C. The art of being a parasite. University of Chicago Press. 2005.
2. Hahn MA, Dheilly NM. Experimental Models to Study the Role of Microbes in Host-Parasite Interactions. *Front Microbiol.* 2016;7.
3. Speer KA. Microbiomes mediate host–parasite interactions. *Mol Ecol.* 2022;31:1925–7.
4. Stevens EJ, Bates KA, King KC. Host microbiota can facilitate pathogen infection. *PLOS Pathog.* 2021;17:e1009514.
5. Federici E, Rossi R, Fidati L, Paracucchi R, Scargetta S, Montalbani E, et al. Characterization of the Skin Microbiota in Italian Stream Frogs (*Rana italica*) Infected and Uninfected by a Cutaneous Parasitic Disease. *Microbes Environ.* 2015;30:262–9.
6. Afrin T, Murase K, Kounosu A, Hunt VL, Bligh M, Maeda Y, et al. Sequential Changes in the Host Gut Microbiota During Infection With the Intestinal Parasitic Nematode *Strongyloides venezuelensis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:217.
7. Kashinskaya EN, Simonov EP, Andreev KB, Vlasenko PG, Polenogova OV, Kiriukhin BA, et al. Microbial community structure in a host–parasite system: the case of Prussian carp and its parasitic crustaceans. *J Appl Microbiol.* 2021;131:1722–41.
8. Lutz HL, Gilbert JA, Dick CW. Associations between Afrotropical bats, eukaryotic parasites, and microbial symbionts. *Mol Ecol.* 2022;31:1939–50.
9. Rajarajan A, Wolinska J, Walser J-C, Mäder M, Spaak P. Infection by a eukaryotic gut parasite in wild *Daphnia* sp. associates with a distinct bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol.* 2022;98:fiac097.
10. Koch H, Schmid-Hempel P. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:19288–92.
11. Mockler BK, Kwong WK, Moran NA, Koch H. Microbiome Structure Influences Infection by the Parasite *Crithidia bombi* in Bumble Bees. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84:e02335-17.
12. Hayes KS, Bancroft AJ, Goldrick M, Portsmouth C, Roberts IS, Grencis RK. Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris*. *Science.* 2010;328:1391–4.
13. Verhulst NO, Takken W, Dicke M, Schraa G, Smallegange RC. Chemical ecology of interactions between human skin microbiota and mosquitoes: Human skin microbiota and mosquito interactions. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;74:1–9.
14. Mayer M, Schlippe Justicia L, Shine R, Brown GP. Host defense or parasite cue: Skin secretions mediate interactions between amphibians and their parasites. *Ecol Lett.* 2021;24:1955–65.

15. Reynolds LA, Finlay BB, Maizels RM. Cohabitation in the Intestine: Interactions among Helminth Parasites, Bacterial Microbiota, and Host Immunity. *J Immunol*. 2015;195:4059–66.
16. Reynolds LA, Finlay BB. Worming Their Way into the Picture: Microbiota Help Helminths Modulate Host Immunity. *Immunity*. 2015;43:840–2.
17. Zaiss MM, Rapin A, Lebon L, Dubey LK, Mosconi I, Sarter K, et al. The Intestinal Microbiota Contributes to the Ability of Helminths to Modulate Allergic Inflammation. *Immunity*. 2015;43:998–1010.
18. Mathieu-Bégné E, Blanchet S, Rey O, Toulza E, Veyssière C, Manzi S, et al. A longitudinal survey in the wild reveals major shifts in fish host microbiota after parasite infection. *Mol Ecol*. 2023;32:3014–24.
19. Shinn A, Pratoomyot J, Bron J, Paladini G, Brooker E, Brooker A. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. *Glob Aquac Advocate*. 2015;:58–61.
20. Doan HV, Soltani E, Ingelbrecht J, Soltani M. Medicinal Herbs and Plants: Potential Treatment of Monogenean Infections in Fish. *Rev Fish Sci Aquac*. 2020;28:260–82.
21. Kearn GC. Experiments on host-finding and host-specificity in the monogenean skin parasite *Entobdella soleae*. *Parasitology*. 1967;57:585–605.
22. Buchmann K. Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int J Parasitol*. 2002;32:309–19.
23. Yoshinaga T. Attachment-inducing capacities of fish skin epithelial extracts on oncomiracidia of *Benedenia seriolae* (Monogenea: Capsalidae). *Int J Parasitol*. 2002;32:381–4.
24. Ohhashi Y, Yoshinaga T, Ogawa K. Involvement of host recognition by oncomiracidia and post-larval survivability in the host specificity of *Heterobothrium okamotoi* (Monogenea: Diclidophoridae). *Int J Parasitol*. 2007;37:53–60.
25. Igarashi K, Matsunaga R, Hirakawa S, Hosoya S, Suetake H, Kikuchi K, et al. Mucosal IgM Antibody with D -Mannose Affinity in Fugu *Takifugu rubripes* Is Utilized by a Monogenean Parasite *Heterobothrium okamotoi* for Host Recognition. *J Immunol*. 2017;198:4107–14.
26. Buchmann K. Lectins in fish skin: do they play a role in host–monogenean interactions? *J Helminthol*. 2001;75:227–31.
27. Ohashi H, Umeda N, Hirazawa N, Ozaki Y, Miura C, Miura T. Purification and identification of a glycoprotein that induces the attachment of oncomiracidia of *Neobenedenia girellae* (Monogenea, Capsalidae). *Int J Parasitol*. 2007;37:1483–90.
28. Reverter M, Sasal P, Suzuki MT, Raviglione D, Inguibert N, Pare A, et al. Insights into the Natural Defenses of a Coral Reef Fish Against Gill Ectoparasites: Integrated Metabolome and

Microbiome Approach. *Metabolites*. 2020;10:227.

29. Lowrey L, Woodhams DC, Tacchi L, Salinas I. Topographical Mapping of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Microbiome Reveals a Diverse Bacterial Community with Antifungal Properties in the Skin. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81:6915–25.

30. Sepahi A, Cordero H, Goldfine H, Esteban MÁ, Salinas I. Symbiont-derived sphingolipids modulate mucosal homeostasis and B cells in teleost fish. *Sci Rep*. 2016;6:39054.

31. Kelly C, Salinas I. Under Pressure: Interactions between Commensal Microbiota and the Teleost Immune System. *Front Immunol*. 2017;8:559.

32. Archie EA, Theis KR. Animal behaviour meets microbial ecology. *Anim Behav*. 2011;82:425–36.

33. Larsen A, Tao Z, Bullard SA, Arias CR. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013;85:483–94.

34. Ruiz-Rodríguez M, Scheifler M, Sanchez-Brosseau S, Magnanou E, West N, Suzuki M, et al. Host Species and Body Site Explain the Variation in the Microbiota Associated to Wild Sympatric Mediterranean Teleost Fishes. *Microb Ecol*. 2020;80:212–22.

35. Scheifler M, Sanchez-Brosseau S, Magnanou E, Desdevises Y. Diversity and structure of sparids external microbiota (Teleostei) and its link with monogenean ectoparasites. *Anim Microbiome*. 2022;4:27.

36. Scheifler M, Magnanou E, Sanchez-Brosseau S, Desdevises Y. Host specificity of monogenean ectoparasites on fish skin and gills assessed by a metabarcoding approach. *Int J Parasitol*. 2022;52:559–67.

37. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:e1–e1.

38. Sinclair L, Osman OA, Bertilsson S, Eiler A. Microbial Community Composition and Diversity via 16S rRNA Gene Amplicons: Evaluating the Illumina Platform. *PLOS ONE*. 2015;10:e0116955.

39. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7:335–6.

40. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J*. 2017;11:2639–43.

41. Hall M, Beiko RG. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. In: Beiko RG, Hsiao W, Parkinson J, editors. *Microbiome Analysis*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 113–29.

42. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012;41:D590–6.
43. Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, et al. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D643–8.
44. Scheifler M, Magnanou E, Sanchez-Brosseau S, Desdevises Y. Host-microbiota-parasite interactions in two wild sparid fish species, *Diplodus annularis* and *Oblada melanura* (Teleostei, Sparidae) over a year: a pilot study. *BMC Microbiol.* 2023;23:340.
45. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE.* 2013;8:e61217.
46. Heberle H, Meirelles GV, Da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:169.
47. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12:R60.
48. Larsen AM, Bullard SA, Womble M, Arias CR. Community Structure of Skin Microbiome of Gulf Killifish, *Fundulus grandis*, Is Driven by Seasonality and Not Exposure to Oiled Sediments in a Louisiana Salt Marsh. *Microb Ecol.* 2015;70:534–44.
49. Schmidt VT, Smith KF, Melvin DW, Amaral-Zettler LA. Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation. *Mol Ecol.* 2015;24:2537–50.
50. Navarrete P, Magne F, Araneda C, Fuentes P, Barros L, Opazo R, et al. PCR-TTGE Analysis of 16S rRNA from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Gut Microbiota Reveals Host-Specific Communities of Active Bacteria. *PLoS ONE.* 2012;7:e31335.
51. Chiarello M, Villéger S, Bouvier C, Bettarel Y, Bouvier T. High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiol Ecol.* 2015;91:fiv061.
52. Llewellyn MS, Leadbeater S, Garcia C, Sylvain F-E, Custodio M, Ang KP, et al. Parasitism perturbs the mucosal microbiome of Atlantic Salmon. *Sci Rep.* 2017;7:43465.
53. Zhang X, Ding L, Yu Y, Kong W, Yin Y, Huang Z, et al. The Change of Teleost Skin Commensal Microbiota Is Associated With Skin Mucosal Transcriptomic Responses During Parasitic Infection by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Front Immunol.* 2018;9:2972.
54. Paperna I. Parasites, infections et maladies du poisson en Afrique. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture; 1982.
55. Cecchini, Saroglia, Berni, Cognetti-Varriale. Influence of temperature on the life cycle of *Diplectanum aequans* (Monogenea, Diplectanidae), parasitic on sea bass, *Dicentrarchus labrax*

(L.). J Fish Dis. 1998;21 1:73–5.

56. Šimková A, Sasal P, Kadlec D, Gelnar M. Water temperature influencing dactylogyrid species communities in roach, *Rutilus rutilus*, in the Czech Republic. J Helminthol. 2001;75:373–83.

57. Zhang X-P, Shang B-D, Wang G-T, Li W-X, Yang X, Li Z-Y. The effects of temperature on egg laying, egg hatching and larval development of *Dactylogyrus vastator*. Acta Hydrobiol Sin. 2015;39:1177–83.

58. Yang BJ, Zou H, Zhou S, Wu SG, Wang GT, Li WX. Seasonal Dynamics and Spatial Distribution of the *Dactylogyrus* Species on the Gills of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) from a Fish Pond in Wuhan, China. J Parasitol. 2016;102:507–13.

59. Bandilla M, Valtonen E, Suomalainen L, Aphalo P, Hakalahti T. A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. Int J Parasitol. 2006;36:987–91.

60. Evans JJ, Klesius PH, Pasnik DJ, Shoemaker CA. Influence of natural *Trichodina* sp. parasitism on experimental *Streptococcus iniae* or *Streptococcus agalactiae* infection and survival of young channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Aquac Res. 2007;38:664–7.

61. Shoemaker C, Xu D-H, Klesius PH, Evans J. Concurrent infections (parasitism and bacterial disease) in *Tilapia*. Proc 8th Int Symp Tilapia Aquac Cairo Egypt. 2008;:1365–75.

62. Attia MM, Abdelsalam M, Elgendy MY, Sherif AH. *Dactylogyrus extensus* and *Pseudomonas fluorescens* dual infection in farmed common carp (*Cyprinus carpio*). Microb Pathog. 2022;173:105867.

63. Rahman T, Suga K, Kanai K, Sugihara Y. Infection Kinetics of *Tenacibaculum maritimum* on the Abraded Skin of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol. 2015;50:44–52.

64. Zhang C, Li D, Chi C, Ling F, Wang G. *Dactylogyrus intermedius* parasitism enhances *Flavobacterium columnare* invasion and alters immune-related gene expression in *Carassius auratus*. Dis Aquat Organ. 2015;116:11–21.

65. Ilgová J, Salát J, Kašný M. Molecular communication between the monogenea and fish immune system. Fish Shellfish Immunol. 2021;112:179–90.

66. Fast MD, Johnson SC, Eddy TD, Pinto D, Ross NW. *Lepeophtheirus salmonis* secretory/excretory products and their effects on Atlantic salmon immune gene regulation. Parasite Immunol. 2007;29:179–89.

67. Cotton S, Donnelly S, Robinson MW, Dalton JP, Thivierge K. Defense peptides secreted by helminth pathogens: antimicrobial and/or immunomodulator molecules? Front Immunol. 2012;3.

68. Cooper D, Eleftherianos I. Parasitic Nematode Immunomodulatory Strategies: Recent Advances and Perspectives. *Pathogens*. 2016;5:58.
69. Hamilton S, McLean K, Monaghan SJ, McNair C, Inglis NF, McDonald H, et al. Characterisation of proteins in excretory/secretory products collected from salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *Parasit Vectors*. 2018;11:294.
70. Rausch S, Midha A, Kuhring M, Affinass N, Radonic A, Köhl AA, et al. Parasitic Nematodes Exert Antimicrobial Activity and Benefit From Microbiota-Driven Support for Host Immune Regulation. *Front Immunol*. 2018;9:2282.
71. Ilgová J, Kavanová L, Matiašková K, Salát J, Kašný M. Effect of cysteine peptidase inhibitor of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) on cytokine expression of macrophages in vitro. *Mol Biochem Parasitol*. 2020;235:111248.
72. Henry MA, Nikoloudaki C, Tsigenopoulos C, Rigos G. Strong effect of long-term Sparicotyle chrysophrii infection on the cellular and innate immune responses of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Dev Comp Immunol*. 2015;51:185–93.
73. Piazzon MC, Mladineo I, Naya-Català F, Dirks RP, Jong-Raadsen S, Vrbatović A, et al. Acting locally - affecting globally: RNA sequencing of gilthead sea bream with a mild Sparicotyle chrysophrii infection reveals effects on apoptosis, immune and hypoxia related genes. *BMC Genomics*. 2019;20:200.
74. Chavez IN, Brown TM, Assié A, Bryant AS, Samuel BS, Hallem EA. Skin-penetrating nematodes exhibit life-stage-specific interactions with host-associated and environmental bacteria. *BMC Biol*. 2021;19:221.
75. Xu D-H, Shoemaker CA, Klesius PH. Ichthyophthirius multifiliis as a potential vector of Edwardsiella ictaluri in channel catfish. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;329:160–7.
76. Cusack R, Cone DK. A report of bacterial microcolonies on the surface of *Gyrodactylus* (Monogenea). *J Fish Dis*. 1985;8:125–7.
77. Dalvin S, Skaftnesmo KO, Malde K, Glover KA, Leong JS, Koop BF, et al. Microbial communities associated with the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*. *Mar Genomics*. 2020;49:100688.
78. Gonçalves AT, Collipal-Matamal R, Valenzuela-Muñoz V, Nuñez-Acuña G, Valenzuela-Miranda D, Gallardo-Escárate C. Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens. *Sci Rep*. 2020;10:2895.
79. Holmström C, Kjelleberg S. Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol Ecol*. 1999;30:285–93.

80. Xu D, Shoemaker CA, Klesius PH. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J Fish Dis. 2007;30:233–8.
81. Assane IM, Prada-Mejia KD, Gallani SU, Weiser NF, Valladão GMR, Pilarski F. *Enterogyrus* spp. (Monogenea: Ancyrocephalinae) and *Aeromonas jandaei* co-infection associated with high mortality following transport stress in cultured Nile tilapia. Transbound Emerg Dis. 2022;69.
82. Hennersdorf P, Kleinertz S, Theisen S, Abdul-Aziz MA, Mrotzek G, Palm HW, et al. Microbial Diversity and Parasitic Load in Tropical Fish of Different Environmental Conditions. PLOS ONE. 2016;11:e0151594.
83. Castro D, Pujalte MJ, Lopez-Cortes L, Garay E, Borrego JJ. Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities. J Appl Microbiol. 2002;93:438–47.
84. Wietz M, Mansson M, Gotfredsen CH, Larsen TO, Gram L. Antibacterial Compounds from Marine Vibrionaceae Isolated on a Global Expedition. Mar Drugs. 2010;8:2946–60.
85. Neu AK, Månsson M, Gram L, Prol-García MJ. Toxicity of Bioactive and Probiotic Marine Bacteria and Their Secondary Metabolites in *Artemia* sp. and *Caenorhabditis elegans* as Eukaryotic Model Organisms. Appl Environ Microbiol. 2014;80:146–53.
86. Nasrolahi A, Stratil SB, Jacob KJ, Wahl M. A protective coat of microorganisms on macroalgae: inhibitory effects of bacterial biofilms and epibiotic microbial assemblages on barnacle attachment. FEMS Microbiol Ecol. 2012;81:583–95.

Supporting information

Table S1.1. Place of capture, collection date and *Lamellodiscus* load of each fish sampled for this study. HP, Heavily Parasitized; LP, Lightly Parasitized

Figure S1.1. Comparison of alpha diversity values between tissue of *Pagellus acarne* and water. Faith's phylogenetic diversity and Shannon diversity index for skin mucus (grey), gill mucus (brown) and water communities (blue) Significant (a) and non-significant (b) differences between tissue are indicated (for Faith index: post hoc Tukey test significant if p -value < 0.05 . For Shannon index: Post hoc Conover-Iman test significant if $p < \alpha/2 = 0.025$)

Figure S1.2. PCoA plot based on dissimilarities between bacterial communities of *Diplodus annularis* using Bray Curtis (A) and weighted Unifrac (B). Form indicates the type of tissue, gill mucus (circle), skin mucus (triangle) and color refer to lightly parasitized (LP, green) or heavily parasitized (HP, red)

Figure S1.3. Significant correlation between skin microbiota diversity (Faith's phylogenetic index) and *Lamellodiscus* load in *Diplodus annularis* (Pearson correlation test, $p < 0.05$, $R = 0.885$).

Table S1.2. Significant Spearman correlation coefficients between the abundances of *Lamellodiscus* and bacterial phylum, class, order, family and genus in *Diplodus annularis* and *Pagellus acarne* gills mucus

Table S1.1: Place of capture, collection date and *Lamellodiscus* load of each fish sampled for this study. HP, Heavily Parasitized; LP, Lightly Parasitized

Fish	Place of capture	Date	<i>Lamellodiscus</i> load	Parasitism
<i>Diplodus annularis</i> 1	Banyuls-sur-Mer	July 2021	90	HP
<i>Diplodus annularis</i> 2	Banyuls-sur-Mer	July 2021	49	HP
<i>Diplodus annularis</i> 3	Banyuls-sur-Mer	July 2021	26	HP
<i>Diplodus annularis</i> 4	Banyuls-sur-Mer	June 2021	23	HP
<i>Diplodus annularis</i> 5	Banyuls-sur-Mer	July 2021	20	HP
<i>Diplodus annularis</i> 6	Banyuls-sur-Mer	June 2021	17	HP
<i>Diplodus annularis</i> 7	Banyuls-sur-Mer	June 2021	8	LP
<i>Diplodus annularis</i> 8	Banyuls-sur-Mer	June 2021	6	LP
<i>Diplodus annularis</i> 9	Banyuls-sur-Mer	June 2021	0	LP
<i>Diplodus annularis</i> 10	Banyuls-sur-Mer	June 2021	0	LP
<i>Diplodus annularis</i> 11	Banyuls-sur-Mer	June 2021	0	LP
<i>Diplodus annularis</i> 12	Banyuls-sur-Mer	June 2021	0	LP
<i>Pagellus acarne</i> 1	Banyuls-sur-Mer	July 2021	189	HP
<i>Pagellus acarne</i> 2	Argelès-sur-Mer	March 2022	136	HP
<i>Pagellus acarne</i> 3	Argelès-sur-Mer	July 2021	84	HP
<i>Pagellus acarne</i> 4	Argelès-sur-Mer	March 2022	82	HP
<i>Pagellus acarne</i> 5	Argelès-sur-Mer	July 2021	64	HP
<i>Pagellus acarne</i> 6	Argelès-sur-Mer	July 2021	58	HP
<i>Pagellus acarne</i> 7	Argelès-sur-Mer	July 2021	32	HP
<i>Pagellus acarne</i> 8	Argelès-sur-Mer	March 2022	23	HP
<i>Pagellus acarne</i> 9	Argelès-sur-Mer	March 2022	19	LP
<i>Pagellus acarne</i> 10	Banyuls-sur-Mer	July 2021	19	LP
<i>Pagellus acarne</i> 11	Banyuls-sur-Mer	March 2022	12	LP
<i>Pagellus acarne</i> 12	Banyuls-sur-Mer	June 2021	7	LP
<i>Pagellus acarne</i> 13	Argelès-sur-Mer	July 2021	4	LP
<i>Pagellus acarne</i> 14	Banyuls-sur-Mer	July 2021	1	LP
<i>Pagellus acarne</i> 15	Banyuls-sur-Mer	July 2021	0	LP
<i>Pagellus acarne</i> 16	Argelès-sur-Mer	July 2021	0	LP
Water 1	Banyuls-sur-Mer	June 2021	-	-
Water 2	Banyuls-sur-Mer	June 2021	-	-
Water 3	Banyuls-sur-Mer	July 2021	-	-
Water 4	Banyuls-sur-Mer	March 2022	-	-

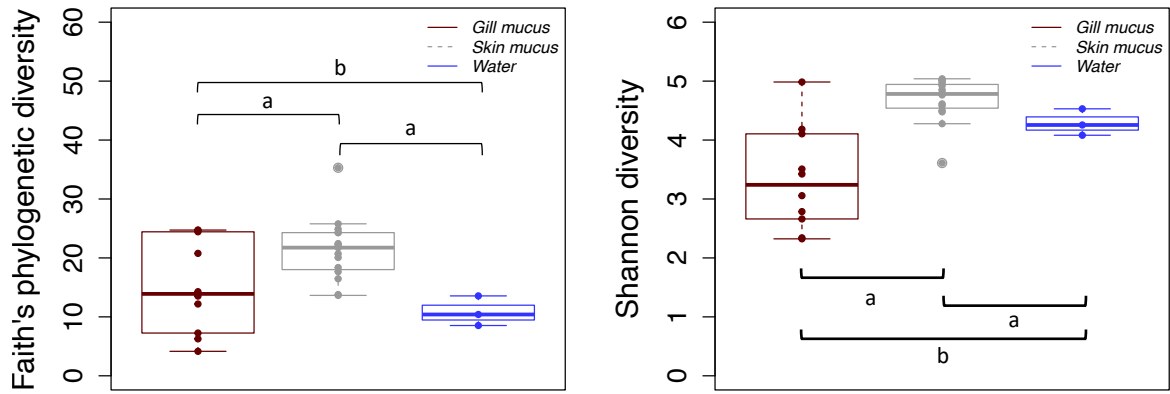


Figure S1.1: Comparison of alpha diversity values between tissue of *Pagellus acarne* and water. Faith's phylogenetic diversity and Shannon diversity index for skin mucus (grey), gill mucus (brown) and water communities (blue). Significant (a) and non-significant (b) differences between tissue are indicated (for Faith index: post hoc Tukey test significant if p -value < 0.05. For Shannon index: Post hoc Conover-Iman test significant if $p < \alpha/2 = 0.025$)

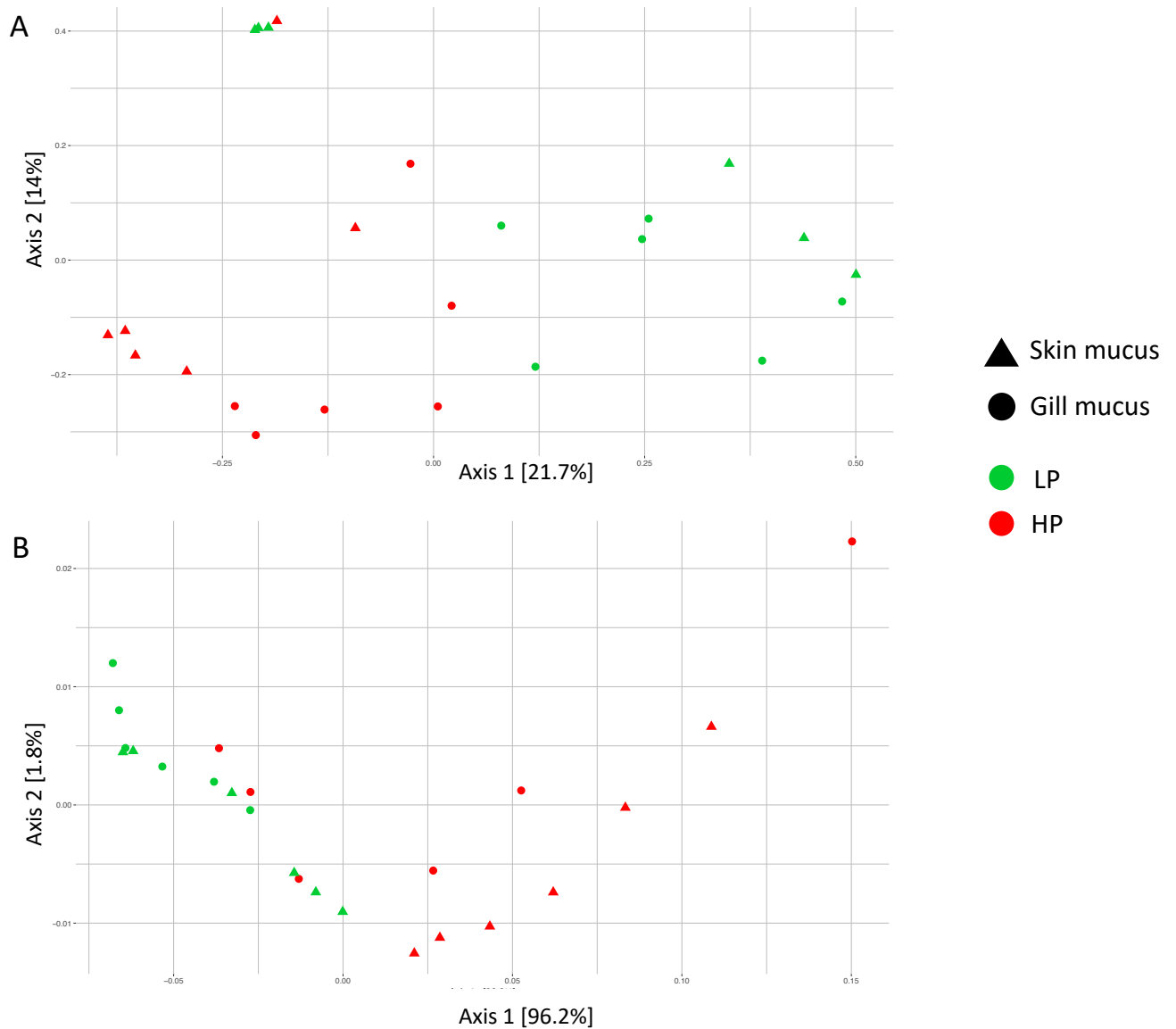


Figure S1.2: PCoA plot based on dissimilarities between bacterial communities of *Diplodus annularis* using Bray Curtis (A) and weighted Unifrac (B). Form indicates the type of tissue, gill mucus (circle), skin mucus (triangle), and color refers to lightly parasitized (LP, green) or heavily parasitized (HP, red).

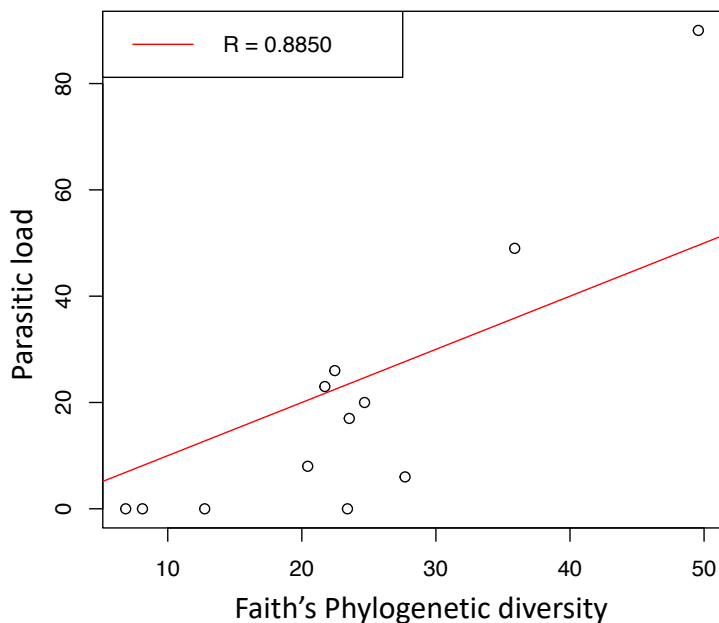


Figure S1.3: Significant correlation between skin microbiota diversity (Faith's phylogenetic index) and *Lamellodiscus* load in *Diplodus annularis* (Pearson correlation test, $p < 0.05$, $R = 0.885$).

Table S1.2: Significant Spearman correlation coefficients between the abundances of *Lamellodiscus* and bacterial phylum, class, order, family and genus in *Diplodus annularis* and *Pagellus acarne* gill mucus

<i>Diplodus annularis</i> gills			<i>Pagellus acarne</i> gills		
	P-value	Coef		P-value	Coef
Phylum			Phylum		
Patescibacteria	0.05	0.576	Fusobacteriota	0.048	-0.501
Bacteroidota	<0.001	0.844	Bacteroidota	0.013	0.604
Class			Class		
Gracilibacteria	0.007	0.733	Fusobacteriia	0.048	-0.501
KD4-96	0.006	0.738	Chlamydiae	0.022	0.569
Rhodothermia	0.005	0.748	Bacteroidia	0.013	0.604
Bacteroidia	<0.001	0.844	Order		
Order			Fusobacteriales	0.048	-0.501
Vibrionales	<0.001	-0.89	Defluviococcales	0.045	0.507
Corynebacteriales	0.02	-0.659	Chitinophagales	0.031	0.54
Micrococcales	0.026	-0.638	Chlamydiales	0.022	0.569
Unidentified Gammaproteobacteria	0.043	0.59	Flavobacteriales	0.021	0.571
Cytophagales	0.043	0.591	Family		
Rhodothermales	0.038	0.602	Unidentified Planctomycetales	0.047	-0.503
Mycoplasmatales	0.038	0.602	Fusobacteriaceae	0.048	-0.501
Cardiobacteriales	0.038	0.602	Unidentified Defluviococcales	0.042	0.514
Micavibrionales	0.036	0.607	Saprosiraceae	0.031	0.54
Oceanospirillales	0.018	0.667	Flavobacteriaceae	0.021	0.571
JGI 000069-P22	0.007	0.733	Spongiibacteraceae	0.02	0.575
Unidentified KD4-96	0.006	0.738	NS9 marine group	0.015	0.594
Actinomarinales	0.004	0.757	Genus		
Phormidesmiales	0.002	0.792	Propionigenium	0.027	-0.551
Flavobacteriales	0.001	0.826	Unidentified Planctomycetales	0.047	-0.503
Opitutales	0.001	0.828	Rubidimonas	0.049	0.499
Rhodobacterales	0.001	0.829	Unidentified Defluviococcales	0.042	0.514
Family			Aquibacter	0.023	0.563
Vibrionaceae	<0.001	-0.89	Fabibacter	0.021	0.571
Microbacteriaceae	0.011	-0.699	Unidentified NS9 marine group	0.015	0.594
Unidentified Microtrichales	0.042	-0.594	NS4 marine group	0.008	0.64
Fokiniaceae	0.048	0.58	Unidentified Flavobacteriaceae	0.001	0.739
Parvularculaceae	0.048	0.58			
Unidentified Gammaproteobacteria	0.043	0.59			
Hyphomonadaceae	0.043	0.591			
Rhodothermaceae	0.038	0.602			
Mycoplasmataceae	0.038	0.602			
Cardiobacteriaceae	0.038	0.602			
Methylophilaceae	0.026	0.635			
Unidentified JGI 000069-P22	0.007	0.733			

Unidentified KD4.96	0.006	0.738
Colwelliaceae	0.006	0.741
Phormidesmiaceae	0.005	0.748
Clade II	0.005	0.748
Unidentified Actinomarinales	0.004	0.757
Pseudohongiellaceae	0.004	0.758
Flavobacteriaceae	0.003	0.779
Rickettsiaceae	0.002	0.8
Pseudoalteromonadaceae	0.002	0.802
Puniceococcaceae	0.002	0.803
Rhodobacteraceae	0.001	0.829

Genus

Unidentified Microbacteriaceae	0.007	-0.727
Enterovibrio	0.016	-0.674
Photobacterium	0.028	-0.631
Aeromicrobium	0.035	-0.611
Blastopirellula	0.035	-0.609
Unidentified Microtrichales	0.042	-0.594
Cyanobium PCC.6307	0.048	0.58
MD3.55	0.048	0.58
Parvularcula	0.048	0.58
Unidentified Gammaproteobacteria	0.043	0.59
Unidentified Rhodothermaceae	0.038	0.602
Mycoplasma	0.038	0.602
Unidentified Cardiobacteriaceae	0.038	0.602
Unidentified Cyclobacteriaceae	0.029	0.627
Methylotenera	0.026	0.635
Phormidesmis ANT.LACV5.1	0.022	0.651
Unidentified Rickettsiaceae	0.021	0.654
Sphingorhabdus	0.021	0.654
Marinicella	0.019	0.662
Tenacibaculum	0.013	0.691
Fabibacter	0.008	0.724
Unidentified JGI 0000069-P22	0.007	0.733
Unidentified KD4-96	0.006	0.738
Acrophormium PCC.7375	0.005	0.748
Unidentified Clade II	0.005	0.748
Unidentified Actinomarinales	0.004	0.757
Pseudohongiella	0.004	0.758
Thalassotalea	0.004	0.758
Unidentified Flavobacteriaceae	0.004	0.767
Unidentified Rhodobacteraceae	0.003	0.769
Megaira	0.003	0.776
Coraliomargarita	0.002	0.792
Pseudoalteromonas	0.002	0.802

5. Conclusion, perspectives

Dans cette étude, nous avons identifié des variations du microbiote bactérien du mucus externe d'individus appartenant à une même espèce le long d'un gradient de charge parasitaire en *Lamellodiscus*. Ces résultats mettent en évidence la nature dynamique du microbiote du mucus, en particulier en relation avec les infestations de monogènes chez deux espèces de sparidés sauvages. Plus généralement, cette étude met l'accent sur les liens entre les hôtes, les communautés bactériennes et les parasites, allant de la dynamique de co-infection au rôle potentiellement protecteur du microbiote de l'hôte.

Cette étude ne permet cependant pas de démêler les causes des conséquences des changements observés au sein du microbiote des individus. Pour établir si ces différences de microbiote préexistent ou suivent une infestation parasitaire, il faudrait pouvoir accéder à des individus non parasités afin d'établir les communautés bactériennes qui leur sont naturellement associées en l'absence de parasites monogènes et suivre ce même mucus après un processus d'infestation. Une autre possibilité est de s'intéresser à des espèces de poissons qui semblent avoir développé des mécanismes de protection contre les parasites monogènes. Ces individus pourraient présenter au sein de leur mucus d'éventuels composés antiparasitaires, lesquels pourraient être plus facilement détectables en l'absence de parasite.

Chapitre II

Composition du mucus externe de sparidés sauvages, une comparaison entre espèces parasitées ou non par des *Lamellodiscus*

1. Contexte

Nous avons vu que la prévalence et la charge parasitaire pouvaient être considérées dans des mesures de spécificité, mais cela peut également désigner la capacité ou non des parasites à infecter une espèce hôte. Or, il existe chez les téléostéens des espèces qui ne sont jamais infectées par certains parasites, notamment des monogènes. Plusieurs études suggèrent que la protection vis-à-vis des parasites pourrait se faire par l'intermédiaire du mucus et du microbiote externe des téléostéens par le biais de composés antiparasitaires.

Pour étudier les mécanismes qui sous-tendent cette protection, nous nous sommes concentrés sur une espèce de sparidé, *Boops boops* (bogue), qui n'a jamais été répertoriée comme parasitée par les monogènes *Lamellodiscus* alors même qu'elle évolue à proximité d'autres espèces de sparidés qui, eux, sont très régulièrement parasitées. Les mécanismes qui sous-tendent cette protection ne sont pas encore connus et nous avons voulu déterminer si le mucus et le microbiote externe de cette espèce étaient impliqués dans cette défense, notamment en libérant des molécules antiparasitaires qui empêcheraient l'installation des larves de *Lamellodiscus* au niveau de la peau et/ou l'installation des stades post-larvaires dans les branchies. Pour cela, nous avons caractérisé les communautés bactériennes par séquençage à haut débit (Illumina MiSeq) et la composition en métabolites par spectrométrie de masse (LC-HRMS) du mucus externe de 4 espèces de sparidés sauvages, *Boops boops* (bogue), *Pagellus acarne* (pageot acarné), *Spicara maena* (mendole), *Sparus aurata* (daurade royale). Dans un premier temps, la structure des microbiotes bactériens et des métabolomes a été étudiée en relation avec des facteurs liés à l'hôte (tissu, espèce, position dans la colonne d'eau), ou à l'environnement (lieu de capture, date de capture). Dans un second temps, nous avons identifié les taxons bactériens et les métabolites spécifiquement associés aux bogues, dans le but d'identifier de potentiels biomarqueurs antiparasitaires.

2. Principaux résultats

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le tissu (peau et branchies), la position dans la colonne d'eau, et des facteurs comme la date et le lieu de capture sont des variables qui influencent la variabilité et la structure des microbiotes et des métabolomes cutanés et branchiaux. L'espèce hôte est le facteur qui influence le plus la structure de ces deux assemblages, suggérant que des facteurs physiologiques intrinsèques jouent un rôle primordial dans leur structure (l'un des compartiments pouvant notamment agir sur l'autre et inversement). Un taxon bactérien anaérobie, rarement associé au microbiote du mucus des branchies des téléostéens, la famille *Cardiobacteriaceae*, semble spécifiquement associé aux branchies des bogues, suggérant un rôle potentiel de cette famille dans sa protection vis-à-vis des monogènes *Lamellodiscus*. Cette protection peut également être liée à une composition chimique particulière dans le mucus externe des bogues bien que le lien entre les molécules de la famille des eicosanoïdes retrouvées et la protection des bogues vis-à-vis des *Lamellodiscus* ne soit pas simple à établir. Nous n'avons a priori pas identifié d'autres molécules antiparasitaires.

3. Travail réalisé

Cette étude a été réalisée avec l'aide de Nathalie Tapissier-Bontemps et Delphine Raviglione (CRIOBE, UPVD) qui ont notamment supervisé la mise en place du protocole d'extraction de métabolites et les injections des échantillons en spectrométrie de masse (LC-HRMS). Le traitement et l'analyse de données brutes issues de spectrométrie ont été réalisés avec l'aide de Nathalie Tapissier-Bontemps, qui a également participé à une partie de la rédaction du manuscrit ci-dessous.

J'ai réalisé toutes les autres parties de ce travail : l'échantillonnage, le comptage et l'identification des parasites, toutes les parties qui traitent de l'analyse des communautés bactériennes du mucus externe (biologie moléculaire (extraction ADN, PCRs), traitement et analyses de données de séquençage), ainsi que la rédaction du manuscrit ci-dessous.

4. Manuscrit

Do microbial diversity and metabolome of the external mucus of wild Mediterranean species reflect the host association with monogenean ectoparasites?

Revault Judith*¹, Delphine Raviglione^{2,3}, Yves Desdevises¹, Elodie Magnanou¹, Nathalie Tapissier-Bontemps²

¹Sorbonne Université, CNRS ; Biologie Intégrative des organismes marins, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

²Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE), Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), Université PSL, UPVD, CNRS, UAR 3278, 52 Av. Paul Alduy, CEDEX, 66860 Perpignan, France

³Plateau technique MSXM, Plateforme Bio2Mar, Université de Perpignan via Domitia, Perpignan, CEDEX 9, France

In Preparation

Introduction

From their early stage of development, animals use sophisticated mechanisms to maintain their homeostasis and to fight external aggression. This is especially true for marine animals, which are constantly exposed to high microbial load and consequently to many potential pathogens in their environment (Ducklow & Kirchman 2000; Díaz-Puertas *et al.* 2023). To protect themselves, fish produce a mucus matrix on their external surfaces (skin and gills) that is colonized by microorganisms forming the external microbiota. These microorganisms are crucial to maintain fish homeostasis as they are implicated in many physiological processes such as the excretion of ammonia and nitrogenous waste (Van Kessel *et al.* 2016) or the development of the host immunity (Lee & Mazmanian 2010; Kelly & Salinas 2017). However, these assemblages of microbial communities are not fixed and could be highly variable depending on biotic and abiotic factors (Larsen *et al.* 2013; Kashinskaya *et al.* 2021; Scheifler *et al.* 2023). For example, temperature has been reported as a major factor modifying the composition of the bacterial communities from the external mucus of teleost species such as chub mackerel (Minich *et al.* 2020) and yellowtail kingfish (Horlick *et al.* 2020). Other factors related to the host such as diet or age are also known to drive part of the variability of external mucus bacterial communities as shown in coral reef fish or in farmed seabass and seabream (Chiarello *et al.* 2018; Rosado *et al.* 2021). The mucus contains a diverse array of biologically active molecules that could be produced either by the fish or its microbiota (Sanchez *et al.* 2012). As those metabolites are the end products of cellular regulatory processes, they can be considered as the ultimate response of a biological system to changing conditions (Reverter *et al.* 2018). Consequently, the chemical composition of the mucus is also highly dependent on environmental and host-related factors (Reverter *et al.* 2017; Fernández-Alacid *et al.* 2018; Albaladejo-Riad *et al.* 2023).

Despite the dynamic nature of its composition, external mucus contributes to host protection against pathogens in part mediated by immune-related molecules such as lysozyme, immunoglobulin, lectins, and carbohydrates (Salinas 2015; Dash *et al.* 2018). This immunity is supported by numerous molecules with antibacterial, antifungal, and antiparasitic activities present in the external mucus (Hellio *et al.* 2002; Fuochi *et al.* 2017; Wang *et al.* 2019; Kumari & Yadav 2020; Bhatnagar *et al.* 2023; Hussain & Sachan 2023). The external microbiota can be involved in this production of specialized metabolites as already been shown from several mucus-isolated bacterial strains (Lowrey *et al.* 2015; Stevens *et al.* 2016; Takeuchi *et al.* 2021).

However, the role of the mucus and its microbiota in defense against infection by ectoparasites remains poorly understood with only few antiparasitic molecules identified or presumed (Colorni *et al.* 2008; Reverter *et al.* 2020).

Fluctuations of the external mucus composition could be challenging to detect molecules with attractive or protective properties against parasites especially in wild populations, but all components of fish mucus, including molecules and microbiota, may act in concert to block pathogen entrance. For all these reasons, it is likely that the mucus of wild fish is an underexplored source of bioactive molecules whose identity and role remain to be characterized. High-throughput “omics” technologies such as metabolomics appear as a promising avenue to further explore wild fish external mucus composition and discover new biomarkers (Ekman *et al.* 2015; Ivanova *et al.* 2021).

This study combined -omics technologies, metabarcoding and metabolomics to study external mucus of wild Mediterranean sparid fish species. Sparidae (Perciformes) is a family comprising 19 species in the Northwestern Mediterranean Sea displaying various ecological traits. Another feature of this fish family is that it is a relevant fish-parasite system to study monogenean host specificity. Indeed, monogeneans belonging to the genus *Lamellodiscus* are commonly found in sparid gill mucus and this association has been intensively studied in the past decades (e.g. Euzet & Oliver 1966, 1967; Oliver 1973, 1974; San Filippo 1978; Euzet 1984; Neifar 1995; Desdevises 2001; Amine *et al.* 2006, 2007; Boudaya *et al.* 2009; Diamanka *et al.* 2011). A large range of patterns of *Lamellodiscus* specificity for their sparid hosts have been observed, including two sparid species never parasitized by *Lamellodiscus* monogeneans, *Boops boops* and *Dentex dentex*. The aim of this study was to characterize the external mucus composition (skin and gill) of four sparid species and assess the effect of environmental and host-related factors on the structure and the diversity of bacterial communities and metabolomes using a non-targeted liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) metabolomic approach and 16S rDNA gene sequencing. Subsequently, we assessed the impact of parasitism by grouping three sparid species for which regular infection of *Lamellodiscus* is documented, and by characterizing the major differences between their external mucus composition to that of *Boops boops* for which any *Lamellodiscus* have never been found. It allowed us to explore the potential protective functions associated with the external mucus of this species.

Materials and Methods

Fish sampling

Fish sampling was conducted between December 2021 and March 2022 in the Gulf of Lions near Banyuls-sur-Mer and Argelès-sur-Mer (northwest Mediterranean Sea, France) (Table 2.1). For all fish individuals, a gill fishing net was placed overnight between 0 and 6 m depth. Few hours later, fish were collected from the net, handled with gloves and put into individual plastic bags right after collection. They were immediately brought from the vessel to the laboratory for dissection. A total of 22 fish individuals were sampled for their skin and gill mucus, belonging to four sparid species: 3 individuals identified as *Sparus aurata*, 7 as *Spicara maena*, 5 as *Pagellus acarne*, and 7 as *Boops boops* (Supplementary Table 2.1). The mucus from 4 gills arches were used for metabolites extraction, 1 gill arch was used for bacterial extraction. Among the species sampled, *Boops boops* is known as never parasitized (NP) by *Lamellodiscus monogeneans*, contrarily to the three remaining species (parasitized, P). Three gills' arches of each individual of all fish species were examined under a dissecting microscope for parasite identification and counting (Supplementary table 1). For simplicity, we will use the terms 'parasitism', 'never parasitized' and 'parasitized' to refer specifically to the parasite loads in *Lamellodiscus* spp.

Gill and skin mucus sampling

For metabarcoding and metabolomics, skin mucus and gill mucus were collected with sterile spatula and immediately placed in sterile tubes and either stored at -80°C until DNA extraction or freeze-dried and stored at -80°C until metabolites' extraction. For convenience, we will refer to gills and skin mucus as "tissues".

1. Metabarcoding:

Bacterial DNA extraction, 16S rRNA sequencing and sequence processing

DNA extraction, 16S rRNA sequencing and sequence processing were performed following the protocol of Scheifler *et al.* (2022). Briefly, DNA was extracted by using the Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep Kit (Zymo Research, Orange, California), PCR amplification was carried out in triplicate and performed using primers targeting the hypervariable V3-V4 region of the 16S rRNA gene: 341F (5'CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')(Klindworth *et al.* 2013; Sinclair *et al.* 2015). A second PCR was

performed to add barcodes to each amplified sample. The concentration of all PCR products was normalized with a 96 well SequelPrep Normalization Plate (Thermofisher, France). Amplicons were sequenced using Illumina 2x300 bp MiSeq sequencing (FASTERIS SA, Switzerland). The analysis of the raw sequences was done using the QIIME2 software and the standard pipeline of DADA2 (van der Kloet et al., 2009). Raw reads were demultiplexed, quality checked and trimmed to remove primer regions, paired ends were assembled, chimeric sequences were discarded, and reads were denoised. DADA2 generate a list of Amplicon Sequence Variants (ASVs). Sequences were aligned against the SILVA 138 reference database distributed by the Silva project (Quast *et al.* 2012; Yilmaz *et al.* 2014). The MAFFT program was used to align the sequences and FastTree to build a phylogenetic tree. Based on the classification, ASVs matching “Archaea”, “Eukaryota” and “Unassigned” or represented by a single sequence in all samples were removed.

Data analysis:

α -diversity measures were estimated with Faith’s phylogenetic and Shannon indexes using the dataset normalized to the total number of sequences per samples and the phyloseq R package (McMurdie & Holmes 2013). We performed one-way ANOVA (or non-parametric Kruskal-Wallis tests when data were not normally distributed) to compare alpha diversity between tissues (i.e., skin mucus and gill mucus) and groups (i.e., species, place of capture, position in water column, and parasitism). When the ANOVA (or Kruskal-Wallis test) identified significant difference among groups, we computed pairwise comparisons between group levels using Tukey post hoc tests (or post hoc Conover-Iman (CI) test) with Benjamini-Hochberg correction to detect significant differences between groups. Principal Coordinates Analysis (PCoA) using both Bray-Curtis, based on ASVs’ abundance, and weighted Unifrac distance, which takes into account both the ASVs’ abundance and their phylogenetic relationships, was used to assess the differences between the microbiota of the different fish species. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA (function *adonis*, *vegan* R package) and pairwise comparisons for Bray-Curtis and Weighted Unifrac indices (1000 permutations) were used to evaluate statistically significant differences of PCoA groups between tissues, species, place of capture, position in water column and parasitism (i.e., NP or P).

To assess how each bacterial taxon contributed to the dissimilarity between NP and P gill or mucus bacterial communities, we performed a Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe)

(Segata *et al.* 2011). LEfSe provides Linear Discriminant Analysis (LDA) scores for the bacteria taxa contributing the most to the differences between bacterial communities. We calculated relative abundances (i.e., total sum scaling) of bacterial taxa (i.e., phyla, class, order, family and genus) showing a significant contribution to the dissimilarity between NP and P bacterial communities.

2. Metabolomics

Chemicals

For sample preparation, Acetonitrile (MeCN) HPLC grade, Methanol (MeOH) HPLC grade and Ultra-pure Water (Purelab Chorus 1, Veolia Water Technologies, France) were used. For UHPLC-HRMS analysis, Ultra-pure Water (Purelab Chorus 1, Veolia Water Technologies, France), and Acetonitrile LC-MS grade and Formic acid 99 % RS for LC-MS was purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France).

Metabolites extraction

A 5 mg aliquot of the freeze-dried samples was extracted using a mixture of solvents. Samples were suspended in 1 mL of H₂O/MeOH/MeCN (2:2:1), vortexed and homogenized in an ultrasonic bath. The mixture was left 30 min at -20 °C and centrifuged 15 min at 4400 rpm at 4 °C prior to injection. The quality control (QC) samples were prepared by pooling small equal aliquots from each sample. Two blank samples were prepared using the same protocol as for samples extraction.

UHPLC HR-MS data acquisitions

LC-HRMS analyses were performed with a Vanquish™ UHPLC system from ThermoScientific (MA, USA) equipped with a QExactive™ Plus Heated Electrospray-Quadrupole/C-Trap-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Chromatographic separations were achieved on a polar C-18 UHPLC column (Phenomenex Luna® Omega 1.6 µm 100 × 2.1 mm), maintained at 30 °C with an elution gradient composed of (A) water and (B) MeCN both with 0.1 % formic acid, under following conditions: 5 % B during 1 min, followed by a linear gradient to reach 100 % B in 25 min, then maintained 4 min in isocratic mode (100 % B). The analysis was followed by a return to initial conditions for column equilibration during 2 min for a total runtime of 35 min. Extracts were randomly injected alternating the quality control sample

injections every 7 samples to monitor the quality of the LC-MS data. Blank extraction samples were injected at the beginning and at the end of the sequence.

Parameters for the full MS experiments in negative and positive ionization modes using fast polarity switching were set as follows: the resolution was 35,000, the Automatic Gain Control (AGC) was 3E6 ions, the maximum Injection Time (IT) was 200 ms and a scan mass window of 100-1500 m/z was used; probe heater temperature, 250°C; capillary temperature, 320°C; S-lens RF level, 60; sheath gas, auxiliary gas, and sweep gas were 45, 15, and 0, respectively; and spray voltage, 3.2 kV (+ESI and -ESI). For the annotations of the VIP metabolites, MS/MS acquisition consisted of one full scan mass spectrum and 5 data-dependent MS/MS scans. Parameters for the full MS experiments were set as follows: the resolution was 70,000, the Automatic Gain Control (AGC) was 3E6, the maximum Injection Time (IT) was 100 ms and a scan mass range of 100–1500 m/z was used. For the dd-MS2/dd-SIM experiments, the resolution was 17,500, AGC target was 5e5, maximum IT was 100 ms and for each MS/MS scans, top 5 most intense ions taking into account an isolation window of 1.5 m/z and a fixed first mass of 50.0 m/z were fragmented. Three Normalized Collision Energy™ (NCE) values were applied in order to obtain a combination of 3 fragmentations spectra. The applied NCE values were 25 eV, 35 eV and 45 eV, normalized to a reference ion of mass 500 m/z and charge 1 to obtain more fragments, NCE value of 50 eV was also applied.

Metabolomics data processing

Data acquisitions were performed using XClibur 4.1.31.9 (Thermo Fisher Scientific). Raw data (.raw, Thermo) were converted to open-source format (.mzML) using ProteoWizard's msConvert (version 3.0, from Proteowizard library). mzML files were uploaded and processed using the Galaxy Workflow4Metabolomics web platform (version 3.3) (Giacomini *et al.* 2015; Guitton *et al.* 2017).

Briefly, the pre-processing consisted in a chromatographic peak detection (Galaxy Version 3.12+galaxy0) followed by a peak grouping, a loess/non-linear "PeakGroups" retention time adjustment, a peak filling and "CAMERA" peak annotation. A matrix of features with peak intensity, m/z value and retention time was generated. A clean-up step was performed in order to eliminate all features that are significantly detected in blanks. Detected features with more than 30 % relative standard deviation in the pooled QC samples and those that did not appear in at least 50 % of samples in any one or more groups were further removed. For

identification, most probable molecular formula was determined using Sirius (v4.9.15) and comparison with mass fragmentation data mentioned in literature.

Data analysis

Statistical analyses were performed using MetaboAnalyst 5.0 (Pang *et al.* 2021) and packages on RStudio environment (version 4.2.2). A pareto scaling and log10 transformation were applied on data. Permutational multivariate analysis of variance using Euclidean distance matrices (PERMANOVA (function `adonis`, `vegan` R package) and pairwise comparisons (function `pairwise.adonis`, `vegan` R package) were used to identify the host related factors (i.e., tissues, fish species) and ecological or environmental related factors (i.e., place of capture, position in the water column and parasitism) linked to the metabolic variability in gill mucus in both positive and negative ionization mode.

For metabolites, principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), was carried out to reveal discriminant features according to NP or P groups. To validate the model and to test the significance of the discriminations, permutation test based on cross model validation (function `MVA.test` and `pairwise.MVA.test`, `RVAideMemoire` R package) was performed. The most discriminant features were selected according to their significance and their variable importance in projection (VIP) scores. Manual checking of the VIPs was processed using the `MzMine3` software (Damiani *et al.* 2023). We performed an ion extraction at the defined retention time and checked the scan number and its isotopic mass. Then Wilcoxon rank sum test was performed to test the significance of the differences of VIP features intensity among NP and P group (function `wilcox.test`, package `stats`).

Results

Overall view

For this study, 22 individuals belonging to four sparid species were sampled between December 2021 and March 2022. 15 individuals belonging to *Sparus aurata*, *Pagellus acarne* and *Spicara maena* species were classified as “parasitized” (P) and 7 individuals belonging to *Boops boops* species were classified as “never parasitized” (NP) (Supplementary Table S2.1). In total 409 692 sequences representing 3717 ASVs were retrieved from 44 fish samples. Proteobacteria and Bacteroidota represented the most abundant and common phyla in both gill and skin mucus (Supplementary Figure S2.1).

Metabolome variations were analyzed via an untargeted metabolomic approach on gill and skin mucus in negative and positive ionization mode. After data processing and filtering, matrix obtained from the LC-ESI-HMRS analysis included among 360 features for skin and gill mucus in negative ionization mode and 700 features from both tissues in positive ionization mode (Supplementary Table S2.2).

Microbiota diversity

Diversity between bacterial communities was assessed using two alpha diversity metrics: the Faith's phylogenetic index (phylogenetic richness) and the Shannon diversity index (taxonomic richness and evenness). When comparing diversity metrics, we found significant differences between the bacterial community of the skin mucus and gill mucus only with Shannon index (KW test, $p < 0.01$). For this alpha diversity metric, skin mucus was significantly higher than for gill mucus showing that this habitat harbors more diverse bacterial communities (Supplementary figure S2.2). When comparing host fish species within gill or skin mucus we found significant differences in diversity only when considering Faith index (ANOVA; KW test, $p < 0.05$). It can be probably explained by the highest bacterial diversity in *Boops boops* gill mucus (Post hoc Tukey $p < 0.05$) compared to other fish species (Figure 1) and in *Spicara maena* skin mucus (CI tests, $p > \alpha/2 = 0.025$) compared to *Sparus aurata* and *Pagellus acarne* skin mucus (Figure 2.1).

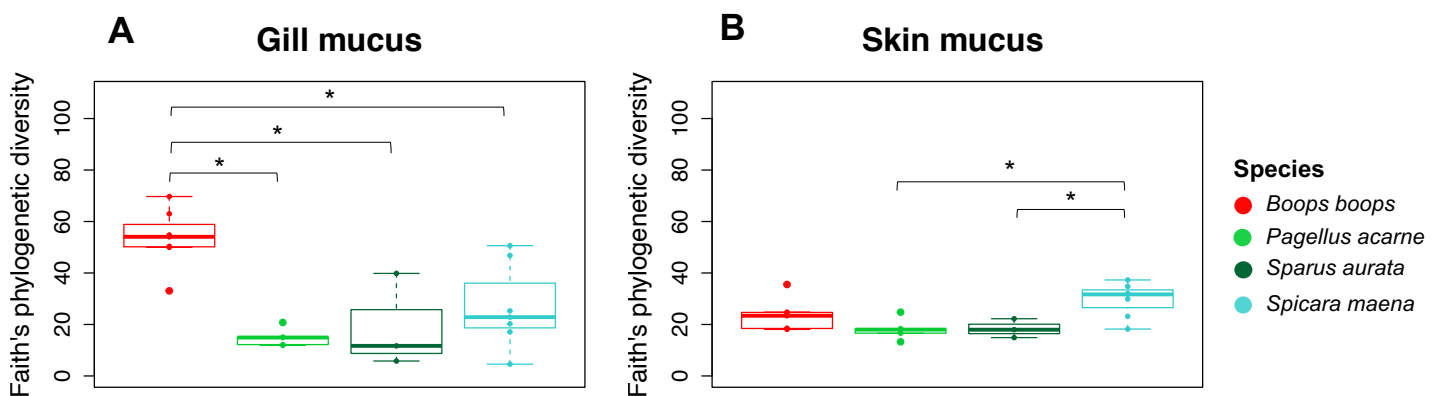


Figure 2.1: Comparison of alpha diversity values between species. Faith's phylogenetic diversity for gill mucus (A) and skin mucus (B) for each species; *Boops boops* (red), *Pagellus acarne* (green), *Sparus aurata* (dark green) and *Spicara maena* (blue). Significant differences (*) between species are indicated (for gill mucus: Post hoc Tukey test significant if p -value < 0.05 . For skin mucus: Post hoc Conover-Iman test significant if $p < \alpha/2 = 0.025$)

No significant effect of place of capture was found on gill or skin mucus bacterial diversity regardless of the index considered (ANOVA; KW test, $p > 0.05$) (Supplementary figure S2.3).

To the contrary, in both tissues, we observed a significant effect of position in water column on the diversity of bacterial communities when considering Faith index (KW test, $p < 0.05$), explained by a highest diversity of bacteria within the tissues of pelagic and semi-pelagic fish (Supplementary figure S2.3).

High dissimilarities of bacterial communities and metabolome among tissue, fish species and environmental or ecological traits

Bray Curtis dissimilarity index (BC, takes into account the relative abundances of each ASV) and the weighted Unifrac distance (WU, incorporates both the relative abundances of each ASV and phylogenetic relationships between ASVs) were used to determine which factors explain the variability of bacterial communities. A Euclidean distance matrix was also used to determine which factors explain the variability of metabolomes.

First, a significant effect of the tissue on the variability of bacterial communities (PERMANOVA for BC and WU respectively: $p < 0.001$ ($R^2 = 0.060$); $p < 0.01$ ($R^2 = 0.178$) and on metabolome variability (PERMANOVA, $p < 0.01$; $R^2 = 0.12$ and $R^2 = 0.11$ for negative and positive ionization mode respectively) was found (Table 2.1).

Host fish species also displayed a significant effect on the variability of gill and skin mucus bacterial communities based on BC dissimilarities (PERMANOVA, $p < 0.01$; $R^2 = 0.28$ and $R^2 = 0.51$ respectively) which means that individuals within a given fish species harbor significantly more similar external bacterial communities than compared to fish from other species (Table 2.2). In skin mucus, most pairwise comparisons between fish species were significant ($p < 0.05$), with the exception of the association involving *Pagellus acarne* and *Sparus aurata*. In gill mucus, only pairwise comparisons involving *Boops boops* and *Pagellus acarne* or *Spicara maena* were significant ($p < 0.05$) (Supplementary table S2.3). However, no significant host fish species effect was found on the variability of bacterial communities of gill and skin mucus when phylogenetic relations between ASVs were taken into account (WU dissimilarities, $p > 0.05$) suggesting that the four sparid species harbor closely related microbial taxa (Table 2.1, Supplementary figure S2.4). Host fish species seems also to explain a part of metabolic variability in gill and skin mucus in both ionization mode (PERMANOVA, $p < 0.01$; $0.33 < R^2 < 0.38$; $0.37 < R^2 < 0.41$ respectively) (Table 2.1). As for bacterial communities in skin

mucus, most pairwise comparisons between fish species were significant ($p < 0.05$), with the exception of the association involving *Pagellus acarne* and *Sparus aurata* in both tissues (Supplementary table S2.3). This result was supported by the global variations of external mucus observed through a principal component analysis (PCA) where in both tissues and both ionization modes, metabolomes of these two species were close (Figure 2.2).

As fish species did not fully explain the variability of bacterial communities and metabolome within their external mucus, we tested other factors relative to fish environmental and ecological traits. Some fish were caught off Banyuls-sur-Mer and others off Argelès-sur-Mer, and the place of capture seems also to influence the bacterial communities within gill and skin mucus when considering BC dissimilarities (PERMANOVA, $p < 0.01$; $R^2 = 0.12$ and $R^2 = 0.29$, respectively) and metabolic variability in both tissues and both ionization modes (PERMANOVA, $p < 0.01$; $0.12 < R^2 < 0.19$) (Table 2.1).

PERMANOVAs revealed that position of the fish in the water column (i.e., pelagic/semi-pelagic or demersal) explained 8 % and 13 % of the dissimilarity of gill and skin mucus bacterial communities respectively (BC dissimilarities $p < 0.05$) and between 12 % and 16 % of the metabolic variability within gill and skin mucus ($p < 0.01$) (Table 2.1).

	Gill mucus				Skin mucus			
	Bray-curtis		W unfrac		Bray-curtis		W unfrac	
	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²
Species	<0.001	0.28	0.58	-	<0.001	0.51	0.17	-
Location of capture	<0.001	0.12	0.64	-	<0.001	0.29	0.10	-
Position in water	<0.05	0.08	0.32	-	<0.001	0.13	0.51	-
NP vs P	<0.001	0.13	0.64	-	<0.001	0.29	0.06	-
	Negative ionization		Positive ionization		Negative ionization		Positive ionization	
	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²
	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²
Species	0.001	0.38	0.001	0.33	0.001	0.41	0.001	0.37
Location of capture	0.001	0.16	0.001	0.12	0.001	0.19	0.001	0.17
Position in water	0.001	0.14	0.001	0.12	0.001	0.16	0.001	0.15
NP vs P	0.001	0.19	0.001	0.15	0.001	0.18	0.001	0.15

Table 2.1: Results of PERMANOVAs on factors explaining the variability in composition of bacterial communities (up) and in metabolites (down). Significant p-values are highlighted in bold ($p < 0.05$).

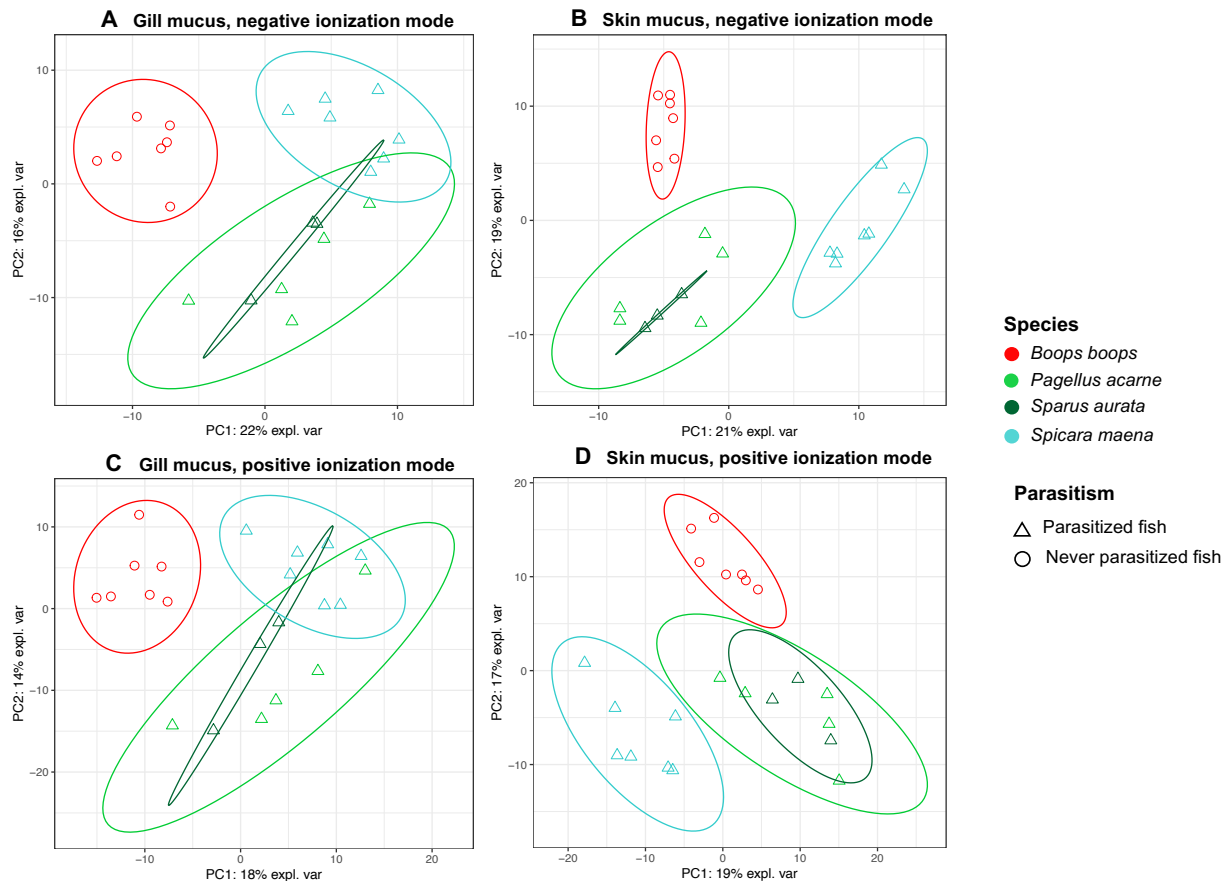


Figure 2.2: Two-dimensional score plots from principal component analysis (PCA) of (A-B) gill and skin mucus metabolome in negative ionization mode and (C-D) gill and skin mucus metabolome in positive ionization mode.

Differences between external mucus of NP and P fish

In order to understand if parasitism is linked to particular bacterial communities and chemical composition of the external mucus, we compared both tissues composition between NP and P fish. First, P and NP gill mucus bacterial communities were significantly different from each other only when considering Faith's index (ANOVA, $p < 0.01$), with a higher bacterial diversity in NP individuals (Supplementary Figure 2.5). No significant effect of parasitism was found on the diversity of skin mucus bacterial communities regardless of the index considered (ANOVA; KW test, $p > 0.05$) (Supplementary Figure 2.5).

The factor parasitism seems to explain gill and skin mucus bacterial communities' dissimilarity only when considering BC dissimilarities (PERMANOVA, $p < 0.001$, $R^2 = 0.13$ and $R^2 = 0.29$, respectively) suggesting that the differences in external mucus of NP or P fish involve closely related microbial taxa (Table 2.1).

In order to identify bacterial taxa enriched in external mucus of NP fish, we performed a Linear discriminant analysis Effect Size (Lefse). Significant differences in relative abundances of bacterial ASV among NP and P fish were found in both tissues (Figure 2.3). The gill mucus of NP fish contained significantly higher abundances of Cardiobacteriaceae (21.21 % mean relative abundance (i.e., total sum scaling method) vs average of 1.07 % in P fish), of Moraxellaceae (8.55 % vs 2.4 %) and Pasteurellaceae (2.76 % vs 0.12 %). As observed in the gill microbiota, the skin microbiota of NP fish was significantly enriched with the family Moraxellaceae (29.81 % vs 7.12 %) and the genera belonging to this family *Psychrobacter* (29.67 % vs 6.97 %). Other bacterial families and genera seemed also specifically associated with the skin microbiota of NP fish such as the family Rikenellaceae (8.13 % vs 0.03 %) and the genus *Rikenella* (5.83 % vs 0.02 %) and the family Spirochaetaceae (2.36 % vs 0.08 %).

In contrast, the gill microbiota of P fish contained was significantly enriched in Rubritaleaceae (8.65 % vs 0.54 %) and genera from the order Verrumicrobiales (8.93 % vs 0.72 %) especially the genus *Persicirhabdus* (7.83 % vs 0.05 %). The same bacterial taxa were also found to be enriched in the skin microbiota of P fish (Rubritaleaceae, 6.43 % vs 0.41 %; Verrumicrobioles, 6.73 % vs 1.13 %; *Persicirhabdus*, 5.75 % vs 0.01 %) and additionally contained a significantly higher proportion of Vibrionaceae (24.18 % vs 2.06 %), specifically two genera belonging to this family, *Vibrio* (3.33 % vs 0.32 %) and *Photobacterium* (6.18 % vs 1.16 %).

The factor parasitism seems to explain the metabolic variability in gill and skin mucus in both ionization modes (PERMANOVA, $p=0.001$, $0.15 < R^2 < 0.19$, Table 2.1).

Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was used to identify the features that mostly drive the differences between NP and P skin and gill mucus in both ionization modes, and the metabolites more represented in NP fish. All models obtained were robust, according to their classification error rate (CER), their p-value ($p\text{-value} < 0.01$) (Supplementary figure S2.6). Variables with a high importance in projection (VIP) with a score > 1 for the metabolites ionized in negative mode and with a score > 1.5 for the metabolites ionized in positive mode were selected. Around 110 variables were selected in each dataset and after manual filtering and statistical analysis (see Materials and Methods), about 10 most significant features for all dataset were considered for the downstream annotation (Supplementary table S2.2).

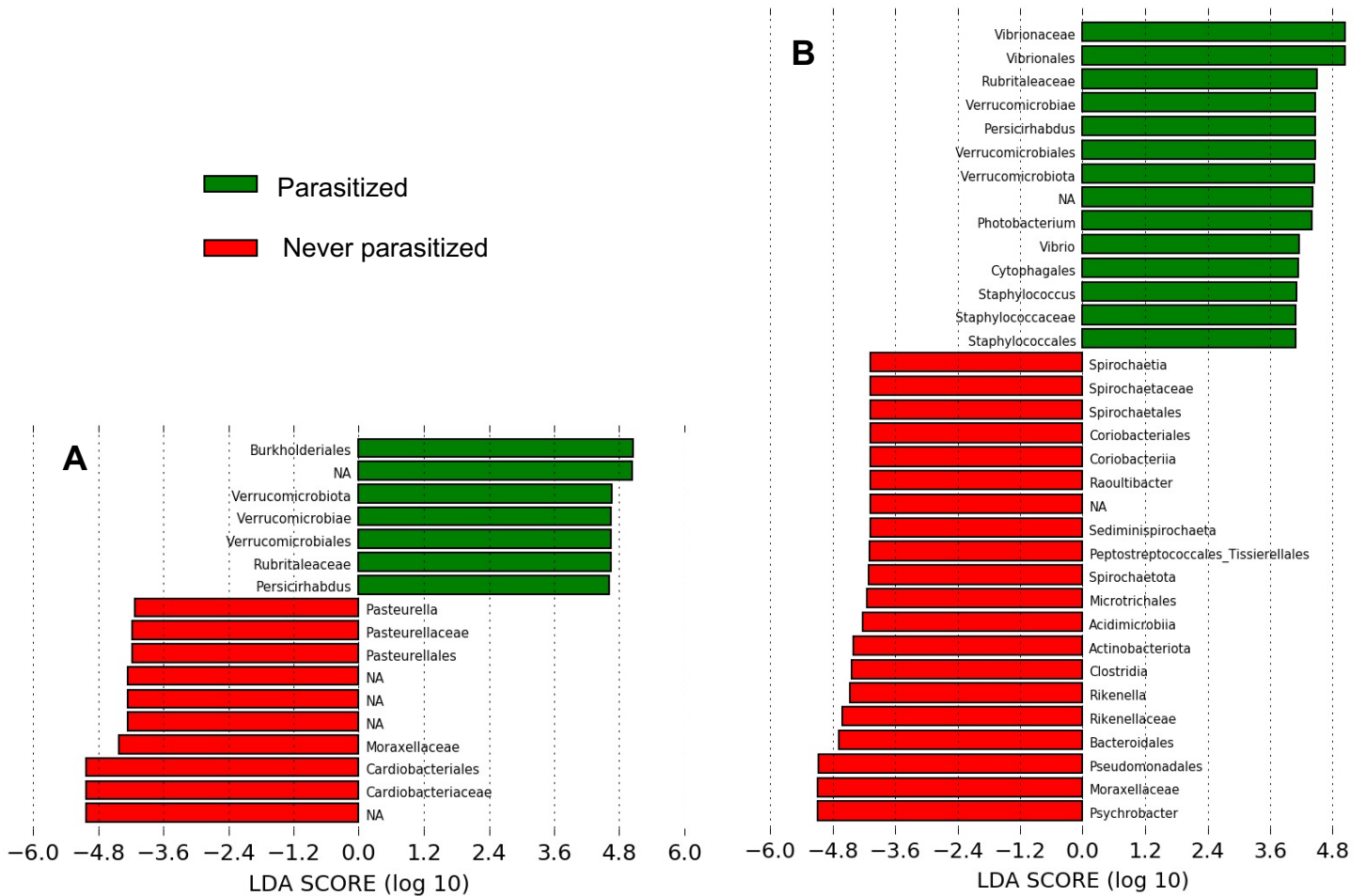


Figure 2.3: Most contributing taxa to differences between NP (red) and P (green) bacterial communities in gill mucus (A) or in skin mucus (B). LDA scores were calculated using Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe), only bacterial taxa that raised an LDA score > 4 are shown

Annotation of metabolites more represented in the external mucus of NP fish

In order to explore the mechanisms behind the protection toward parasitism in NP fish, then by searching for potential antiparasitic molecules and because the identification of specific metabolites requires a rigorous verification of each peak, only metabolites overexpressed in the mucus of never-parasitized fish were annotated. For each feature selected, a molecular formula and putative chemical class were proposed for most of the features based on exact mass, isotopic patterns, MS/MS fragmentation and Sirius annotation (Supplementary table S2.4, S2.5, S2.6 and S2.7).

Metabolites annotated from the gill mucus dataset ionized in negative mode were mainly belonging to the hydroxylated polyunsaturated fatty acid family (e.g., M348T369, M353T359)

and hydroxy-medium-chain fatty acid (e.g., M189T182). Among metabolites retrieved from this dataset, one feature was suspected to have an exogenous origin as it was annotated as bromoacrylic acid (M149T94) (Supplementary table S2.4). In positive ionization mode, 10 metabolites from gill mucus were annotated and some were also belonging to the PUFA family (i.e., M440T342, M353T463). In features retrieved from skin mucus in negative and positive ionization mode, only few molecules were identified because the majority was not fragmented. However, small peptides (e.g., M303T190, M426T210) were detected.

Discussion

In this study, we investigated how external mucus bacterial communities and metabolites from four wild Mediterranean sparid species were related to environmental, ecological, and host factors.

Skin mucus microbiota harbor more diversified bacterial communities than gill mucus, even if they possess common taxa. Similar results were already reported in other fish species such as rainbow trout (Lowrey *et al.* 2015), bluefin tuna (Kapetanović *et al.* 2006), and freshwater sofie fish (Guivier *et al.* 2020). The nature of the tissue has a significant effect on the variability of bacterial communities suggesting that bacterial lineages colonize specific animal-associated microhabitats. We also observed that the nature of tissue shapes metabolite variability. It could be explained by the specific functions accomplished by each organ and consequently the production of specialized molecules. For example, higher concentrations of glucogenic amino acids such as alanine or glutamine have been found in the gill mucus than in the skin mucus of Atlantic salmon (Ivanova *et al.* 2021) and the importance of the glutamic acid/glutamine cycle in controlling osmoregulation in gills has already been reported in the medaka fish (Huang *et al.* 2020). Metabolites excreted in each tissue could then reflect their physiological functions and create a specific microenvironment influencing the microbial colonization.

In the present study, the most important discriminating factor for microbiota composition of the external mucus was the host species. However, fish from all species harbor close phylogenetic bacterial taxa within their external mucus as no significant effect was found when ASV phylogenetic affiliations were considered. Host species-specific bacterial assemblages in the external mucus have already been reported on other wild teleost species

(Larsen *et al.* 2013; Chiarello *et al.* 2018; Sylvain *et al.* 2020; Sadeghi *et al.* 2023). These differences among species appear to be weakly linked to their ecology or environmental variations as fish raised in the same and controlled conditions also harbor species-specific assemblages (Chiarello *et al.* 2015) underlying the fact that external mucus specificity is primarily due to intrinsic physiologic factors. These species-specific physiological factors could lead to particular external mucus chemical composition and antimicrobial properties as proposed by Larsen *et al.* (2013). Indeed, we observed distinct metabolite profiles between species in gill and skin mucus, and, as for the tissue, it could shape bacterial colonization through particular composition of their “culture medium”, i.e., the external mucus. For example, Heim *et al.* (Heim *et al.* 2023) found different metabolites and lipids composition in the skin mucus of some clownfish and damselfish species. In eight freshwater species, species specificity of composition and concentration of metabolites such as taurine or gamma-aminobutyric acid were found (Ekman *et al.* 2023). Three teleost species, the meagre *Argyrosomus regius*, the European sea bass *Dicentrarchus labrax*, and the gilthead sea bream *Sparus aurata*, harbor differential concentrations of metabolites (cortisol, lactate, protein) in their skin mucus under basal control conditions and after physiological responses to air exposure, bacterial infection, and fasting (Fernández-Alacid *et al.* 2018). Thus, as the chemical composition of the external mucus has evolved to respond to the functional requirements of each species, metabolomics is a powerful tool to monitor health status within species but requires the description of the basal metabolome associated with the external mucus of each species. However, microorganisms in the external mucus have been shown to produce antibacterial and antifungal molecules (Sanchez *et al.* 2012; Boutin *et al.* 2013; Lowrey *et al.* 2015). These microbial-derived metabolites could contribute, alongside fish-produced molecules, to the overall variations of metabolome observed between species and could complicate the determination of a basal metabolome.

Environmental and ecological factors also structure part of the dissimilarity of bacterial communities observed in fish external mucus. Fish included in this study were sampled in 2 sites less than 8 km apart. Despite this apparent proximity, the place of capture explained 29 % of the dissimilarity of bacterial communities in skin mucus and 19 % of the dissimilarity of chemical composition in skin mucus. Furthermore, some fish individuals in the present study harbor close external mucus composition in bacterial composition and metabolites, despite belonging to two different species, *Pagellus acarne* and *Sparus aurata*. These results

could be partly explained by the position of the fish in the water column, that influences the structure of gill and skin mucus microbiota, considering that these species are both demersal compared to other fish which are semi-pelagic. As the environment is considered as the primary niche for microbiota acquisition in fish (Dodd *et al.* 2020; Scheifler *et al.* 2023), it can explain differential bacterial colonization observed between fish caught from two sites or living in different positions in the water column. Furthermore, differential environment or ecological traits can drive the chemical composition of external mucus, as shown in the skin of the turbot which harbors a higher concentration of lysozyme with an increase in temperature (Huang *et al.* 2011). Thus, changes in the external mucus chemical composition could recruit in the environment particular bacterial taxa more adapted to these conditions, consequently influencing fish microbiota.

In a second part, we investigated the potential involvement of chemical and bacterial composition of the external mucus in the protection of *Boops boops* against *Lamellodiscus* spp monogeneans.

Certain bacterial taxa were found to be specifically associated with the skin and gill mucus of both NP and P fish. Notably, the family *Cardiobacteriaceae* was significantly enriched in NP *Boops boops* gill mucus. This family has been described in some respiratory organs or skin of marine mammals (Pirodda *et al.* 2017; Apprill *et al.* 2020). To our knowledge, few studies have mentioned this bacterial family as a member of the external mucus microbiota of fish. *Cardiobacteriaceae* has also been reported in the microbiota from the blowhole of the striped dolphin and the presence of this anaerobic family in a highly oxygenated area was interpreted by the authors as septicemia, as it is commonly associated with bacteremia or wound infection in humans (Godoy-Vitorino *et al.* 2017). However, *Cardiobacteriaceae* has been described in the respiratory organs of both captive and free-ranging healthy dolphin species (Johnson *et al.* 2009; Lima *et al.* 2012; Li *et al.* 2023) as well as in whale blow (Pirodda *et al.* 2017) or on the skin of whale (Apprill *et al.* 2011) suggesting that this bacterial family is a component of a healthy microbiota. Furthermore, this bacterial family has already been specifically found in the gill mucus microbiota of *Boops boops* species (Scheifler *et al.* 2022). It is unlikely that individuals caught at different times and in different locations 3 years apart exhibit the same signs of infection. This suggests that this family of bacteria is specifically associated with the

gill mucus of *Boops boops* and could play a role in protecting them from the monogenean *Lamellodiscus*.

Interestingly, a recent study has identified another bacterial family, usually associated with low-oxygen habitats, enriched in the mucus of butterflyfish species that is known to never be parasitized by monogenean from the family Dactylogyridea (Reverter *et al.* 2020). The authors have suggested that this species might display lower oxygen contents around the gills because *Fusobacteria* could enhance mucus production through butyrate production. They also found a positive correlation between *Fusobacteria* and three hemoglobin-derived peptides, which could play a role as antiparasitic. This increase in gill mucus thickness could lead to higher hemoglobin levels, which could be cleaved by microbial protease (including *Fusobacteria*) and produce a Hb sub-unit with a putative protective role against Dactylogyridea. Scheifler *et al.* (2022) identified a higher abundance of *Fusobacteria* in the microbiota from the gill mucus of *Boops boops* compared to other sparid species, and hypothesized that as in butterflyfish it might play a role in preventing monogenean infection in this species. However, neither *Fusobacteria* nor hemoglobin derived-peptides were specifically enriched in the gill mucus of *B. boops* in the present study, suggesting that at least the presence de *Fusobacteria* alone is not sufficient to confer resistance against *Lamellodiscus* monogeneans.

The presence of anaerobic bacteria in the gill mucus of *Boops boops* suggests that its external mucus is particularly thick or dense, impeding efficient oxygen diffusion and potentially serving as a physical barrier. Such strategy has already been seen in parrotfish that protect themselves against larval gnathiid isopod parasites through the production of a mucus cocoon during the night (Grutter *et al.* 2011). Shothorn sculpins have been described to harbor higher parasitic infection levels when the size of skin mucous cells was smaller (Dang *et al.* 2019). These findings suggest that one part of the protection of fish against parasites resides in rheological properties of their external mucus or density in mucous cells but further investigations are needed to confirm this is a strategy developed by *B. boops* against infestation by *Lamellodiscus*. In rainbow trout, a higher density of mucous cells is significantly correlated with lower *Gyrodactylus derjavini* infestation intensity and the authors suggest that an increase in mucous cells in less-infected areas is associated with an increase in immune chemical factors released by these cells to fight monogeneans (Buchmann & Bresciani 1997). The protection of *Boops boops* could also be due to the particular chemical composition of its external mucus, as we observed that the factor parasitism significantly influences the chemical

composition of the external gill and skin mucus of sparids. These differences could be due to molecules with antiparasitic activity in the external mucus of non-parasitized fish. For example, *Amphiprion clarkii* mucus showed an apparent antiparasitic activity against *Cryptocaryon irritans* theront (Wang *et al.* 2019). Similarly, piscidin-2 peptides found in high concentrations in healthy striped bass gill mucus are active *in vitro* against *Ichthyophthirius multifiliis* parasite (Colorni *et al.* 2008). Another study showed an increasing expression of antimicrobial peptides homologous to Hb β in the gill epithelium of channel catfish challenge with *Ichthyophthirius multifiliis* (Ullal *et al.* 2008) and an *in vitro* killing effect on the trophont stage of the dinoflagellate ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Ullal & Noga 2010).

However, in *Boops boops* gill and skin mucus only few molecules were successfully annotated. In gill mucus, the majority of annotated metabolites belong to the hydroxy poly-unsaturated fatty acid family and were annotated as eicosanoid compounds. Eicosanoids are fatty acid-derived bioactive lipids (Dyall *et al.* 2022) that are mediators in the innate immune system in fish and can modulate inflammatory processes (Arts & Kohler 2009). Surprisingly, these molecules are often found after parasite infestation or wound healing as modulators of inflammation (Arts & Kohler 2009). Indeed, when the epithelium is penetrated, for example by the attachment system of monogeneans (Ilgová *et al.* 2021), inflammation occurs due to the release of cytokines and eicosanoids by the injured cells (Arts & Kohler 2009). Therefore, this compound is expected to be found in parasitized fish following their infestations, like what Konzcal *et al.* (2020) suggested in the guppies following infection with the monogenean *Gyrodactylus bullatarudis*. They observed an upregulation of the genes coding the enzymes catalyzing the synthesis of eicosanoids, presumably to promote wound healing caused by the monogenean. Several hypotheses can be proposed to explain why never parasitized fish exhibit elevated concentrations of eicosanoids in their gills that are not linked to monogenean infestations. Firstly, since *Boops boops* individuals are gregarious and were all caught at the same time and location, the elevated concentrations of eicosanoids could be due to a contagious illness within the fish school, leading to the activation of their innate immune system, which is the primary immunity pathway in fish (Arts & Kohler 2009). The production of eicosanoids could also be the result of a defense mechanism against the bromide compound found in high concentration in their gills and suspected to be a contaminant. Indeed, exposure to brominated compounds in the environment has already been described as toxic to fish, with histological impacts particularly in gills (Barja-Fernández *et al.* 2013),

which could potentially trigger immune effectors with the production of eicosanoids. However, bromoacrylic acid has already been described naturally associated with the metabolome of the red algae *Asparagopsis taxiformis* that could be found in the Mediterranean Sea (Woolard *et al.* 1979), so the exogenous nature of this compound is uncertain, and future investigations are needed to confirm its origin.

The techniques that we used to analyse the chemical composition of the mucus constrained the type of molecules that could be detected. We focused on small molecular weight and medium-polarity molecules, and the molecules involved in the host-monogenean interactions likely include other types of molecules such as proteins, sugars, or carbohydrates. For example, Sato *et al.* (2023) have recently observed that the carbohydrate L-fucoside triggers *in vitro* detachment of the monogenean *Heterobothrium okamotoi* from the gills of a non-specific host, *Takifugu niphobles*, and observed no L-fucoside on the mucous cells of its specific host *T. rubripes*. Fucosylated proteins covering the surface of non-host gills were suggested to contribute to the detachment of *H. okamotoi*. So, other chemical analyses such as nuclear magnetic resonance could be used to detect other types of compounds with potential protective functions in the external mucus of *Boops boops*.

The presence of attractant or recognition molecules in the mucus of parasitized fish and not in never-parasitized ones could also explain the metabolome variations observed. Some fish pathogens such as parasites exhibit positive chemotaxis toward cues emitted by their host mucus (Kearn 1967; Kallert *et al.* 2011; Brooker *et al.* 2013) and the host mucus could be recognized by parasites and trigger their attachment. For example, Ohashi *et al.* (2007) showed that the skin mucus from tiger pufferfish induced the attachment of the larvae of the monogenean *Neobenedia girellae* via the glycoprotein WAP65-2. *Heterobothrium okamotoi* has also been observed to recognize its tiger pufferfish host (*T. rubripes*) via mucosal IgM antibody (Igarashi *et al.* 2017). Thus, *Lamellodiscus* monogeneans may recognize their sparid host through mucus molecules that may be absent in *Boops boops* species. However, differences in fish mucus chemical composition could be due to the presence of parasites in parasitized fish that could either modulate the production of certain mucus molecules linked to the fish physiological response to parasitism (e.g., immune relative compounds) (Ilgová *et al.* 2021) or by producing molecules to favor their establishment and circumvent the host immune response (Shao *et al.* 2019). So, in the external mucus of parasitized fish, it could be

challenging to decipher which metabolites are produced by whom and their exact role in host-parasite interaction.

Finally, parallel studies involving the species *Dentex dentex* alongside *B. boops* could offer insights into potentially protective molecules shared between these two species, both of which are never parasitized by *Lamellodiscus*. By including the metabolome of *Dentex dentex*, we may overcome the species-specific factors, potentially addressing the absence of molecules linked to parasitism observed in this study, where only the species *B. boops* was considered under the NP category.

Références

- Albaladejo-Riad, N., Espinosa-Ruiz, C., Esteban, M.Á., & Lazado, C.C., 2023. Skin mucus metabolomics provides insights into the interplay between diet and wound in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 134, 108590.
- Amine, F., Euzet, L., & Kechemir-Issad, N., 2006. Description de deux nouvelles espèces de *Lamellodiscus* Johnston & Tiegs, 1922 (Monogenea: Diplectanidae) du groupe morphologique 'ignoratus', parasites de *Diplodus sargus* et *D. vulgaris* (Teleostei: Sparidae). *Systematic Parasitology*, 64 (1), 37–45.
- Amine, F., Euzet, L., & Kechemir-Issad, N., 2007. *Lamellodiscus theroni* sp. nov. (Monogenea, Diplectanidae), a gill parasite from *Diplodus puntazzo* (Teleostei, Sparidae) from the Mediterranean Sea. *Acta Parasitologica*, 52 (4), 305–309.
- Apprill, A., Miller, C.A., Van Cise, A.M., U'Ren, J.M., Leslie, M.S., Weber, L., Baird, R.W., Robbins, J., Landry, S., Bogomolni, A., & Waring, G., 2020. Marine mammal skin microbiotas are influenced by host phylogeny. *Royal Society Open Science*, 7 (5), 192046.
- Apprill, A., Mooney, T.A., Lyman, E., Stimpert, A.K., & Rappé, M.S., 2011. Humpback whales harbour a combination of specific and variable skin bacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 3 (2), 223–232.
- Arts, M. & Kohler, C., 2009. Health and condition in fish: The influence of lipids on membrane competency and immune response. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*. 237–256.
- Barja-Fernández, S., Míguez, J.M., & Álvarez-Otero, R., 2013. Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 60–68.
- Bhatnagar, A., Kumari, S., & Tyor, A.K., 2023. Assessment of bactericidal role of epidermal mucus of *Heteropneustes fossilis* and *Clarias batrachus* (Asian cat fishes) against pathogenic microbial strains. *Aquaculture and Fisheries*, 8 (1), 50–58.
- Boudaya, L., Neifar, L., & Euzet, L., 2009. Diplectanid parasites of *Lithognathus mormyrus* (L.) (Teleostei: Sparidae) from the Mediterranean Sea, with the description of *Lamellodiscus flagellatus* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae). *Systematic Parasitology*, 74 (2), 149–159.
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C., & Derôme, N., 2013. Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. *PLoS One*, 8 (12), e84772.
- Brooker, A.J., Shinn, A.P., Souissi, S., & Bron, J.E., 2013. Role of kairomones in host location of the pennellid copepod parasite, *Lernaeocera branchialis* (L. 1767). *Parasitology*, 140 (6), 756–770.
- Buchmann, K. & Bresciani, J., 1997. Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitology Research*, 84 (1), 17–24.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., & Holmes, S.P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11 (12), 2639–2643.

- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., & Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7 (5), 335–336.
- Chiarello, M., Auguet, J.-C., Bettarel, Y., Bouvier, C., Claverie, T., Graham, N.A.J., 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 (1), 147.
- Chiarello, M., Villéger, S., Bouvier, C., Bettarel, Y., & Bouvier, T., 2015. High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiology Ecology*, 91 (7), fiv061.
- Colorni, A., Ullal, A., Heinisch, G., & Noga, E.J., 2008. Activity of the antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites. *Journal of Fish Diseases*, 31 (6), 423–432.
- Damiani, T., Heuckeroth, S., Smirnov, A., Mokshyna, O., Brungs, C., Korf, A., Smith, J., Stincone, P., Dreolin, N., Nothias, L.-F., Hyötyläinen, T., Orešič, M., Karst, U., Dorrestein, P., Petras, D., Du, X., Hooft, J. van der, Schmid, R., & Pluskal, T., 2023. Mass spectrometry data processing in MZmine 3: feature detection and annotation.
- Dang, M., Pittman, K., Bach, L., Sonne, C., Hansson, S.V., Søndergaard, J., Stride, M., & Nowak, B., 2019. Mucous cell responses to contaminants and parasites in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*) from a former lead-zinc mine in West Greenland. *Science of The Total Environment*, 678, 207–216.
- Dash, S., Das, S.K., Samal, J., & Thatoi, H.N., 2018. Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19 (2), 72–81.
- Desdevises, Y., 2001. The phylogenetic position of *Furnestinia echeneis* (Monogenea, Diplectanidae) based on molecular data: a case of morphological adaptation? *International Journal for Parasitology*, 31 (2), 205–208.
- Diamanka, A., Boudaya, L., Toguebaye, B.S., & Pariselle, A., 2011. *Lamellodiscus euzeti* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae), a parasite from *Dentex canariensis* and *D. gibbosus* (Teleostei: Sparidae) in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Parasite : journal de la Société Française de Parasitologie*, 18 (2), 145–150.
- Díaz-Puertas, R., Adamek, M., Mallavia, R., & Falco, A., 2023. Fish Skin Mucus Extracts: An Underexplored Source of Antimicrobial Agents. *Marine Drugs*, 21 (6), 350.
- Dodd, E.T., Pierce, M.L., Lee, J.S.F., & Poretzky, R.S., 2020. Influences of claywater and greenwater on the skin microbiome of cultured larval sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Animal Microbiome*, 2 (1), 27.
- Ducklow, H. & Kirchman, D., 2000. *Bacterial Production and Biomass in the Oceans*. Microbial Ecology of the Oceans.
- Dyall, S.C., Balas, L., Bazan, N.G., Brenna, J.T., Chiang, N., da Costa Souza, F., Dalli, J., Durand, T., Galano, J.-M., Lein, P.J., Serhan, C.N., & Taha, A.Y., 2022. Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-

- derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. *Progress in Lipid Research*, 86, 101165.
- Ekman, D.R., Evich, M.G., Mosley, J.D., Doering, J.A., Fay, K.A., Ankley, G.T., & Collette, T.W., 2023. Expanding non-invasive approaches for fish-health monitoring: A survey of the epidermal mucous metabolomes of phylogenetically diverse freshwater fish species. *Journal of Fish Biology*, 103 (5), 1178–1189.
- Ekman, D.R., Skelton, D.M., Davis, J.M., Villeneuve, D.L., Cavallin, J.E., Schroeder, A., Jensen, K.M., Ankley, G.T., & Collette, T.W., 2015. Metabolite Profiling of Fish Skin Mucus: A Novel Approach for Minimally-Invasive Environmental Exposure Monitoring and Surveillance. *Environmental Science & Technology*, 49 (5), 3091–3100.
- Euzet, L., 1984. [Diplectanidae (Monogenea) parasites of fish of the Kerkennah Islands (Tunisia)]. *Archives De l'Institut Pasteur De Tunis*, 61 (4), 463–474.
- Euzet, L. & Oliver, G., 1966. Diplectanidae (Monogenea) des teleosteens de la Mediterranee occidentale. 3. Quelques Lamellogadus Johnston et Tiegs, 1922, parasites de poissons du genre Diplodus (Sparidae). *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 41 (6), 573–98.
- Euzet, L. & Oliver, G., 1967. Diplectanidae (Monogenea) de Téléostéens de la Méditerranée occidentale. IV. Quelques Lamellogadus Johnston et Tiegs, 1922, parasites de poissons du genre Pagellus Cuvier, 1829 (Sparidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 42(4), 407–25.
- Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Viscor, G., Gisbert, E., Herrera, M., & Ibarz, A., 2018. Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A valuable non-invasive method to study teleost marine species. *Science of The Total Environment*, 644, 1323–1335.
- Fuochi, V., Li Volti, G., Camiolo, G., Tiralongo, F., Giallongo, C., Distefano, A., Petronio Petronio, G., Barbagallo, I., Viola, M., Furneri, P.M., Di Rosa, M., Avola, R., & Tibullo, D., 2017. Antimicrobial and Anti-Proliferative Effects of Skin Mucus Derived from *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). *Marine Drugs*, 15 (11), 342.
- Giacomini, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.-F., Jacob, D., Goulitquer, S., Thévenot, E.A., & Caron, C., 2015. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31 (9), 1493–1495.
- Godoy-Vitorino, F., Rodriguez-Hilario, A., Alves, A.L., Gonçalves, F., Cabrera-Colon, B., Mesquita, C.S., Soares-Castro, P., Ferreira, M., Marçalo, A., Vingada, J., Eira, C., & Santos, P.M., 2017. The microbiome of a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in Portugal. *Research in Microbiology*, 168 (1), 85–93.
- Grutter, A.S., Rumney, J.G., Sinclair-Taylor, T., Waldie, P., & Franklin, C.E., 2011. Fish mucous cocoons: the 'mosquito nets' of the sea. *Biology Letters*, 7 (2), 292–294.
- Guitton, Y., Tremblay-Franco, M., Le Corguillé, G., Martin, J.-F., Pétéra, M., Roger-Mele, P., Delabrière, A., Goulitquer, S., Monsoor, M., Duperier, C., Canlet, C., Servien, R., Tardivel, P., Caron, C., Giacomini, F., & Thévenot, E.A., 2017. Create, run, share, publish, and reference your LC-MS, FIA-MS, GC-MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0

- Galaxy online infrastructure for metabolomics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 93, 89–101.
- Guivier, E., Pech, N., Chappaz, R., & Gilles, A., 2020. Microbiota associated with the skin, gills, and gut of the fish *Parachondrostoma toxostoma* from the Rhône basin. *Freshwater Biology*.
- Hall, M. & Beiko, R.G., 2018. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. In: R.G. Beiko, W. Hsiao, and J. Parkinson, eds. *Microbiome Analysis*. New York, NY: Springer New York, 113–129.
- Heim, S., Teav, T., Gallart-Ayala, H., Ivanisevic, J., & Salamin, N., 2023. Divergence in metabolomic profile in clownfish and damselfish skin mucus. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11.
- Hellio, C., Pons, A.M., Beaupoil, C., Bourgougnon, N., & Gal, Y.L., 2002. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20 (3), 214–219.
- Horlick, J., Booth, M.A., & Tetu, S.G., 2020. Alternative dietary protein and water temperature influence the skin and gut microbial communities of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *PeerJ*, 8, e8705.
- Huang, P.-C., Liu, T.-Y., Hu, M.Y., Casties, I., & Tseng, Y.-C., 2020. Energy and nitrogenous waste from glutamate/glutamine catabolism facilitates acute osmotic adjustment in non-neuroectodermal branchial cells. *Scientific Reports*, 10 (1), 9460.
- Huang, Z.-H., Ma, A.-J., & Wang, X.-A., 2011. The immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), skin to high water temperature. *Journal of Fish Diseases*, 34 (8), 619–627.
- Hussain, A. & Sachan, S.G., 2023. Fish Epidermal Mucus as a Source of Diverse Therapeutical Compounds. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 29 (3), 36.
- Igarashi, K., Matsunaga, R., Hirakawa, S., Hosoya, S., Suetake, H., Kikuchi, K., Suzuki, Y., Nakamura, O., Miyadai, T., Tasumi, S., & Tsutsui, S., 2017. Mucosal IgM Antibody with D-Mannose Affinity in Fugu *Takifugu rubripes* Is Utilized by a Monogenean Parasite *Heterobothrium okamotoi* for Host Recognition. *The Journal of Immunology*, 198 (10), 4107–4114.
- Ilgová, J., Salát, J., & Kašný, M., 2021. Molecular communication between the monogenea and fish immune system. *Fish & Shellfish Immunology*, 112, 179–190.
- Ivanova, L., Rangel-Huerta, O.D., Tartor, H., Gjessing, M.C., Dahle, M.K., & Uhlig, S., 2021. Fish Skin and Gill Mucus: A Source of Metabolites for Non-Invasive Health Monitoring and Research. *Metabolites*, 12 (1), 28.
- Johnson, W.R., Torralba, M., Fair, P.A., Bossart, G.D., Nelson, K.E., & Morris, P.J., 2009. Novel diversity of bacterial communities associated with bottlenose dolphin upper respiratory tracts. *Environmental Microbiology Reports*, 1 (6), 555–562.
- Kallert, D.M., Bauer, W., Haas, W., & El-Matbouli, M., 2011. No shot in the dark: Myxozoans chemically detect fresh fish. *International Journal for Parasitology*, 41 (3–4), 271–276.
- Kapetanović, D., Kurtović, B., Vardić, I., Valić, D., Teskeredžić, Z., & Teskeredžić, E., 2006. Preliminary studies on bacterial diversity of cultured bluefin tuna *Thunnus thynnus* from the Adriatic Sea. *Aquaculture Research*, 37 (12), 1265–1266.

- Kashinskaya, E.N., Simonov, E.P., Andree, K.B., Vlasenko, P.G., Polenogova, O.V., Kiriukhin, B.A., & Solovyev, M.M., 2021. Microbial community structure in a host–parasite system: the case of Prussian carp and its parasitic crustaceans. *Journal of Applied Microbiology*, 131 (4), 1722–1741.
- Kearn, G.C., 1967. Experiments on host-finding and host-specificity in the monogenean skin parasite *Entobdella soleae*. *Parasitology*, 57 (3), 585–605.
- Kelly, C. & Salinas, I., 2017. Under Pressure: Interactions between Commensal Microbiota and the Teleost Immune System. *Frontiers in Immunology*, 8, 559.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41 (1), e1–e1.
- Konczal, M., Ellison, A.R., Phillips, K.P., Radwan, J., Mohammed, R.S., Cable, J., & Chadzinska, M., 2020. RNA-Seq analysis of the guppy immune response against *Gyrodactylus bullatarudis* infection. *Parasite Immunology*, 42 (12), e12782.
- Kumari, S. & Yadav, S., 2020. Study of Antifungal Activity of Epidermal Mucus of Three Fresh Water Fishes. *Annals of Biology*, 36, 75–80.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S.A., & Arias, C.R., 2013. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiology Ecology*, 85 (3), 483–494.
- Lee, Y.K. & Mazmanian, S.K., 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science (New York, N.Y.)*, 330 (6012), 1768–1773.
- Li, S., Liao, J., Liu, X., Zhang, L., Luo, Z., Zhang, H., & Cao, X., 2023. Difference analysis of respiratory pore flora between dolphins in the wild and in captivity. *Animal Biology*, 73, 1–15.
- Lima, N., Rogers, T., Acevedo-Whitehouse, K., & Brown, M.V., 2012. Temporal stability and species specificity in bacteria associated with the bottlenose dolphins respiratory system. *Environmental Microbiology Reports*, 4 (1), 89–96.
- Lowrey, L., Woodhams, D.C., Tacchi, L., & Salinas, I., 2015. Topographical Mapping of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Microbiome Reveals a Diverse Bacterial Community with Antifungal Properties in the Skin. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (19), 6915–6925.
- McMurdie, P.J. & Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8 (4), e61217.
- Minich, J.J., Petrus, S., Michael, J.D., Michael, T.P., Knight, R., & Allen, E.E., 2020. Temporal, Environmental, and Biological Drivers of the Mucosal Microbiome in a Wild Marine Fish, *Scomber japonicus*. *mSphere*, 5 (3), e00401-20.
- Neifar, 1995. Contribution à l'étude de la biodiversité des monogènes parasites de poissons du secteur nord-est de la Tunisie. *Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies. Université de Tunis*.
- Ohashi, H., Umeda, N., Hirazawa, N., Ozaki, Y., Miura, C., & Miura, T., 2007. Purification and

- identification of a glycoprotein that induces the attachment of oncomiracidia of *Neobenedenia girellae* (Monogenea, Capsalidae). *International Journal for Parasitology*, 37 (13), 1483–1490.
- Oliver, G., 1973. *Lamellogobius obelae* n. sp. une nouvelle espèce de Diplectanidae (Monogenea, Monopisthocotylea) parasite de *Pagellus centrodontus* (Delaroche, 1809) (Pisces, Sparidae). *Z F Parasitenkunde*, 41, 103–108.
- Oliver, G., 1974. Nouveaux aspects du parasitisme des Diplectanidae Bychowsky, 1957 (Monogenea, Monopisthocotylea) chez les Téléostéens Perciformes des côtes de France. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 279, 803–5.
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., Morais, D., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P.-É., Li, S., & Xia, J. (Jeff), 2021. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic acids research*, 49.
- Pirotta, V., Smith, A., Ostrowski, M., Russell, D., Jonsen, I.D., Grech, A., & Harcourt, R., 2017. An Economical Custom-Built Drone for Assessing Whale Health. *Frontiers in Marine Science*, 4.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41 (D1), D590–D596.
- Reverter, M., Sasal, P., Banaigs, B., Lecchini, D., Lecellier, G., & Tapissier-Bontemps, N., 2017. Fish mucus metabolome reveals fish life-history traits. *Coral Reefs*, 36 (2), 463–475.
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P., 2018. Biological and Ecological Roles of External Fish Mucus: A Review. *Fishes*, 3 (4), 41.
- Reverter, M., Sasal, P., Suzuki, M.T., Raviglione, D., Inguibert, N., Pare, A., Banaigs, B., Voisin, S.N., Bulet, P., & Tapissier-Bontemps, N., 2020. Insights into the Natural Defenses of a Coral Reef Fish Against Gill Ectoparasites: Integrated Metabolome and Microbiome Approach. *Metabolites*, 10 (6), 227.
- Rosado, D., Pérez-Losada, M., Pereira, A., Severino, R., & Xavier, R., 2021. Effects of aging on the skin and gill microbiota of farmed seabass and seabream. *Animal Microbiome*, 3 (1), 10.
- Sadeghi, J., Chaganti, S.R., Johnson, T.B., & Heath, D.D., 2023. Host species and habitat shape fish-associated bacterial communities: phyllosymbiosis between fish and their microbiome. *Microbiome*, 11 (1), 258.
- Salinas, I., 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*, 4 (3), 525–539.
- San Filippo, 1978. Microhabitat des Monogènes Dactylogyroidea parasites branchiaux de Téléostéens Mugilidae et Sparidae. *Thèse d'Etat: Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier*.
- Sanchez, L.M., Wong, W.R., Riener, R.M., Schulze, C.J., & Lington, R.G., 2012. Examining the Fish Microbiome: Vertebrate-Derived Bacteria as an Environmental Niche for the Discovery of Unique Marine Natural Products. *PLoS ONE*, 7 (5), e35398.
- Sato, Y., Matsunaga, R., Tasumi, S., Mizuno, N., Nakane, M., Hosoya, S., Yamamoto, A., Nakamura, O., Tsutsui, S., Shiozaki, K., & Kikuchi, K., 2023. I-fucoside localization in the gills of the genus *Takifugu* and its possible implication in the parasitism of *Heterobothrium okamotoi*

- (Monogenea: Diclidophoridae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1867 (12), 130467.
- Scheifler, M., Magnanou, E., Sanchez-Brosseau, S., & Desdevises, Y., 2023. Host-microbiota-parasite interactions in two wild sparid fish species, *Diplodus annularis* and *Oblada melanura* (Teleostei, Sparidae) over a year: a pilot study. *BMC Microbiology*, 23 (1), 340.
- Scheifler, M., Sanchez-Brosseau, S., Magnanou, E., & Desdevises, Y., 2022. Diversity and structure of sparids external microbiota (Teleostei) and its link with monogenean ectoparasites. *Animal Microbiome*, 4 (1), 27.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., & Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12 (6), R60.
- Shao, S., Sun, X., Chen, Y., Zhan, B., & Zhu, X., 2019. Complement Evasion: An Effective Strategy That Parasites Utilize to Survive in the Host. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Sinclair, L., Osman, O.A., Bertilsson, S., & Eiler, A., 2015. Microbial Community Composition and Diversity via 16S rRNA Gene Amplicons: Evaluating the Illumina Platform. *PLOS ONE*, 10 (2), e0116955.
- Stevens, J.L., Jackson, R.L., & Olson, J.B., 2016. Bacteria associated with lionfish (*Pterois volitans/miles* complex) exhibit antibacterial activity against known fish pathogens. *Marine Ecology Progress Series*, 558, 167–180.
- Sylvain, F.-É., Holland, A., Bouslama, S., Audet-Gilbert, É., Lavoie, C., Val, A.L., & Derome, N., 2020. Fish Skin and Gut Microbiomes Show Contrasting Signatures of Host Species and Habitat. *Applied and Environmental Microbiology*, 86 (16), e00789-20.
- Takeuchi, M., Fujiwara-Nagata, E., Katayama, T., & Suetake, H., 2021. Skin bacteria of rainbow trout antagonistic to the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Scientific Reports*, 11 (1), 7518.
- Ullal, A.J. & Noga, E.J., 2010. Antiparasitic activity of the antimicrobial peptide Hb β P-1, a member of the β -haemoglobin peptide family. *Journal of Fish Diseases*, 33 (8), 657–664.
- Ullal, A.J., Wayne Litaker, R., & Noga, E.J., 2008. Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). *Developmental & Comparative Immunology*, 32 (11), 1301–1312.
- Van Kessel, M.A.H.J., Mesman, R.J., Arshad, A., Metz, J.R., Spanings, F.A.T., Van Dalen, S.C.M., Van Niftrik, L., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., Jetten, M.S.M., Klaren, P.H.M., & Op Den Camp, H.J.M., 2016. Branchial nitrogen cycle symbionts can remove ammonia in fish gills. *Environmental Microbiology Reports*, 8 (5), 590–594.
- Wang, H., Tang, W., Zhang, R., & Ding, S., 2019. Analysis of enzyme activity, antibacterial activity, antiparasitic activity and physico-chemical stability of skin mucus derived from *Amphiprion clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 653–661.
- Woolard, F.X., Moore, R.E., & Roller, P.P., 1979. Halogenated acetic and acrylic acids from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. *Phytochemistry*, 18 (4), 617–620.

Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F.O., 2014. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42 (D1), D643–D648.

Supporting information

Table S2.1. Ecological traits of fish species tested in this study. NP, Never Parasitized; P, Parasitized

Figure S2.1. Relative abundance of bacterial phyla within gill and skin mucus of *Boops boops* (never parasitized fish, NP), *Pagellus acarne*, *Sparus aurata*, *Spicara maena* (parasitized fish, P)

Table S2.2. Number of features retrieved at each step of the metabolomic analysis in skin and gill mucus and in both ionization mode

Figure S2.2. Comparison of alpha diversity values between gill and skin mucus. Faith’s phylogenetic diversity and Shannon diversity index for skin mucus and gill mucus. Significant differences (*) between tissues are indicated

Figure S2.3. Comparison of alpha diversity values between species. (A) Faith’s phylogenetic diversity and Shannon diversity index for Pelagic fish (light blue), Sea-bottom fish (grey) within gill and skin mucus. (B) Faith’s phylogenetic diversity and Shannon diversity index for fish caught in Argelès (purple) and in Banyuls (dark green) within gill and skin mucus. Significant (a) differences between species are indicated (if p -value > 0.05; KW test and ANOVA)

Table S2.3. Significant (bold) and non-significant pairwise comparisons between fish species bacterial communities (Bray-Curtis dissimilarities) and metabolomes (Euclidean distances) within gill and skin mucus. Based on Pairwise PERMANOVAs, non-significant if $p > 0.05$

Figure S2.4. PCoA plots based on dissimilarities between bacterial communities of *Diplodus annularis* using Bray-Curtis (A) and weighted Unifrac (B) dissimilarities. Symbol shape indicates the type of tissue, gill mucus (circle), skin mucus (triangle), and color refers to species, *Boops boops* (red), *Pagellus acarne* (green), *Sparus aurata* (dark green), and *Spicara maena* (blue)

Figure S2.5. Comparison of alpha diversity values between NP and P fish. Faith’s phylogenetic diversity and Shannon diversity index for never-parasitized fish (red) and parasitized fish (green) in gill and skin mucus

Figure S2.6. Score plot of Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) of NP (red) and P (green) fish external mucus metabolome profiles obtained in negative ionization mode (A-B) and in positive ionization mode (C-D)

Table S2.4. Putatively annotated metabolites that were significantly different in gill mucus collected from parasitized and never parasitized fish (negative ionization mode)

Table S2.5. Putatively annotated metabolites that were significantly different in skin mucus collected from parasitized and never parasitized fish (negative ionization mode)

Table S2.6. Putatively annotated metabolites that were significantly different in gill mucus collected from parasitized and never parasitized fish (positive ionization mode)

Table S2.7. Putatively annotated metabolites that were significantly different in skin mucus collected from parasitized and never parasitized fish (positive ionization mode)

Table S2.1: Ecological traits of fish species tested in this study. NP, Never Parasitized; P, Parasitized

Fish	Place of capture	Position in water column	Date	Parasitism
<i>Boops boops</i> 1	Argelès-sur-Mer	Semi-pelagic	December 2021	NP
<i>Boops boops</i> 2	Argelès-sur-Mer	Semi-pelagic	December 2021	NP
<i>Boops boops</i> 3	Argelès-sur-Mer	Semi-pelagic	December 2021	NP
<i>Boops boops</i> 4	Argelès-sur-Mer	Semi-pelagic	December 2021	NP
<i>Boops boops</i> 5	Argelès-sur-Mer	Semi-pelagic	December 2021	NP
<i>Boops boops</i> 6	Argelès-sur-Mer	Semi-pelagic	December 2021	NP
<i>Boops boops</i> 7	Argelès-sur-Mer	Semi-pelagic	December 2021	NP
<i>Sparus aurata</i> 1	Argelès-sur-Mer	Sea bottom	March 2022	P
<i>Sparus aurata</i> 2	Argelès-sur-Mer	Sea bottom	March 2022	P
<i>Sparus aurata</i> 3	Argelès-sur-Mer	Sea bottom	March 2022	P
<i>Spicara maena</i> 1	Banyuls-sur-Mer	Pelagic	March 2022	P
<i>Spicara maena</i> 2	Banyuls-sur-Mer	Pelagic	March 2022	P
<i>Spicara maena</i> 3	Banyuls-sur-Mer	Pelagic	March 2022	P
<i>Spicara maena</i> 4	Banyuls-sur-Mer	Pelagic	March 2022	P
<i>Spicara maena</i> 5	Banyuls-sur-Mer	Pelagic	March 2022	P
<i>Spicara maena</i> 6	Banyuls-sur-Mer	Pelagic	March 2022	P
<i>Spicara maena</i> 7	Banyuls-sur-Mer	Pelagic	March 2022	P
<i>Pagellus acarne</i> 1	Banyuls-sur-Mer	Sea bottom	March 2022	P
<i>Pagellus acarne</i> 2	Argelès-sur-Mer	Sea bottom	March 2022	P
<i>Pagellus acarne</i> 3	Argelès-sur-Mer	Sea bottom	March 2022	P
<i>Pagellus acarne</i> 4	Argelès-sur-Mer	Sea bottom	March 2022	P
<i>Pagellus acarne</i> 5	Argelès-sur-Mer	Sea bottom	March 2022	P

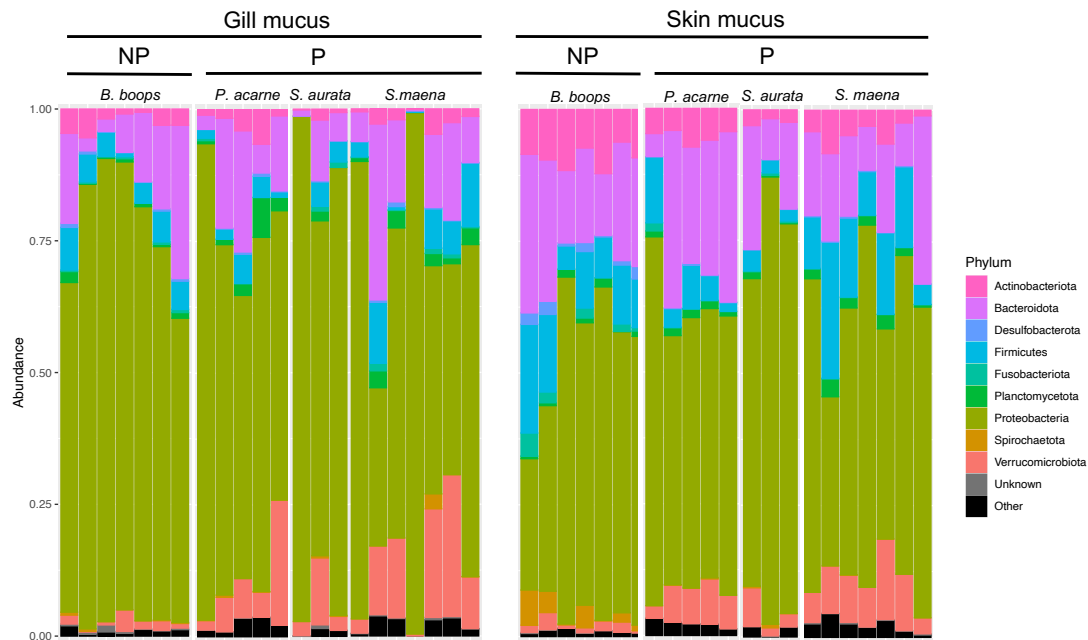


Figure S2.1: Relative abundance of bacterial phyla within gill and skin mucus of *Boops boops* (never parasitized fish, NP), *Pagellus acarne*, *Sparus aurata*, *Spicara maena* (parasitized fish, P)

Table S2.2: Number of features retrieved at each step of the metabolomic analysis in skin and gill mucus and in both ionization mode

	Initial matrix	VIP score selection	After manual filtering	Overexpressed in NP fish	Annotated
Gill mucus, negative ionization mode	363 features	118 features	43 features	30 features	11 metabolites
Skin mucus, negative ionization mode	361 features	117 features	53 features	15 features	9 metabolites
Gill mucus, positive ionization mode	703 features	110 features	47 features	30 features	10 metabolites
Skin mucus, positive ionization mode	694 features	105 features	46 features	16 features	10 metabolites

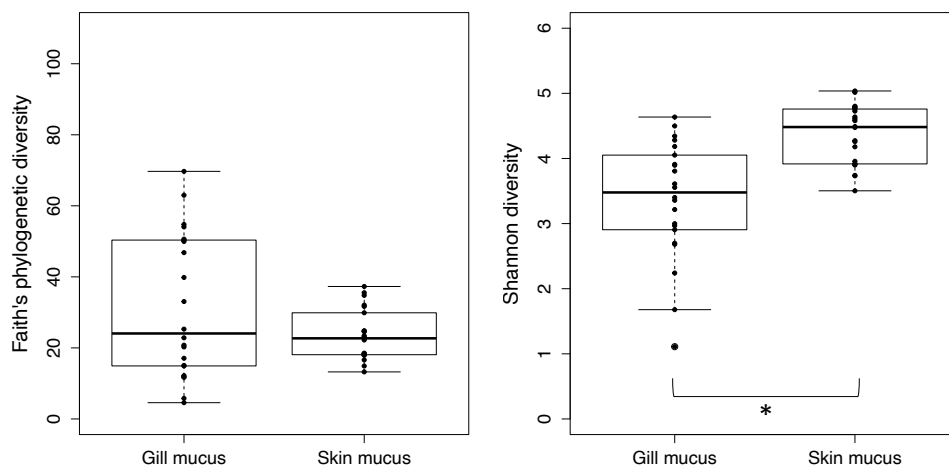


Figure S2.2: Comparison of alpha diversity values between gill and skin mucus. Faith's phylogenetic diversity and Shannon diversity index for skin mucus and gill mucus. Significant differences (*) between tissues are indicated

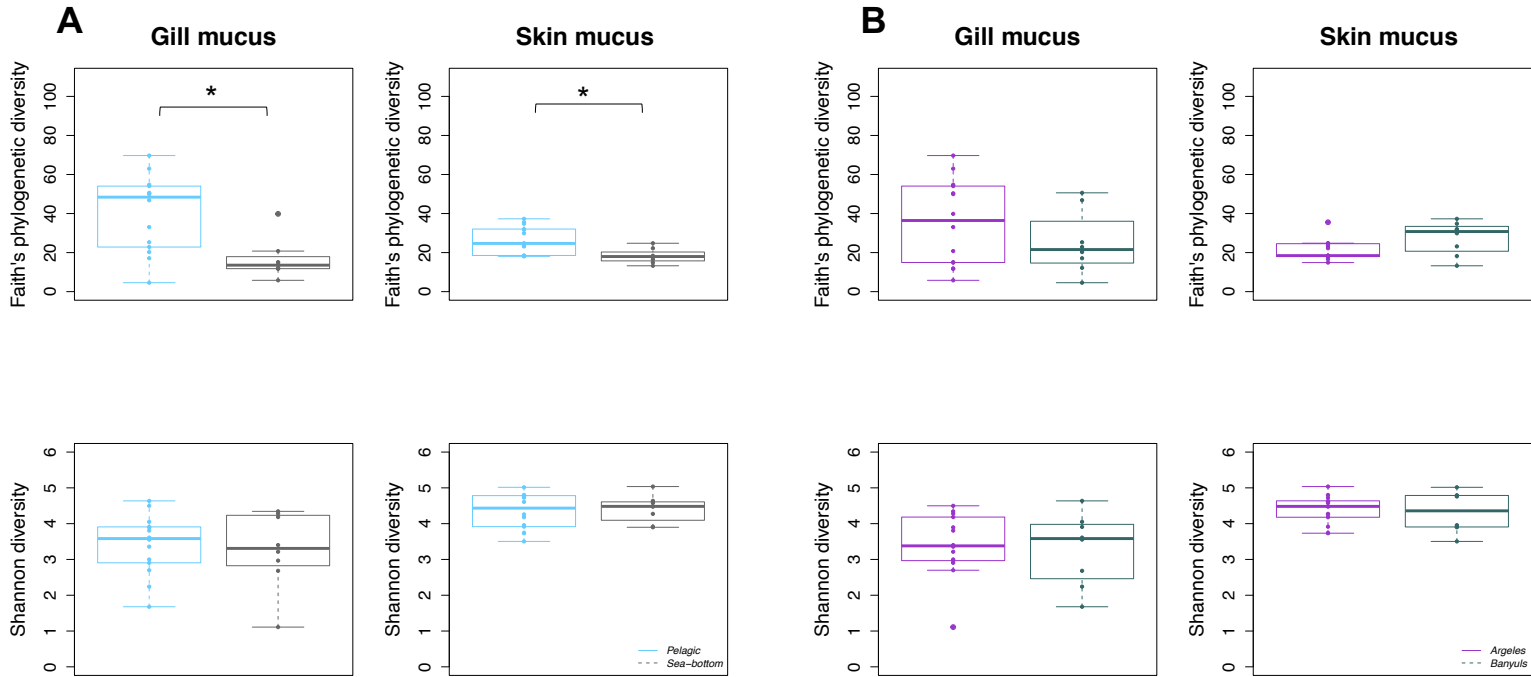


Figure S2.3: Comparison of alpha diversity values between species. (A) Faith's phylogenetic diversity and Shannon diversity index for Pelagic fish (light blue), Sea-bottom fish (grey) within gill and skin mucus. (B) Faith's phylogenetic diversity and Shannon diversity index for fish caught in Argelès (purple) and in Banyuls (dark green) within gill and skin mucus. Significant (a) differences between species are indicated (if p -value > 0.05; KW test and ANOVA)

Table S2.3: Significant (bold) and non-significant pairwise comparisons between fish species bacterial communities (Bray-Curtis) and metabolomes (Euclidean distances) within gill and skin mucus. Based on Pairwise PERMANOVAs, non-significant if $p > 0.05$

Gill mucus – Bray-Curtis

Associations	P-value
<i>Boops boops</i> vs <i>Sparus aurata</i>	0.058
<i>Boops boops</i> vs <i>Pagellus acarne</i>	0.008
<i>Boops boops</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.004
<i>Sparus aurata</i> vs <i>Pagellus acarne</i>	1
<i>Sparus aurata</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.200
<i>Pagellus acarne</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.229

Skin mucus – Bray-Curtis

Associations	P-value
<i>Boops boops</i> vs <i>Sparus aurata</i>	0.007
<i>Boops boops</i> vs <i>Pagellus acarne</i>	0.001
<i>Boops boops</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.001
<i>Sparus aurata</i> vs <i>Pagellus acarne</i>	0.143
<i>Sparus aurata</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.007
<i>Pagellus acarne</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.007

Gill mucus - Euclidean distances

Associations	Negative P-value	Positive P-value
<i>Boops boops</i> vs <i>Sparus aurata</i>	0.008	0.006
<i>Boops boops</i> vs <i>Pagellus acarne</i>	0.001	0.003
<i>Boops boops</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.001	0.001
<i>Sparus aurata</i> vs <i>Pagellus acarne</i>	0.135	0.130
<i>Sparus aurata</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.006	0.011
<i>Pagellus acarne</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.001	0.002

Skin mucus - Euclidean distances

Associations	Negative P-value	Positive P-value
<i>Boops boops</i> vs <i>Sparus aurata</i>	0.011	0.006
<i>Boops boops</i> vs <i>Pagellus acarne</i>	0.001	0.001
<i>Boops boops</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.001	0.002
<i>Sparus aurata</i> vs <i>Pagellus acarne</i>	0.037	0.067
<i>Sparus aurata</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.007	0.006
<i>Pagellus acarne</i> vs <i>Spicara maena</i>	0.001	0.002

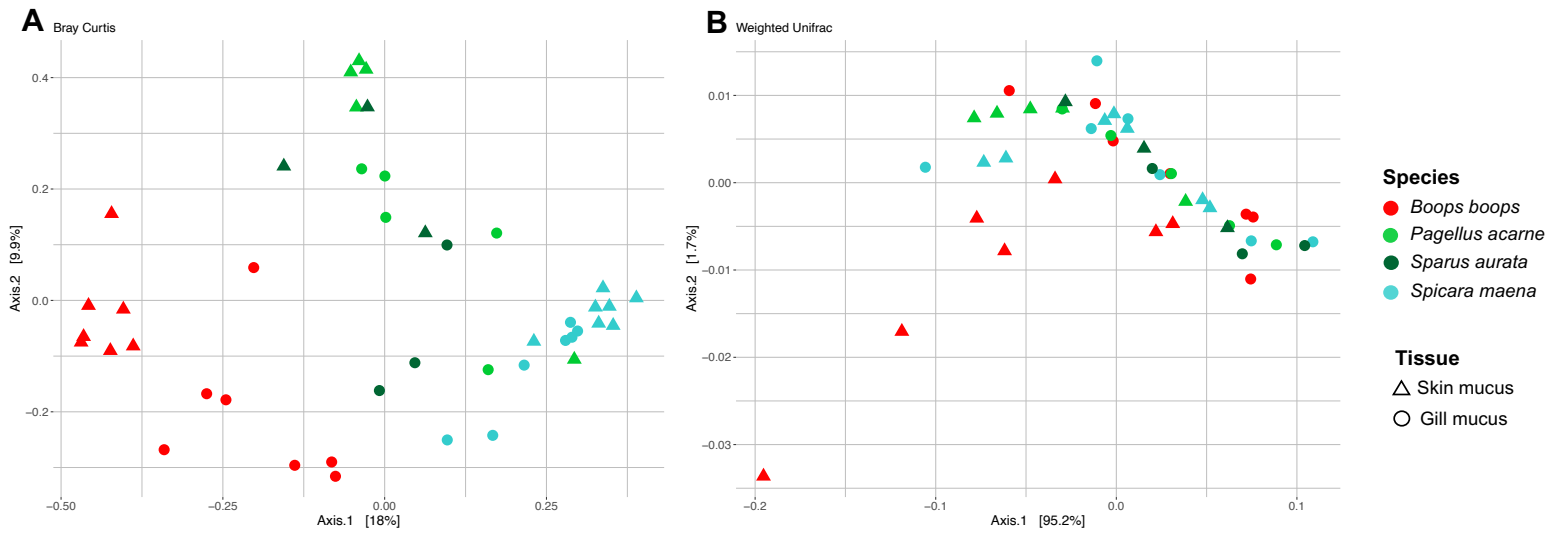


Figure S2.4: PCoA plots based on dissimilarities between bacterial communities of *Diplodus annularis* using Bray-Curtis (A) and weighted Unifrac (B) dissimilarities. Symbol shape indicates the type of tissue, gill mucus (circle), skin mucus (triangle), and color refers to species, *Boops boops* (red), *Pagellus acarne* (green), *Sparus aurata* (dark green), and *Spicara maena* (blue).

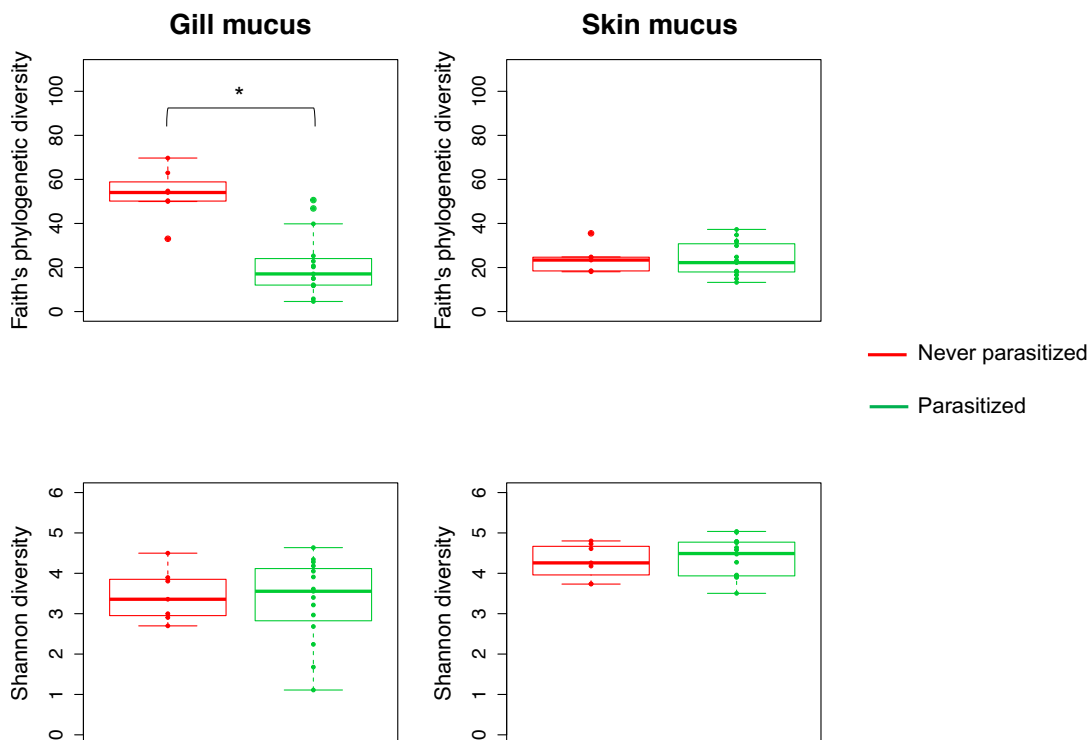


Figure S2.5: Comparison of alpha diversity values between NP and P fish. Faith's phylogenetic diversity and Shannon diversity index for never-parasitized fish (red) and parasitized fish (green) in gill and skin mucus.

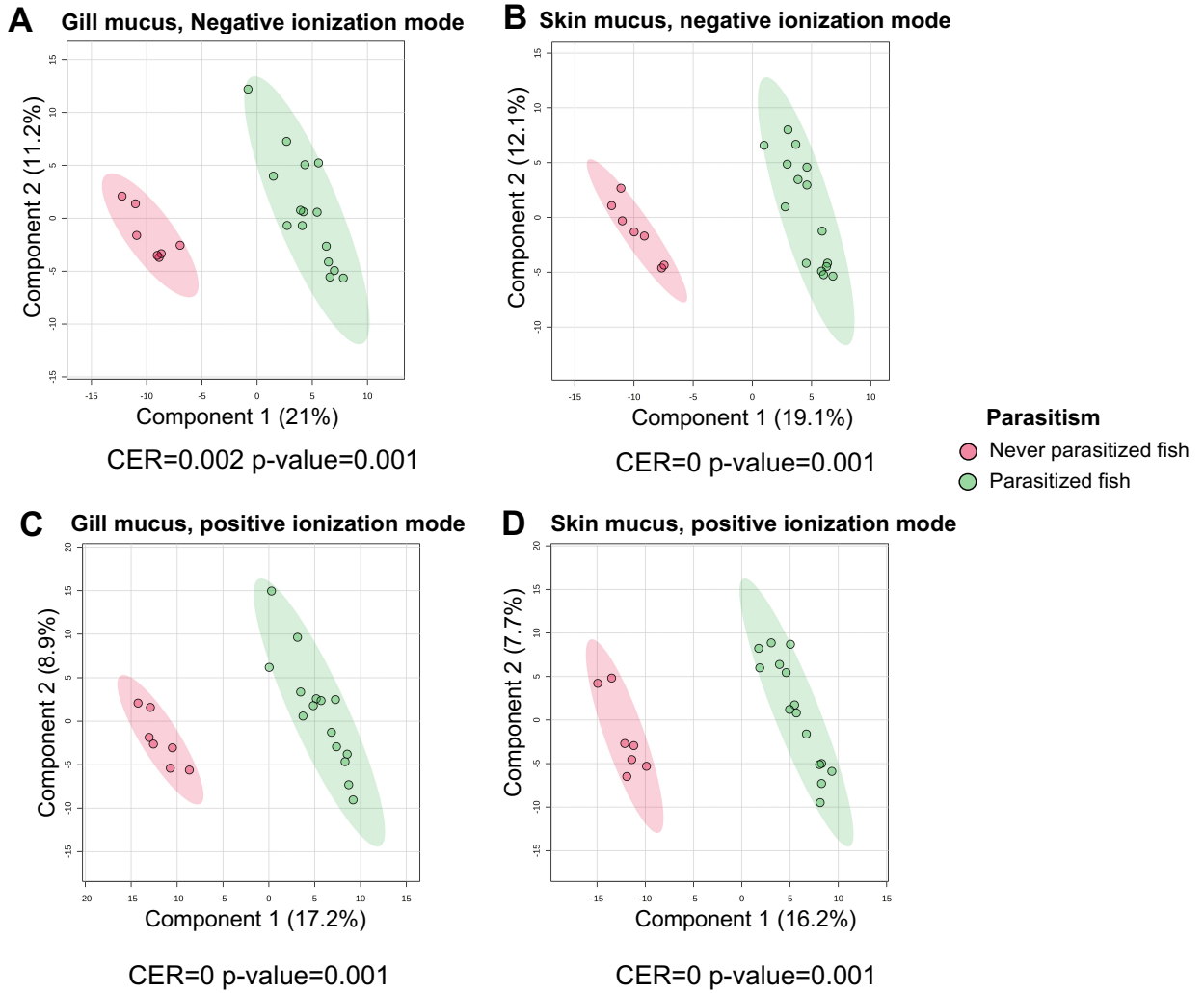


Figure S2.6: Score plot of Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) of NP (red) and P (green) fish external mucus metabolome profiles obtained in negative ionization mode (A-B) and in positive ionization mode (C-D).

Table S2.4: Putatively annotated metabolites that were significantly different in gill mucus collected from parasitized and never parasitized fish (negative ionization mode)

VIP code	VIP score	putative compound name	compound class	chemical family	RT (min.)	compound molecular formula	ion status	m/z measured	m/z calculated	mass error (ppm)	main explained MS2 fragments (SIRIUS)
M189T182	2.7	dihydroxynonanoic acid	hydroxy fatty acid	medium-chain hydroxy fatty acid	4.7	C ₉ H ₁₈ O ₄	[M-H] ⁻	189.1134	189.1132	1.06	171.1028, 143.1078, 129.0922, 99.0814, 58.9985
M149T94	2.6	3-bromopropenoic acid	aryl bromide	halogenated acrylic acid	1.9	C ₃ H ₃ BrO ₂	[M-H] ⁻	148.9245	148.9244	0.67	78.9185
M280T255	2.4			fatty acyl	4.3	C ₁₁ H ₂₃ NO ₅	[M-H] ⁻	280.1227	280.1224	1.07	236.0964, 166.0177, 154.0180, 136.0072, 124.0074, 111.0816
M351T461	2.3		eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	7.8	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	[M-H] ⁻	351.2544	351.2541	0.85	333.2437, 289.2537, 245.1908, 217.1600, 213.1500, 167.1444, 165.0918, 137.0607, 121.0121
M635T859	2.2		acetogenin	polyketide	14.4	C ₃₈ H ₆₈ O ₇	[M-H] ⁻	635.4895	635.4892	0.47	617.4821, 311.1858, 293.1762, 275.1653, 267.2694, 249.1863,
M297T447	3	hydroxy-octadecenoic acid	octadecanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	7.6	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	[M-H] ⁻	297.2437	297.2435	0.67	279.2432, 169.1235
M349T369	1.7	lipoxin A5	eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	6.1	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M-H] ⁻	349.2025	349.2020	1.43	191.1448, 189.1292, 179.1077, 173.0974, 161.0970, 135.0816, 127.0766, 113.0973, 95.0501, 83.0499, 59.0132
M353T359	1.7	iPF2alpha-IV ou troxililn A	eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	5.9	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	[M-H] ⁻	353.2336	353.2333	0.85	335.2234, 317.2119, 273.2229, 255.2124, 213.1134, 195.1028, 183.1027, 177.0922, 153.0922, 151.1129, 139.1129, 139.0132
M227T98	1.7	deoxyuridine	pyrimidine nucleoside	pyrimidine nucleoside	1.6	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅	[M-H] ⁻	227.0676	227.0673	1.08	184.0618, 111.0195, 94.0296
M381T379	1.6		eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	6.3	C ₂₂ H ₃₈ O ₅	[M-H] ⁻	381.2648	381.2646	0.52	363.2545, 345.2442, 241.1441, 223.1340, 155.1078, 97.0294, 85.0292, 59.0131, 57.0339
M351T361	1.5	trioxillinA4	eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	6.0	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M-H] ⁻	351.2181	351.2177	1.13	333.2084, 315.1968, 271.2064, 207.1034, 195.1023, 155.0715, 147.1181, 127.0767, 111.0816, 83.0499, 69.0341, 59.0133, 57.0133

Table S2.5: Putatively annotated metabolites that were significantly different in skin mucus collected from parasitized and never parasitized fish (negative ionization mode)

VIP code	VIP score	putative compound name	compound class	chemical family	RT (min.)	compound molecular formula	ion status	m/z measured	m/z calculated	mass error (ppm)	main explained MS2 fragments (SIRIUS)
M327T328	2.3	trihydroxy-10,15-octadienoic acid	octadecanoids	hydroxy polyunsaturated fatty acids	5.5	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	[M-H] ⁻	327.2179	327.2177	0.61	309.2068, 291.1967, 209.1183, 197.1183, 185.1183, 171.1029, 129.0922
M329T339	1.8	trihydroxy-11-octadecanoic acid	octadecanoids	hydroxy polyunsaturated fatty acids	5.7	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	[M-H] ⁻	329.2335	329.2333	0.61	311.2225, 293.2116, 229.1445, 211.1340, 183.1390, 171.1027, 127.1128, 99.0814
M180T317	1.5			fatty acids	5.2	C ₆ H ₁₃ O ₄ S	[M-H] ⁻	180.1462	180.1462	0.00	no fragment
M227T98	1.5	deoxyuridine	pyrimidine nucleosides	nucleosides	1.6	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅	[M-H] ⁻	227.0676	227.0673	1.32	184.0614, 136.0417, 94.0296
M697T477	1.2		glycerophosphoinositols	fatty acids	8.0	C ₃₂ H ₅₉ O ₁₄ P	[M-H] ⁻	697.3568	697.3570	0.29	599.3185, 419.2566, 283.2646, 241.0121, 152.9958
M351T461	1.2		eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	7.8	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	[M-H] ⁻	351.2542	351.2541	0.3	333.2437, 289.2531, 245.1901, 217.1600, 213.1508
M381T379	1.1			hydroxy polyunsaturated fatty acid	7.5	C ₂₂ H ₃₈ O ₅	[M-H] ⁻	381.2646	381.2646	0.00	363.2543, 295.1914, 279.1965, 277.1808, 199.1340
M363T444	1.1				7.4			363.2542			no fragment
M585T479	1		glycerophosphoinositols	fatty acids	7.8	C ₂₇ H ₅₅ O ₁₁ P	[M-H] ⁻	585.3409	585.3409	0.00	423.2873, 405.2776, 95.9693, 78.9586

Table S2.6: Putatively annotated metabolites that were significantly different in gill mucus collected from parasitized and never parasitized fish (positive ionization mode)

VIP code	VIP score	putative compound name	compound class	chemical family	RT (min.)	compound molecular formula	ion status	m/z measured	m/z calculated	mass error (ppm)	main explained MS2 fragments (SIRIUS)
M371T376	2.9		unknown	unknown	6.3	unknown	unknown	371.1827			no fragments
M440T342	2.7	leukotriene E	eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	5.7	C ₁₉ H ₃₃ N ₇ O ₃ S	[M+H] ⁺	440.2457	440.2465	-1.81	301.2157, 173.1322, 159.1166, 145.1010, 122.0271, 107.0858
M353T462	2.4		eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	7.7	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	[M+H] ⁺	353.2683	353.2686	-1.85	335.2578, 317.2473, 289.2523, 165.1274, 99.0809
M401T721	2		cholestane steroid	terpenoids	12	C ₁₁ H ₂₃ NO ₃ S	[M+H] ⁺	401.3402	401.3414	-2.98	383.3279, 365.3195, 175.1115, 95.0859, 81.0704
M179T357	2				5.9	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	179.1064	179.1067	-1.67	no fragments
M342T475	2		fatty amide	derivated long-chain fatty acids	7.9	C ₂₁ H ₄₃ NO ₂	[M+H] ⁺	342.3354	342.3367	-3.79	140.1134, 123.1170, 109.1014
M367T679	1.9		cholestane steroid	triterpenoids	11.3	C ₂₇ H ₄₄ O	[M+H] ⁺	367.3353	367.3359	-1.63	255.2100, 241.1946, 227.1791, 213.1635, 199.1479, 185.1323, 173.1322, 159.1166, 145.1010, 133.1011
M300T518	1.9	impulsin	fatty amide	derivated long-chain fatty acids	8.8	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	[M+H] ⁺	300.2891	300.2897	-1.99	239.2375, 140.1337, 123.1173, 109.1016, 85.1016, 62.0608
M372T358	1.8		eicosanoid	hydroxy polyunsaturated fatty acid	6	C ₂₀ H ₃₇ NO ₅	[M+H] ⁺	372.2740	372.2744	-2.00	241.1943, 217.1584, 199.1114, 179.1063, 161.0958, 133.1011, 105.0701
M403T799	1.8		cholestane steroid	triterpenoids	13.4	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	[M+H] ⁺	403.3568	403.3571	-0.74	385.3462, 367.3358, 255.2112, 213.1640, 201.1641, 187.1484, 159.1166, 133.1012, 105.0703

Table S2.7: Putatively annotated metabolites that were significantly different in skin mucus collected from parasitized and never parasitized fish (positive ionization mode)

VIP code	VIP score	putative compound name	compound class	chemical family	RT (min.)	compound molecular formula	ion status	m/z measured	m/z calculated	mass error (ppm)	main explained MS2 fragments (SIRIUS)
M218T236	3.2				3.9	C ₁₄ H ₁₉ NO	[M+H] ⁺	218.1544	218.1539	2.29	no fragment
M709T703	3				11.7	C ₄₁ H ₆₆ O ₈	[M+Na] ⁺	709.4642	709.4650	-1.12	no fragment
M303T190	2.6	Leu-Gly-Gly-Gly interchangeable ou Asn-Gly-Leu	tri ou tetrapeptide	small peptide	3.2	C ₁₂ H ₂₂ N ₄ O ₅	[M+H] ⁺	303.1663	303.1663	0.00	228.1314, 189.1232, 143.1178, 115.0504, 87.0558
M426T210	2.5		tri ou tetrapeptide	small peptide	3.5	C ₁₉ H ₂₇ N ₃ O ₆ S	[M+H] ⁺	426.1693	426.1693	0.00	382.1795, 293.1312,
M360T194	2.3	Asn-Gly-Gly-Leu	tri ou tetrapeptide	small peptide	3.2	C ₁₄ H ₂₅ N ₅ O ₆	[M+H] ⁺	360.1870	360.1878	-2.22	172.0713, 143.1176, 1015.0502, 86.0969
M531T202	2.3		oligopeptide (8AA)	small peptide	3.3	C ₂₀ H ₃₄ N ₈ O ₉	[M+H] ⁺	531.2515	531.2522	-1.31	184.0713, 127.0501, 86.0968
M184T71	2.1							184.1333			no fragment
M198T81	2.1							198.1488			no fragment
M229T77	1.7	Isoleucylproline or Leucylproline		small peptide	1.2	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	229.1547	229.1547	0.00	170.0811, 148.9769, 124.0758, 114.0552, 70.0658, 60.0815, 58.0659
M311T104	1.6							311.1243			no fragment

5. Conclusion, Perspectives

Si la métabolomique non ciblée et le metabarcoding semblent être des outils puissants pour évaluer les variations globales du métabolome des communautés bactériennes au sein des populations de poissons sauvages, nos résultats mettent en évidence la difficulté d'isoler des molécules spécifiquement impliquées dans les relations entre l'hôte, son microbiote et les parasites. De plus, plusieurs études ont montré que la spécificité des monogènes pouvait s'expliquer par la présence de molécules d'attraction et de reconnaissance à la surface de certains hôtes. Par conséquent, l'annotation des métabolites retrouvés spécifiquement associés au mucus externe des espèces parasitées constituerait une piste de travail même s'il resterait compliqué de détecter si ces métabolites sont une cause ou conséquence de l'infestation. De toute évidence, de nombreux facteurs structurent les communautés bactériennes et la composition chimique du mucus externe et il est difficile d'évaluer l'ensemble de ces facteurs et leur impact sur le microbiote des populations sauvages. Ainsi, pour faciliter la compréhension de l'implication du microbiote dans la relation entre les monogènes et leurs hôtes, il apparaît essentiel de développer des approches *in vitro*, où le milieu est contrôlé.

Chapitre III

Quels facteurs favorisent l'établissement et le maintien des différents stades de vie du parasite sur son hôte ?

Comme nous l'avons déjà mentionné, des études suggèrent que les larves de monogènes sont attirées par le mucus de leurs hôtes téléostéens via des molécules produites par les bactéries qui y sont associées. Ces communautés bactériennes pourraient donc avoir un rôle dans la spécificité des larves de monogènes pour l'hôte. Plusieurs études suggèrent également que ces communautés bactériennes pourraient être modifiées par la présence de monogènes (Shoemaker *et al.* 2008 ; Zhang, Li, *et al.* 2015 ; Attia *et al.* 2022). Cependant et comme nous l'avons vu, le microbiote est soumis à l'influence de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (Larsen *et al.* 2013 ; Chiarello *et al.* 2015, 2018 ; Ruiz-Rodríguez *et al.* 2020 ; Scheifler, *et al.* 2022a) qui rendent compliquée la détection des communautés bactériennes et/ou des molécules en lien avec le parasitisme. Afin de s'affranchir d'une partie de la variabilité observée en milieu naturel, des approches *in vitro* et *in vivo* ont été développées.

Le développement d'approches expérimentales réalisées au cours de ma thèse constitue un socle de connaissances indispensable à de futures expériences qui seront menées sur l'association sparidés-*Lamellodiscus* et sont, à ce titre, détaillées dans ce chapitre.

A. Mise au point de méthodologies pour des approches *in vivo* et *in vitro*

1. Contexte

Afin d'évaluer d'une part le potentiel attractif du mucus externe et la mise en place d'un filtre de spécificité au stade larvaire *Lamellodiscus in vitro* et d'autre part évaluer l'évolution du microbiote en réponse à une infestation artificielle en monogènes *in vivo* via la manipulation de charge parasitaire des hôtes, il était indispensable de pouvoir accéder au compartiment larvaire. Cependant, les larves de Diplectanidae sont très difficiles à repérer sur la peau des poissons en raison de leur taille, de leur transparence et de leur rapidité (Trujillo-González *et al.* 2015). De plus, et comme nous le verrons plus tard, une fois fixées les larves entament très rapidement leur métamorphose et plusieurs de leurs structures caractéristiques disparaissent

(Whittington *et al.* 1999). Il était donc nécessaire de développer un système de récupération et de culture d'œufs de *Lamellodiscus* afin de pouvoir manipuler des larves. Pour cela il a fallu établir des conditions propices au maintien de sparidés sauvages en captivité.

2. Capture et maintien de sparidés sauvages en aquarium

Des captures et le maintien de sparidés sauvages en aquarium ont été réalisés tout au long de ma thèse (Tableau 3.1). Le maintien et le bien-être des individus pêchés ont été sous ma responsabilité et ont été rendus possible grâce au soutien du service d'aquariologie de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer et l'aide ponctuelle de trois stagiaires, Thomas Tottoli, Océane Reneteaud et Emma Figuls (Tableau 3.1).

Tableau 3.1. Récapitulatif des poissons maintenus en aquarium pendant ce travail de thèse

Période	Avril 2021 – Mai 2021	Décembre 2021 – Août 2022	Novembre 2022 – Août 2023	Août 2023 – Octobre 2023
Nombre d'individu	24	21	8	8
Espèce	<i>Diplodus vulgaris</i>	<i>Pagellus erythrinus</i>	<i>Spicara maena</i>	<i>Pagellus erythrinus</i>
Nombre de bac(s) (contenance en L)	4 (110L)	4 (110L)	2 (250L)	1 (250L)
Soutien (en plus du service d'aquariologie)	Thomas Tottoli	Océane Reneteaud, Emma Figuls	-	-

Les sparidés ont tous été pêchés de nuit, éblouis par une lampe torche, capturés dans une épuisette à maille fine et maintenus dans un seau percé pendant le reste de l'échantillonnage (Figure 3.1). Ces équipements ont été spécialement optimisés en amont des échantillonnages pour éviter d'abîmer la peau des poissons et réduire l'apparition de nécroses. Les poissons ont été ramenés au laboratoire et maintenus dans un bac de 450 L en circuit semi-ouvert pendant 1 à 4 semaines en quarantaine. Les poissons ont ensuite été transférés dans des bacs de 110 L ou 250 L selon le nombre d'animaux (Tableau 3.1). Les poissons étaient maintenus en circuit fermé dans des bacs équipés d'une filtration interne et d'un système d'aération. Le système de filtration était constitué de 4 masses de filtrations différentes, 2 filtrations mécaniques (ouate) et 2 filtrations biologiques (billes poreuses d'argiles). L'eau était filtrée à 1 µm, maintenue à température ambiante ($\pm 20^\circ\text{C}$) et à une salinité de 38. Des plaques de carton

étaient positionnées sur le haut des bacs afin d'éviter que les poissons ne sautent en dehors de l'aquarium. 60 % de l'eau a été changé une fois par semaine avec de l'eau de mer filtrée à 1 μ m et les masses de filtration ont été nettoyées une fois toutes les deux semaines. Les poissons ont été maintenu sous un régime jour/nuit 12:12 et nourris quotidiennement avec du broyat de moule.

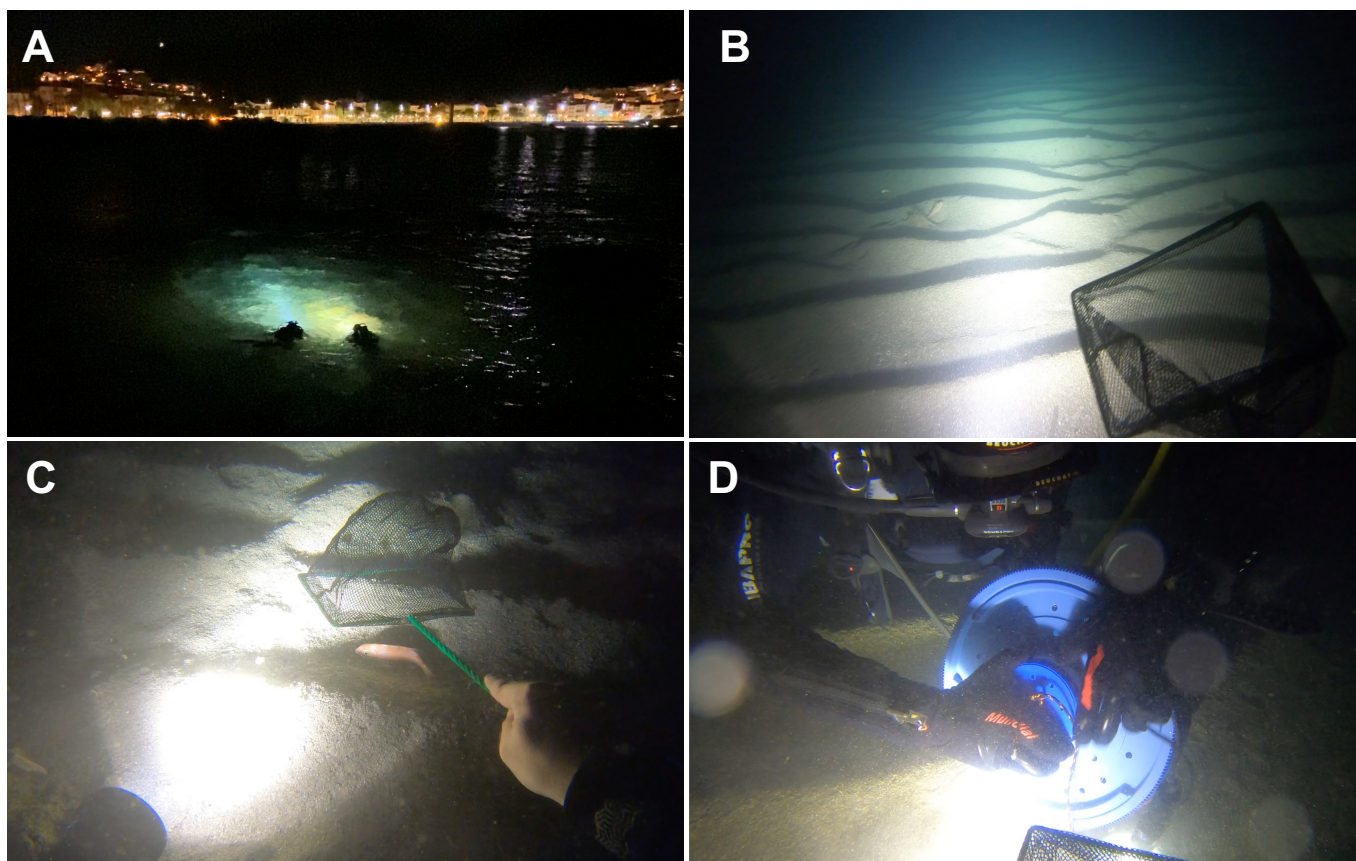


Figure 3.1. Photographies (Pascal Romans) de la méthode de capture des sparidés sauvages. (A) Capture nocturne dans la baie de Banyuls-sur-Mer. (B) Recherche des sparidés (ici un pageot commun) sur fond sableux. (C) Le poisson est ébloui à l'aide d'une lampe torche et capturé dans une époussette à maille fine. (D) Pendant le reste de l'échantillonnage les poissons sont maintenus dans un seau percé

3. Collecteurs d'œufs de *Lamellodiscus*

À partir des sparidés maintenus en aquarium, nous avons pu développer des systèmes de collecteurs d'œufs de monogènes pour ensuite accéder aux larves.

Le cycle de vie direct, l'oviparité et l'hermaphrodisme des *Lamellodiscus* en font des organismes qui prolifèrent facilement et rapidement en milieu fermé (Marchiori *et al.* 2013).

Dans la littérature, plusieurs méthodes de collecte d'œufs de monogènes ont été décrites. Buchmann (1988) a par exemple proposé de maintenir les poissons en captivité dans des petits sacs en filet de nylon. Cependant cette méthode ne pouvait pas être appliquée à long terme et impliquait l'utilisation de petits poissons. Une filtration totale de l'eau avec des mailles de tailles adaptées a également été montrée comme efficace pour récupérer des œufs de *Zeuxapta seriolae* (Mooney *et al.* 2006). Cependant cette méthode ne semblait pas adaptée pour une captivité à long terme avec une récupération quotidienne d'œufs car elle nécessite beaucoup de temps et de matériel puisque les poissons doivent pouvoir être transférés dans de nouveaux bacs pendant la filtration l'eau. En 2013, une chambre de collecte d'œufs qui utilise un système de double bac et de flux d'eau dirigée vers un « appareil d'inspection » recouvert d'un filtre à plancton a été développée (Marchiori *et al.* 2013). Bien que ce système ait fait ses preuves pour récupérer des œufs du monogène *Aphanoblastella mastigatus*, il nécessitait également beaucoup de mise au point et l'utilisation de poissons de petites tailles.

Ainsi, dans un premier temps, des pièges inspirés de méthodes plus simples comme celle développée par Whittington et Ernst (1996) et Sitjà-Bobadilla (2006) ont été testés. Ces dispositifs consistaient à maintenir dans la colonne d'eau des rectangles de filtre à plancton accrochés à un flotteur d'un côté et un plomb de l'autre côté.

Trois pièges différents ont été testés dans les aquariums : un piège « flottant », un piège « coulant » tout deux constitués d'un morceau de tuyau PVC recouvert d'un filtre à plancton d'une maille de 25 μm (Figure 3.2A-B) et un piège en pleine eau constitué d'un carré du même filtre à plancton accroché à un flotteur et à un plomb maintenu proche du courant d'eau généré par le filtre (Figure 3.2C). Afin de limiter le stress des poissons (Ashley 2007), des fils de nylon ont été accrochés aux pièges pour pouvoir les récupérer sans avoir à introduire d'objet ou de mains dans l'aquarium (Figure 2). Les pièges ont ensuite été observés sous loupe binoculaire pour détecter la présence d'œufs (Figure 3.3A). Après plusieurs semaines d'observation, il s'est avéré que les œufs pondus par les *Lamellodiscus* ne s'accrochaient pas aux mailles des filtres à planctons des différents pièges (Figure 3.3A) mais venaient s'emmêler autour des fils de nylon qui permettaient de retirer les pièges hors de l'eau (Figure 3.3B).

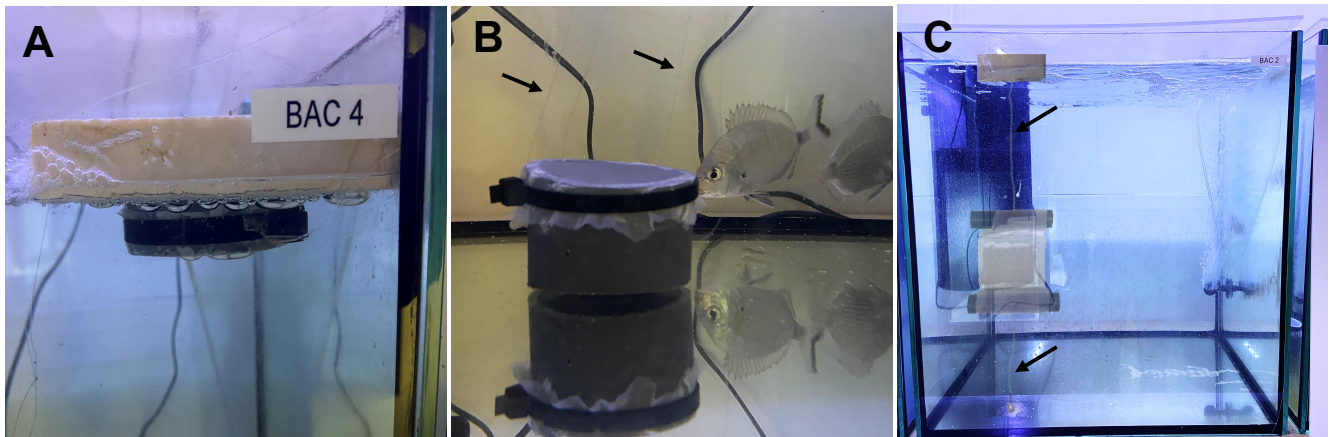


Figure 3.2. Systèmes de collecteurs d'œufs de monogènes testés. (A) Piège « Flottant » ; (B) Piège « coulant » accroché à des fils de nylon (flèches) ; (C) Piège en pleine eau accroché à des fils de nylon (flèches)

Ainsi le dispositif a été adapté et remplacé par de simples fils de nylon plombés de la hauteur de la colonne d'eau (≈ 50 cm). Les pièges ont été prélevés très régulièrement et les œufs récupérés sous loupe binoculaire à l'aide de pinceaux fins puis transférés et maintenus dans des boîtes de Petri remplies d'eau de Mer filtrée à $1 \mu\text{m}$ supplémentée de 20 mg/L de streptomycine (Oliver 1987). Ces collecteurs se sont avérés être de très bons proxys pour estimer les espèces de monogènes ovipares présentes au sein de l'hôte (Figure 3.3C-E) mais également un moyen facile, peu onéreux et efficace de récupérer des œufs de *Lamellodiscus*.

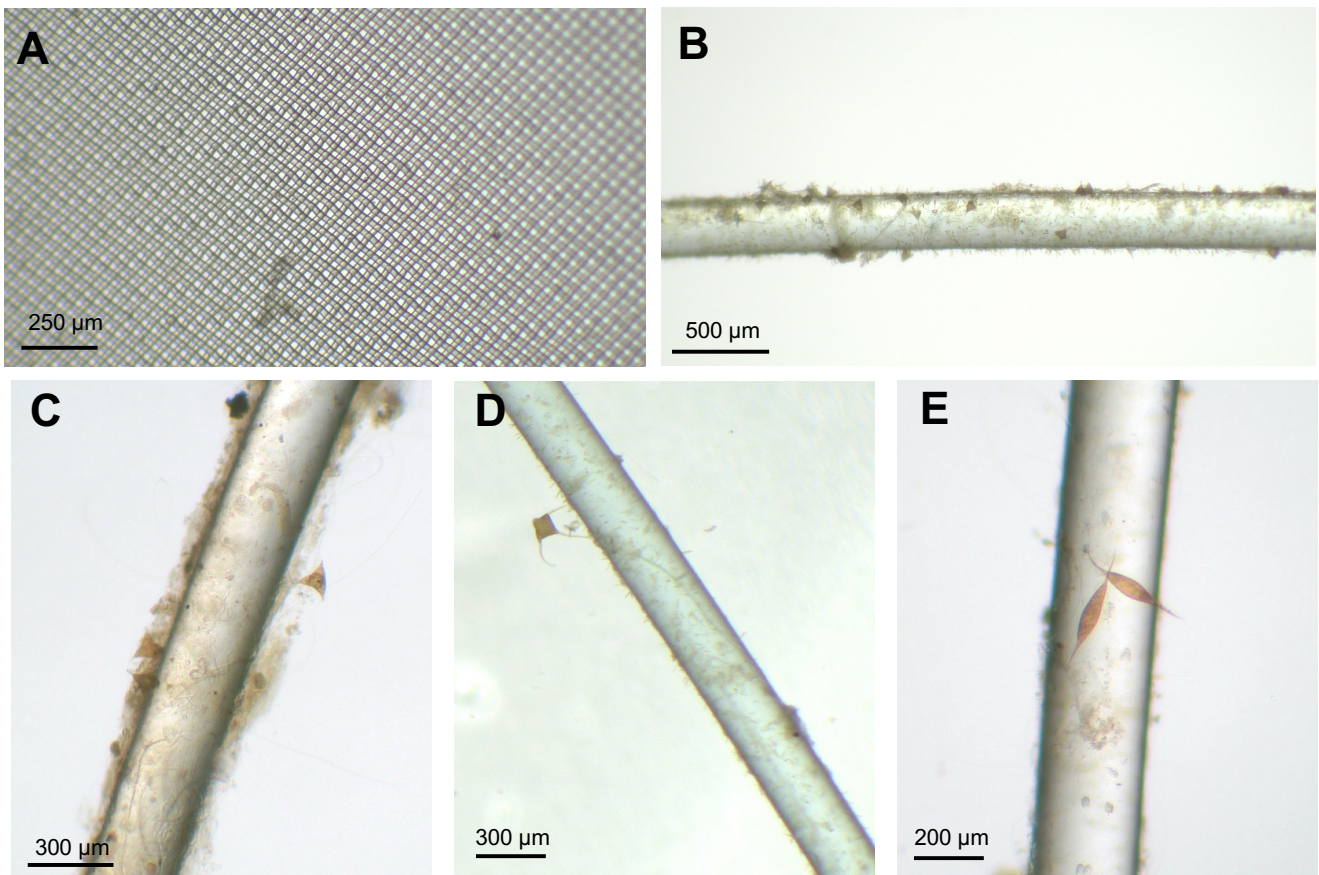


Figure 3.3. Photographies en microscopie optique des collecteurs d'œufs de monogènes. (A) Filtre à plancton des pièges initialement testés (B) Œufs de *Lamellodiscus* spp. enroulés autour d'un fil de nylon. (C-E) Œufs de monogènes n'appartenant pas au genre *Lamellodiscus*

4. Maintien des œufs *in vitro*

Maintenant que nous disposons d'un moyen simple et efficace de récupérer des œufs de *Lamellodiscus*, il a fallu établir des conditions appropriées pour leur maintien *in vitro* et garantir le succès de l'éclosion des larves (Hutson *et al.* 2018).

La température de l'eau est considérée comme un facteur influençant fortement le développement des œufs de monogènes (Šimková *et al.* 2001 ; Tubbs *et al.* 2005 ; Brazenor & Hutson 2015 ; Hoai 2020). Par exemple, des températures trop basses peuvent empêcher l'éclosion de certains œufs de monogènes comme ceux de *Neobenedeniagirellae* (Bondad-Reantaso *et al.* 1995) ou allonger la période d'incubation du simple au double pour quelques degrés de différence (Cecchini *et al.* 1998 ; Turgut 2012). Au contraire des températures plus élevées favorisent généralement des temps d'incubation plus courts mais peuvent également

réduire le succès des éclosions comme cela a été observé par exemple chez *Neoheterobothrium hirame* (Yoshinaga *et al.* 2000), ce qui conduit à augmenter le risque de développement bactériens dans l'eau susceptible de provoquer l'asphyxie des œufs (Oliver 1987). Compte tenu des données présentes dans la littérature et de la température de l'eau des aquariums, les œufs de *Lamellodiscus* ont été maintenus à 19°C.

L'intensité lumineuse a également été décrite comme un facteur majeur qui influence le processus d'éclosion des œufs, créant des rythmes d'éclosion (Hoai 2020). Des auteurs ont montré que l'exposition des œufs à lumière après une période d'obscurité était un moyen de prédire et déclencher l'éclosion de larves de monogènes. Par exemple, la majorité des œufs de *Neobedenia girellae* maintenus dans l'obscurité éclosent dans les trois premières heures de lumière (Hoai & Hutson 2014). De la même manière, Kearns (1963) a rapporté que l'éclosion des œufs d'*Entobdella soleae* était stimulée par une illumination après une période d'obscurité. Ainsi, afin de pouvoir synchroniser et déclencher les éclosions, les œufs de *Lamellodiscus* ont été maintenus à l'obscurité.

Le milieu de culture a été changé tous les jours pour maintenir une salinité constante et une fournir une quantité d'oxygène dissous suffisante (Tubbs *et al.* 2005). Lors des changements d'eau les œufs ont été observés sous loupe binoculaire et microscope optique pour suivre leur maturation jusqu'à l'éclosion des larves. Lorsqu'un œuf était mature, son éclosion était notamment déclenchée lors du changement d'eau. Cet aspect et le processus de maturation des œufs seront discutés dans une autre partie de ce chapitre.

5. Conclusion, perspectives

Le maintien à long terme de sparidés en aquarium, la mise en place de collecteurs d'œufs de monogènes simples et performants ainsi que la création de conditions propices à la survie des œufs *in vitro* en vue de leur éclosion représentaient des prérequis indispensables au développement des approches expérimentales que nous allons développer dans la suite de ce chapitre.

B. Tests de préférence larvaire

1. Contexte

Depuis longtemps plusieurs études ont montré que les larves de monogènes étaient capables de distinguer leurs hôtes des autres organismes (Kearn 1967). Cependant l'existence d'un filtre de spécificité au stade larvaire n'est pas claire puisque certains monogènes très spécifiques pour une espèce hôte sont capable de coloniser de façon transitoire d'autres espèces (Ohhashi *et al.* 2007 ; Igarashi *et al.* 2017 ; Matsui *et al.* 2020 ; Scheifler *et al.* 2022b). Ces études suggèrent qu'il existe différents facteurs et niveaux de régulation qui sous-tendent les mécanismes de spécificité des monogènes pour leurs hôtes.

Afin de déterminer l'existence d'un filtre de spécificité au stade larvaire du genre *Lamellodiscus*, des tests *in vitro* de préférences larvaires ont été développés. Ces tests avaient pour objectif d'évaluer dans un premier temps l'attraction des larves de *Lamellodiscus* pour le mucus de leur hôte spécifique et dans un deuxième temps la préférence des larves d'espèces spécialistes de *Lamellodiscus* pour un panel de mucus de sparidés.

Pour cette approche, nous avons collecté des œufs de *Lamellodiscus* provenant des aquariums où étaient maintenues les espèces *Pagellus erythrinus* ou *Spicara maena* car ces deux espèces n'hébergent qu'une seule espèce spécialiste de *Lamellodiscus* au sein de leurs branchies (Tableau 1, Introduction). Ainsi l'espèce des œufs de *Lamellodiscus* récupérés sur les collecteurs était connue et nous pouvions tester des mucus d'hôtes non spécifiques aux larves écloses.

2. Dispositifs testés au cours de ce travail

Le premier protocole testé a été inspiré par celui développé par Kearn (1967) avec des larves du monogène *Entobdella Solea*. Ce dernier consistait à présenter à des larves des blocs d'agar imprégné de mucus cutané de différentes espèces de sparidés. Après des essais préliminaires, il s'est avéré que le mucus dont l'agar était imprégné diffusait dans l'eau de la boîte de culture et qu'il allait par conséquent être difficile d'évaluer l'attraction des larves pour un mucus particulier. L'autre protocole proposé par Kearn, qui consistait à présenter des écailles des poissons hôtes et d'évaluer le nombre de larves qui s'y accrochent, ne semblait pas adapté pour notre modèle. En effet, Kearn a réalisé ce protocole avec des larves d'*E. solea* qui

mesurent en moyenne 250 μm de longueur tandis que les larves de *Lamellodiscus* sont bien plus petites (moins de 100 μm). Ainsi, il aurait été très compliqué de les compter sur des écailles de poissons. De plus nous souhaitons développer un protocole moins invasif pour les poissons que nous maintenions en captivité sur de longues périodes.

Nous nous sommes donc inspirés d'une autre méthode basée sur des travaux antérieurs (Sjoblad *et al.* 1978) et développée par Takeushi et ses collaborateurs (2017) pour évaluer la chimio attraction des dinoflagellés *Symbiodinium* pour des extraits de coraux. Les auteurs ont utilisé des suspensions de souches de *Symbiodinium* maintenues dans des tubes Eppendorf stériles dans lesquelles ils ont plongé des capillaires remplies soit d'extrait de coraux soit de milieu de culture (témoin). Le nombre de dinoflagellés attirés a ensuite été quantifié en soustrayant le nombre de *Symbiodinium* retrouvé dans le capillaire rempli de milieu de culture (témoin) de celui contenant les extraits de coraux.

Nous avons donc transposé ce protocole pour l'appliquer à notre modèle hôte-parasite en utilisant du mucus cutané de sparidés (Figure 3.4). Cependant le dispositif expérimental a été adapté pour, comme préconisé par Kearn, forcer une nage active des larves vers les capillaires et non une accumulation « passive ». Ainsi des œufs matures de *Lamellodiscus* ont été placés au centre d'une cupule centrale représentant une « barrière » qui devra être franchie par les larves pour atteindre les capillaires disposés de part et d'autre de la cupule (Figure 3.4). L'attraction devait être déterminée en soustrayant le nombre de larves accumulées dans le capillaire rempli de milieu de contrôle et le nombre d'œuf éclos dans la cupule centrale au nombre de larves accumulées dans le capillaire rempli de mucus.

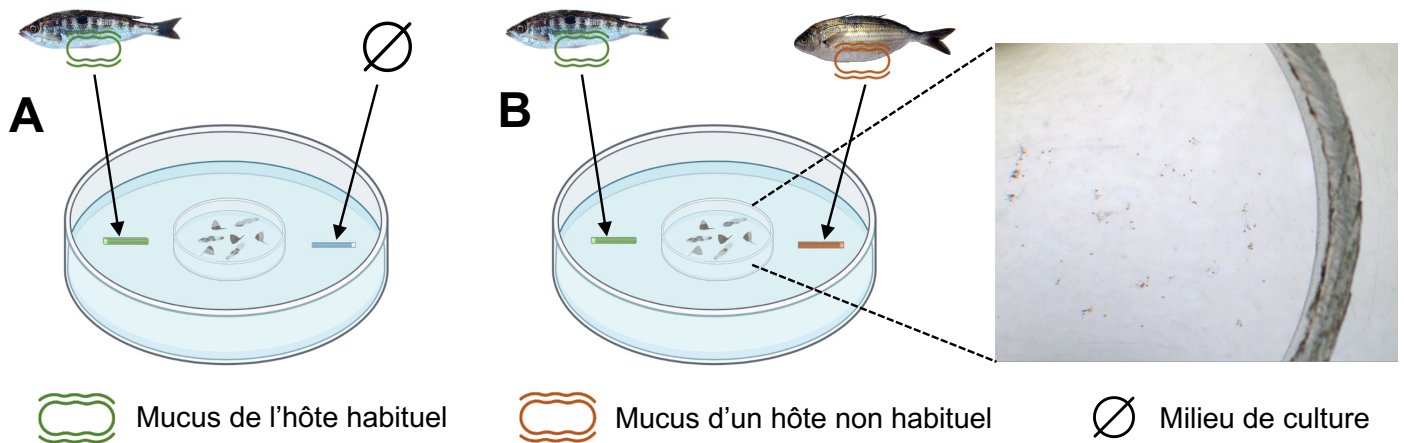


Figure 3.4. Schéma du protocole expérimental initialement imaginé pour (A) établir l'attraction des larves de *Lamellodiscus knoeppfleri* pour le mucus de leur hôte spécifique *Spicara maena* et (B) établir la mise en place d'un filtre de spécificité chez les larves de *L. knoeppfleri* avec du mucus de leur hôte habituel *S. maena* ou du mucus d'un autre sparidé non habituel

Les capillaires en plastique ont été remplis de mucus cutané récupéré sur les sparidés maintenus en captivité. Les poissons ont été placés quelques secondes en dehors de l'aquarium par un soigneur de l'aquarium de recherche de l'OOB portant des gants. La peau du poisson a été délicatement raclée dans le sens des écailles avec une carte en plastique souple stérilisée. L'amas de mucus a ensuite été récupéré à l'aide d'un Kimtech stérilisé (autoclave, 121° - 20 min) et placés dans un tube Eppendorf à l'aide de pinces stériles. Le kimtech a ensuite été centrifugé et le mucus récupéré au fond du tube a été injecté dans les capillaires à l'aide d'une micropipette (10 µL). Jusqu'à 500 µL de mucus (dépendant de l'espèce de sparidé échantillonnée) a été prélevé sur chaque face du poisson.

Afin de s'assurer que le mucus injecté dans les capillaires ne se diffuse pas dans l'eau de la boîte de culture, les capillaires ont été remplis de mucus mélangé à du colorant alimentaire et laissés dans le milieu de culture. Après 48h, la boîte a été observée et aucune diffusion n'a été observée.

Malheureusement après plusieurs essais de ce premier dispositif, le dénombrement des larves présentes dans la boîte ou les capillaires à la fin de l'expérience s'est avéré impossible en raison de la dégradation rapide des larves de *Lamellodiscus* après leur mort (survenant quelques heures après leur éclosion).

Pour remédier à ce problème, il a été décidé de filmer les capillaires en continu pour évaluer le nombre de larves qui s'y accumulaient. Cependant en raison du champ restreint imposé par la caméra disposée sur la loupe binoculaire (1,1 cm sur 0,6 cm) la boîte de culture a été remplacée par un labyrinthe en forme de U aux dimensions du champ de la caméra moulé avec de l'agar dans une boîte de Petri (Figure 3.5A). Les œufs ont été déposés à la base du U et les capillaires aux extrémités des branches du U ont été filmés en continu (Figure 3.5A). Si des larves semblaient attirées dans la zone du capillaire rempli de mucus, aucune larve n'a jamais été filmée dans le capillaire en lui-même (Figure 3.5A). Ainsi l'utilisation du moule et de l'agar pour filmer en permanence les deux capillaires ne semblait pas utile.

Afin d'estimer l'attraction des larves pour des substances chimiques du mucus, l'expérience a été répétée en filmant seulement le capillaire rempli de mucus et la zone autour de ce dernier (Figure 3.5B). L'attraction pour le mucus aurait été mesurée en calculant le ratio du temps passé par une larve sur la zone filmée sur le temps total de vie de la larve post éclosion. Cependant la hauteur d'eau nécessaire pour immerger entièrement les capillaires dans les boîtes de culture n'a pas permis de suivre en permanence les larves alors même qu'elles se trouvaient dans la zone filmée. Les larves observées semblent alterner des mouvements horizontaux avec des mouvements verticaux dans la colonne d'eau ce qui empêche leur suivi avec une profondeur de champ fixe.

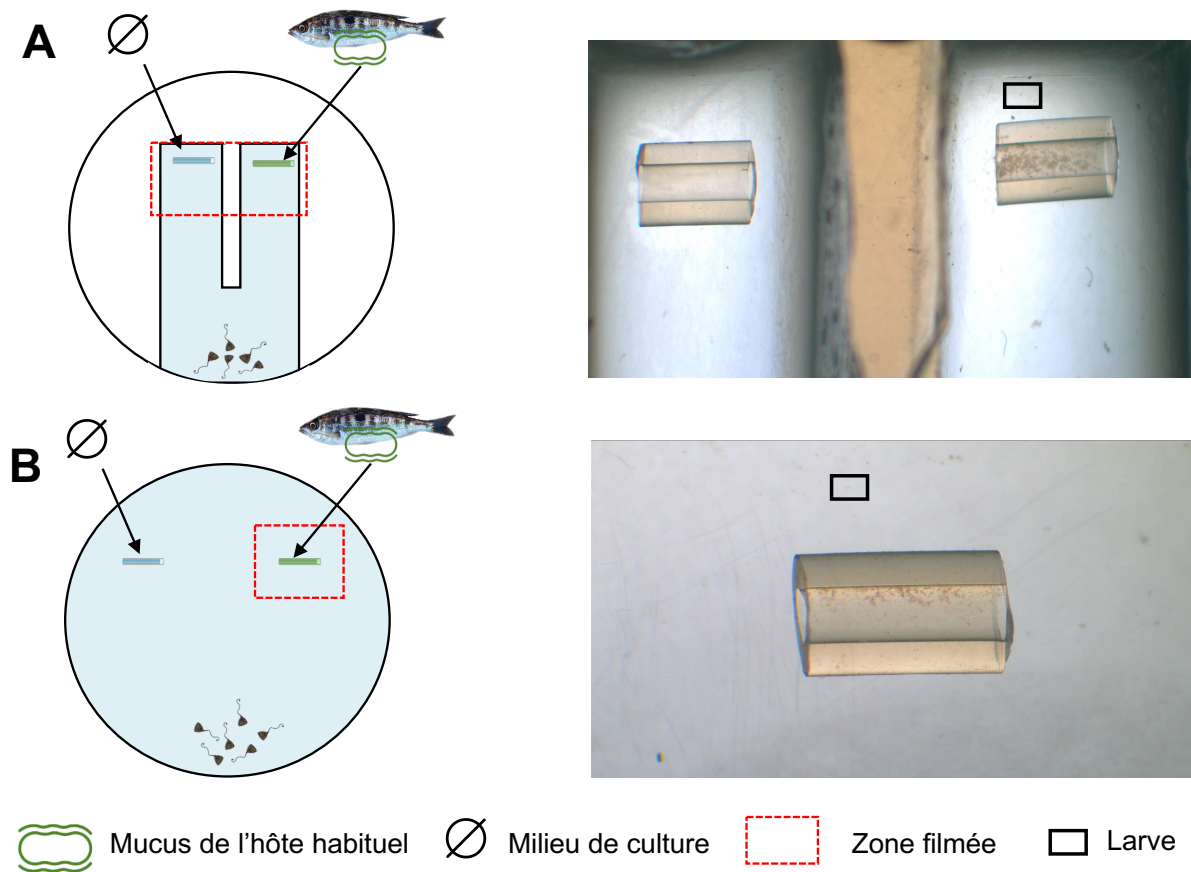


Figure 3.5. Schémas et photographies des dispositifs testés. (A) Labyrinthe en U, (B) Dispositif sans labyrinthe

En effet, il a été observé que lorsque la hauteur d'eau était diminuée, les larves pouvaient être repérées et filmées bien plus facilement. Avec cette hauteur d'eau, les larves ont pu être détectées par le logiciel ComTrack récemment développé pour réaliser un suivi automatisé de micro-organismes (Besson *et al.* 2022) (Figure 3.6). Cependant, lorsque la larve s'approchait trop des bords du puit de culture, elle disparaissait du champ et n'était plus détectable sur la vidéo.

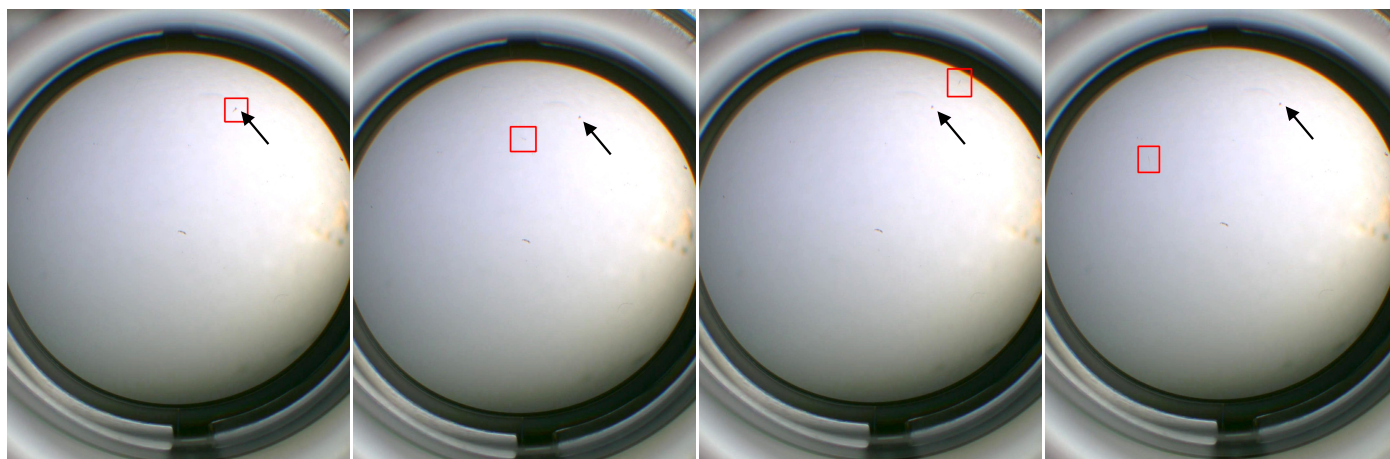


Figure 3.6. Tracking vidéo par le logiciel ComTrack d'une larve (carré rouge) de *Lamellogadus* à partir de son éclosion. La flèche noire désigne l'œuf

3. Conclusion, perspectives

Lors de ce travail, de nombreux dispositifs pour évaluer la mise en place d'un filtre de spécificité au stade larvaire des *Lamellogadus* ont été testés. Cependant la taille, la vitesse, la fragilité des larves de monogènes et les limitations liées au matériel ont été des obstacles majeurs au développement d'un protocole abouti. Pour autant, plusieurs pistes pourront être explorées à l'avenir pour finaliser cette approche expérimentale.

Une amélioration possible serait de marquer les larves avec un colorant fluorescent pour mieux les identifier une fois mortes. Par exemple l'utilisation du colorant fluorescent CFSE (5(6)-carboxy fluorescein diacetate, succinimidyl-ester) a déjà été utilisé pour suivre l'installation de plusieurs espèces de monogènes sur leur hôte (Chigasaki *et al.* 2000 ; Glennon *et al.* 2007) comme l'installation des larves de *Nebedenia* sur les barramundis (Trujillo-González *et al.* 2015). Afin d'augmenter la visibilité, un microcapillaire en verre pourra être utilisé comme cela a été réalisé par Miller et ses collaborateurs (2013) dans un test de chimio attraction de parasites ciliés (*Orchitophyra stellarum*) pour des extraits de crabe bleu. En combinant ces deux techniques, il sera possible en fin d'expérience de compter les larves qui se sont accumulées dans ou autour du microcapillaire en observant la boîte sous une loupe à fluorescence. Cette méthode pourra également être combinée à un suivi filmé du comportement de la larve, de son éclosion à sa mort. En effet, un microcapillaire en verre présente l'avantage d'être fin ce qui permettrait de diminuer au maximum la hauteur d'eau

et rendrait la larve visible malgré une profondeur de champ fixe. Ainsi le temps de vie, le comportement, la vitesse et le type de nage de la larve pourront être analysés par des enregistrements vidéo en parallèle de l'état final. Ces enregistrements vidéo permettraient également d'estimer le temps passé autour du capillaire contenant le mucus si, comme pour les capillaires en plastiques, les larves ne s'accumulent pas non plus dans le microcapillaire en verre. L'utilisation du logiciel ComTrack s'avère prometteuse pour analyser les images produites lors de ces enregistrements vidéo car cela allégerait l'étape de « derushage » et d'analyse vidéo et permettait le suivi automatisé de plusieurs larves à la fois.

L'utilisation d'une boîte aux bords inclinés plutôt que droits est également conseillée pour éviter aux larves de sortir du champ filmé lorsqu'elles s'approchent des bords de la boîte. Enfin, pour ne pas favoriser de transfert passif et mettre en évidence une attraction des larves, il est conseillé d'augmenter la taille du dispositif et donc la taille du champ filmé en remplaçant la caméra par une ayant un plus grand capteur et/ou en insérant une lentille dégrossissante entre la loupe binoculaire et la caméra.

Ainsi même si nous n'avons pas pu démontrer formellement que les larves de *Lamellodiscus* étaient attirées par le mucus de leur hôte spécifique nous avons cependant identifié tous les aspects techniques à prendre en compte pour réaliser des tests de préférences larvaires sur les larves de *Lamellodiscus* et nous proposons à l'issue de ces recherches l'utilisation du dispositif représenté schématiquement ci-dessous (Figure 3.7).

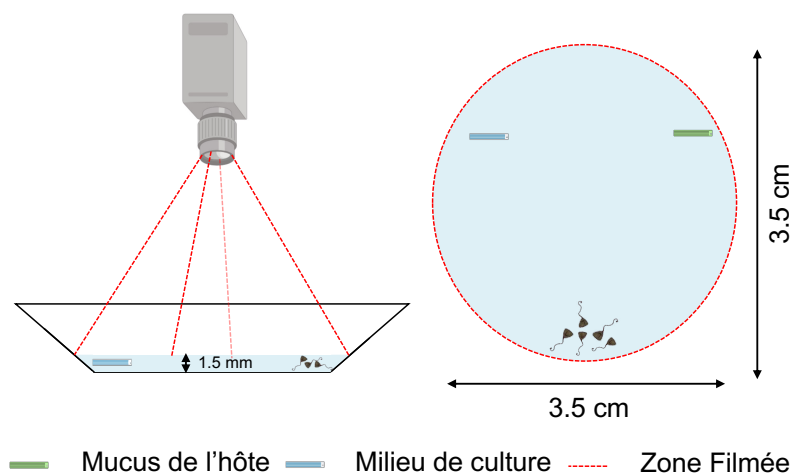


Figure 3.7. Dispositif conseillé pour réaliser des tests de préférences avec des larves de *Lamellodiscus*

C. Optimisation d'un protocole pour déparasiter les espèces cibles : sparidés/*Lamellodiscus*

1. Contexte :

Une des questions majeures de l'implication du microbiote dans les relations hôtes-parasites est de comprendre si ce sont les communautés bactériennes du mucus externe qui contrôlent la présence des monogènes et/ou si la composition des communautés bactériennes est affectée par la présence des monogènes. En effet, certaines études ont suggéré que les différences de communautés bactériennes observées entre des poissons parasités et non parasités étaient le résultat et non la cause d'une infestation parasitaire (Mathieu-Bégné *et al.* 2023) et que le microbiote refléterait ainsi l'état d'infection de l'hôte (Speer 2022).

Pour essayer de suivre les changements du microbiote externe en réponse à une infestation par des monogènes, il était nécessaire de pouvoir accéder à des poissons déparasités de leurs monogènes. De ce fait, développer un protocole pour déparasiter les sparidés de leurs monogènes *Lamellodiscus* a été l'un des objectifs de ma thèse. Pour cela nous avons dans un premier temps sélectionné et testés 3 agents antiparasitaires sur l'espèce *Diplodus vulgaris*. Le meilleur traitement a ensuite été testé sur une deuxième espèce de sparidé, *Pagellus erythrinus*.

2. Test de 3 agents antiparasitaires sur l'espèce *Diplodus vulgaris*

Cette première expérience a été réalisée avec l'aide de Thomas Tottoli dans le cadre de son stage de Master 1 que j'ai co-encadré du 1^{er} mars au 30 juin 2021.

- **Les agents antiparasitaires**

Lors de cette expérience, 3 agents antiparasitaires ont été testés pour leur efficacité supposée contre les ectoparasites.

Le premier agent antiparasitaire testé a été le praziquantel (commercialisé sous le nom Tremazol). Ce composé est communément utilisé en aquaculture pour traiter différentes espèces de poissons de leurs monogènes (Bader *et al.* 2019). Ce traitement semble plus ou moins efficace et toxique selon la concentration appliquée et le temps d'utilisation (Maciel & Affonso 2021). Cependant certains auteurs ont pu montrer 100 % d'efficacité contre certains

monogènes comme *Haliotrema abaddon* (Fajer-Ávila *et al.* 2007), *Zeuxapta seriolae* (Sharp *et al.* 2004) et *Gyrodactylus aculeati* (Schmahl & Taraschewski 1987). A partir des études montrant une efficacité de 100% et les recommandations du fournisseur, le praziquantel a été appliqué par balnéation à une concentration de 5 mg/L pendant 3 heures.

Le deuxième agent antiparasitaire testé a été le Fenbendazole. Ce traitement est également communément utilisé pour traiter les poissons d'élevage contre divers parasites et peut être administré par voie orale pour traiter des nématodes intestinaux (Noga 2010). Ce traitement a déjà été montré comme efficace par balnéation contre des monogènes comme *Dactylogyrus anchoratus* (Kolarova *et al.* 2023), *Gyrodactylus kobayashii* (Zhou *et al.* 2023) et *Lepidotrema bidyana* (Forwood *et al.* 2013). A partir des études présentes dans la littérature, ce traitement a été appliqué par balnéation à une concentration de 25 mg/L pendant 24 h.

Le dernier agent antiparasitaire testé a été le peroxyde d'hydrogène qui est depuis longtemps utilisé pour traiter les poissons de leurs ectoparasites en aquaculture (Kierner & Black 1997). Ce traitement s'est avéré efficace contre les monogènes *Neobenedeniagirellae*, *Benedenia seriolae* et *Zeuxapta japonica* retrouvés chez la sériole (Hirazawa *et al.* 2016) et *Sparicotyle chrysophrii* chez la daurade royale (Sitjà-Bobadilla *et al.* 2006). Ce traitement a été appliqué par balnéation à une concentration à 200 ppm pendant 1h30.

- **Modèle d'étude**

Le sar à tête noire, *Diplodus vulgaris*, a été le premier modèle d'étude choisi pour cette expérience en raison de sa disponibilité dans la baie de Banyuls-sur-Mer et pour sa grande richesse spécifique en *Lamellodiscus*. En effet 9 espèces de *Lamellodiscus* sont susceptibles de parasiter ses branchies (Tableau 1, Introduction), ce qui a permis de tester les agents antiparasitaires sur une grande diversité d'espèces.

- **Méthodes et Résultats**

23 sars à tête noire ont été capturés au cours de 4 plongées nocturnes dans la baie de Banyuls-sur-Mer en avril et mai 2021. Les poissons ont été transportés dans une baille depuis le lieu d'échantillonnage jusqu'au laboratoire. Après une acclimatation d'une semaine dans un bac

commun en quarantaine, 5 individus choisis aléatoirement ont été disséqués pour s'assurer qu'ils étaient bien parasités par des *Lamellodiscus*, et présentaient une intensité parasitaire moyenne de 48,6 *Lamellodiscus* par poisson. Les individus étant tous maintenus dans le même aquarium en quarantaine, nous avons estimé que la charge parasitaire observée pour ces 5 individus était représentative de l'ensemble de la cohorte (le cycle des *Lamellodiscus* étant direct, les contaminations entre individus sont faciles).

Le 14 mai 2021, les 18 poissons restants ont été séparés aléatoirement par 6 et placés dans 3 aquariums de 110 litres équipés de 3 collecteurs d'œufs chacun. Afin d'évaluer l'efficacité des traitements, le nombre d'œufs produits dans chaque aquarium a été suivi en relevant et observant sous loupe binoculaire les collecteurs tous les 2 puis 5 jours.

La première semaine, entre 761 et 1211 œufs ont été comptés sur les collecteurs d'œufs confirmant que tous les bacs étaient bien parasités (Figure 3.8).

Le 21 mai 2021, les poissons de chaque bac ont été traités dans trois baignoires séparées équipées d'un bulleur. 6 poissons ont été traités avec du Tremazol (baignoire de 3 h, 60 µL/L d'eau de mer). 6 autres poissons ont été traités au Fenbendazole (baignoire 12 h, 25 mg/L d'eau de mer). Les 6 poissons restants ont été traités au peroxyde d'hydrogène (10 Volumes) (1 h 30 6,25 mL/L d'eau de mer). Pendant le traitement, les aquariums ont été nettoyés à l'eau douce puis séchés et les unités de filtration ont été rincées et nettoyées à l'eau de mer. À la fin du traitement les poissons ont été réintroduits dans leur aquarium respectif et de nouveaux collecteurs d'œuf ont été installés. L'efficacité des traitements a été mesurée en comptant le nombre d'œufs de *Lamellodiscus* accrochés sur les collecteurs d'œufs tous les 5 jours après le traitement (Figure 3.8).

À l'issue de ce premier traitement, aucun des trois agents testés n'a semblé efficace pour déparasiter complètement les poissons de leurs *Lamellodiscus*. En effet au minimum 129 œufs ont été observés sur les collecteurs du bac traité au peroxyde d'hydrogène les 16 jours suivant ce premier traitement (Figure 3.8). Une diminution du nombre d'œufs produits dans les bacs traités au peroxyde d'hydrogène et au praziquantel a tout de même été observée (Figure 8). De manière intéressante, on observe un nombre plus élevé d'œufs produits dans le bac des poissons traité au Fenbendazole 5 jours post traitement puis une nette diminution du nombre d'œufs 10 jours post traitement. Il est donc possible que le traitement au Fenbendazole n'ait

pas réussi à décrocher les *Lamellodiscus* des branchies des poissons traités mais que cela ait stimulé des pontes d'œufs non viables chez certains parasites.

Les œufs de Diplectanidae pouvant s'accumuler facilement sur les substrats présents dans les aquariums (Vaughan *et al.* 2018 ; Hoai 2020), la ouate des filtrations mécaniques a été inspectée sous loupe binoculaire. Une accumulation d'œufs de monogènes a été observée ce qui a dû être à l'origine d'une réinfestation des poissons traités (Figure 3.9). Ainsi l'efficacité des agents antiparasitaires à l'issue de ce premier traitement n'a pas pu être mesurée.

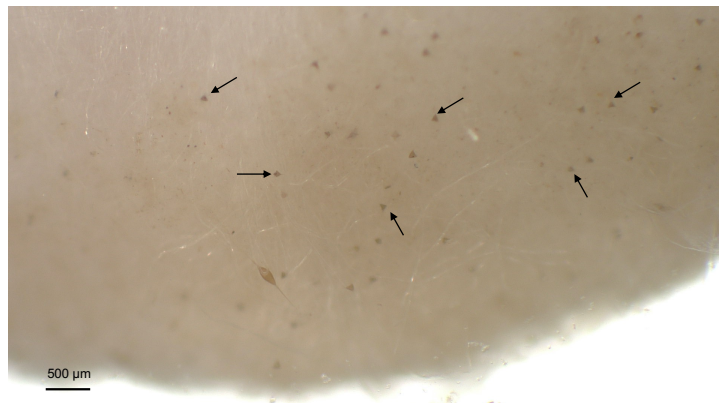


Figure 3.9. Œufs de *Lamellodiscus* (flèches) accumulés dans la ouate de filtration, observés sous loupe binoculaire

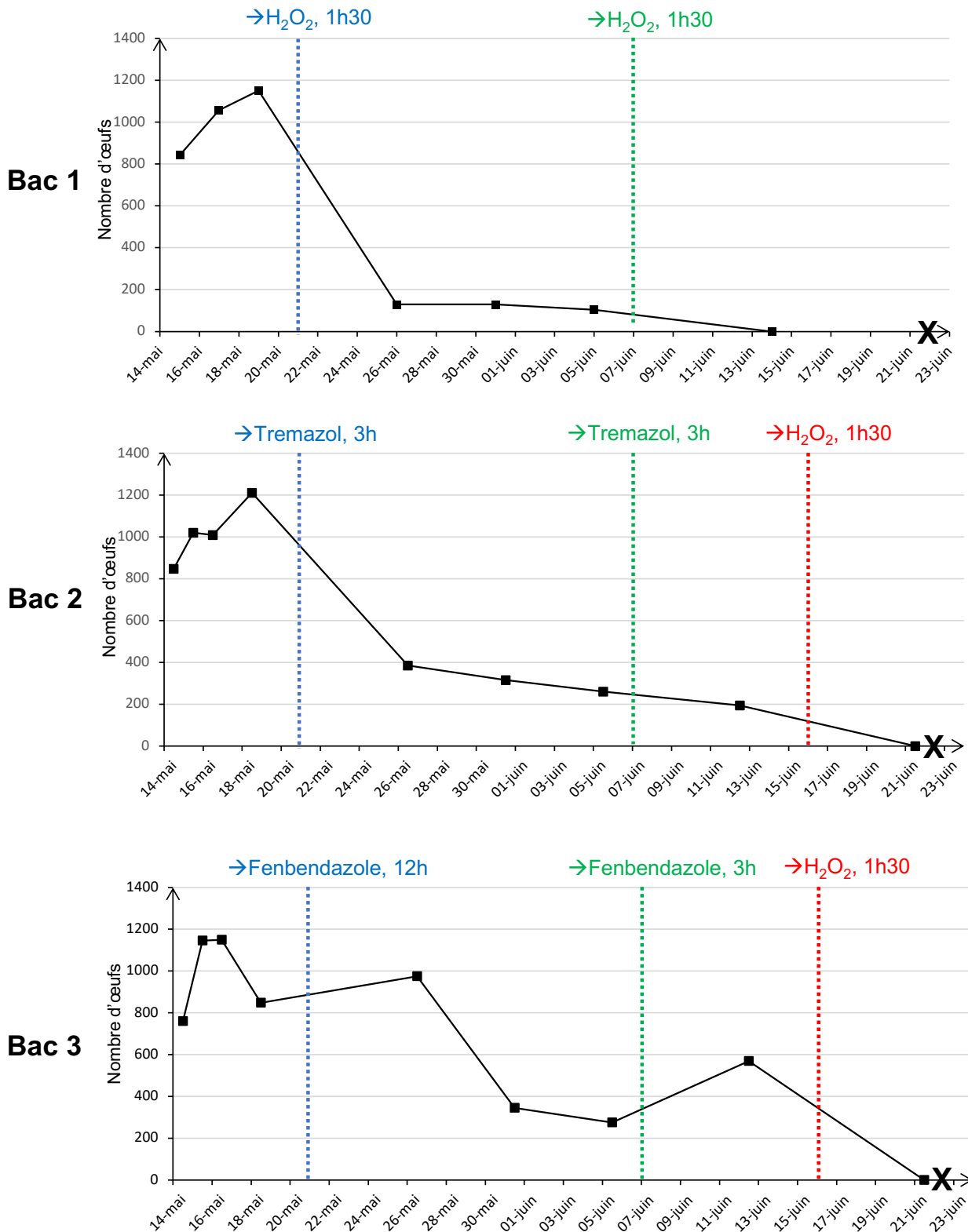
Le traitement a donc été renouvelé pour les 3 bacs le 7 juin 2021. Les agents antiparasitaires ont été appliqués de la même manière que lors du premier traitement. En parallèle, les aquariums ont été nettoyés à l'eau douce et les unités de filtrations ont été entièrement changées pour éviter toute réinfestation des poissons traités.

5 jours après de ce deuxième traitement, aucun œuf n'a été retrouvé dans le bac traité au peroxyde d'hydrogène (Figure 3.8). En revanche 195 œufs ont été dénombrés dans le bac traité au Tremazol et 570 œufs dans celui traité au Fenbendazole (Figure 3.8). De la même manière que lors du premier traitement, le Fenbendazole semble avoir stimulé des pontes chez des *Lamellodiscus* non décrochés des branchies puisqu'on observe une augmentation du nombre d'œufs produits dans ce bac à l'issue de ce deuxième traitement (Figure 3.8).

A l'issue de ce deuxième traitement, le Tremazol et le Fenbendazole ne démontrant pas une efficacité suffisante ont été écartés et le peroxyde d'hydrogène a été retenu comme agent antiparasitaire le plus efficace contre les monogènes *Lamellodiscus*.

Neuf jours plus tard, afin de confirmer l'efficacité du peroxyde d'hydrogène, les bacs n'ayant pas été correctement déparasités ont reçu un 3^{ème} traitement par balnéation au peroxyde d'hydrogène (1 h 30, 6,25 mL/L d'eau de mer). Pendant le traitement les bacs ont été nettoyés à l'eau douce et les unités de filtrations changées.

A l'issue de ce dernier traitement aucun œuf n'a été retrouvé sur les collecteurs d'œufs de deux bacs 5 jours post traitement. Pour confirmer l'efficacité du peroxyde d'hydrogène, un poisson des chaque bacs a été sacrifié et disséqué et les branchies observées sous loupe binoculaire. Aucun *Lamellodiscus* n'a été retrouvé dans les branchies des trois poissons disséqués confirmant l'efficacité du peroxyde d'hydrogène en balnéation pendant 1 h 30 à 200 ppm pour déparasiter les sars à tête noire de leurs *Lamellodiscus*.



Traitement 1 :

- Antiparasitaire en baignation
- Aquarium nettoyé et séché
- Filtrations rincées

Traitement 2 :

- Antiparasitaire en baignation
- Aquarium nettoyé et séché
- Filtrations remplacées

Traitement 3 :

- Antiparasitaire en baignation
- Aquarium nettoyé et séché
- Filtrations remplacées

X : Sacrifice d'un poisson

Figure 3.8. Suivi du nombre d'œufs de *Lamellodiscus* produits dans les 3 bacs au cours des traitements anti-parasitaires

3. Confirmation de l'efficacité du peroxyde d'hydrogène sur l'espèce *Pagellus erythrinus*

Cette deuxième expérience a été réalisée avec l'aide d'Océane Reneteaud dans le cadre de son stage de Master 2 que j'ai co-encadré du 1^{er} janvier au 30 juin 2022.

- **Modèle d'étude**

L'efficacité du traitement au peroxyde d'hydrogène a été testée sur une nouvelle espèce de sparidés, le pageot commun *Pagellus erythrinus*. Cette espèce a été choisie comme modèle d'étude pour cette deuxième expérience car ils ne possèdent qu'une espèce de *Lamellodiscus* spécialiste au sein de leurs branchies : *Lamellodiscus erythrini*. Cette caractéristique en fait un modèle intéressant pour procéder à de futures expériences de réinfestation à partir d'œufs dont on connaîtra l'espèce puisque récupérés à partir de bacs où sont maintenus ces pageots.

- **Méthodes et Résultats**

18 *Pagellus erythrinus* ont été capturés de nuit le 01 décembre 2021 et maintenus en quarantaine (circuit ouvert) pendant 20 jours avant d'être transférés dans 1 bac de 250 L en circuit fermé. 6 collecteurs d'œufs ont été immergés et la quantité d'œufs a été suivie de janvier à mars 2021 afin d'obtenir des charges parasitaires suffisantes pour procéder un test de déparasitage.

Avant le traitement 4 individus choisis aléatoirement ont été disséqués pour s'assurer qu'ils étaient bien parasités par des *Lamellodiscus* spp présentait une intensité parasitaire moyenne de 11,4 *Lamellodiscus* dans 3 arcs branchiaux par poisson.

Le 30 mars 2022, 14 poissons ont été répartis aléatoirement dans 3 bailles différentes (5/5/4) équipées d'un bulleur. Alors que nous devions traiter les poissons pendant 1h30 avec du peroxyde d'hydrogène concentré à 200 ppm (6,25 mL/L d'eau de mer), une erreur a été commise et les poissons ont été traité dans une plus grande quantité d'eau de mer ce qui a baissé la concentration de peroxyde d'hydrogène à 135 ppm (4,2 mL/L d'eau de mer).

Une fois traités, les poissons ont été transférés aléatoirement dans deux bacs propres de 110 litres chacun équipés de 3 nouveaux collecteurs d'œufs. L'efficacité des traitements a été

mesurée en comptant le nombre d'œufs de *Lamellodiscus* présents sur les collecteurs d'œufs 5 jours après le traitement (Figure 3.10).

A l'issue de ce premier traitement, une diminution de la charge parasitaire en *Lamellodiscus* a été constatée puisque seulement 5 œufs de *Lamellodiscus* ont été retrouvés dans un bac et 2 dans l'autre. Si la charge parasitaire des pageots a semblé avoir diminué à l'issue de ce premier traitement, une concentration trop basse en peroxyde d'hydrogène ne semble pas suffisante pour déparasiter entièrement les pageots communs de leur *Lamellodiscus*.

Un deuxième traitement a été réalisé 1 semaine plus tard dans les mêmes conditions que le premier mais à la bonne concentration en peroxyde d'hydrogène (200 ppm). Pendant le traitement d'1 h 30 les aquariums ont été vidés, nettoyés et séchés, les masses de filtrations et les collecteurs d'œufs changés. L'efficacité de ce nouveau traitement a été mesurée en comptant le nombre d'œufs de *Lamellodiscus* présents sur les collecteurs d'œufs tous les 5 jours après le traitement (Figure 3.10).

A l'issue de ce dernier traitement, aucun œuf n'a été retrouvé dans les 2 aquariums pendant le mois de suivi effectué post-traitement. Pour confirmer l'efficacité du traitement, un poisson de chaque bac a été sacrifié et disséqué. Aucun parasite *Lamellodiscus* n'a été retrouvé dans les branchies des deux poissons disséqués.

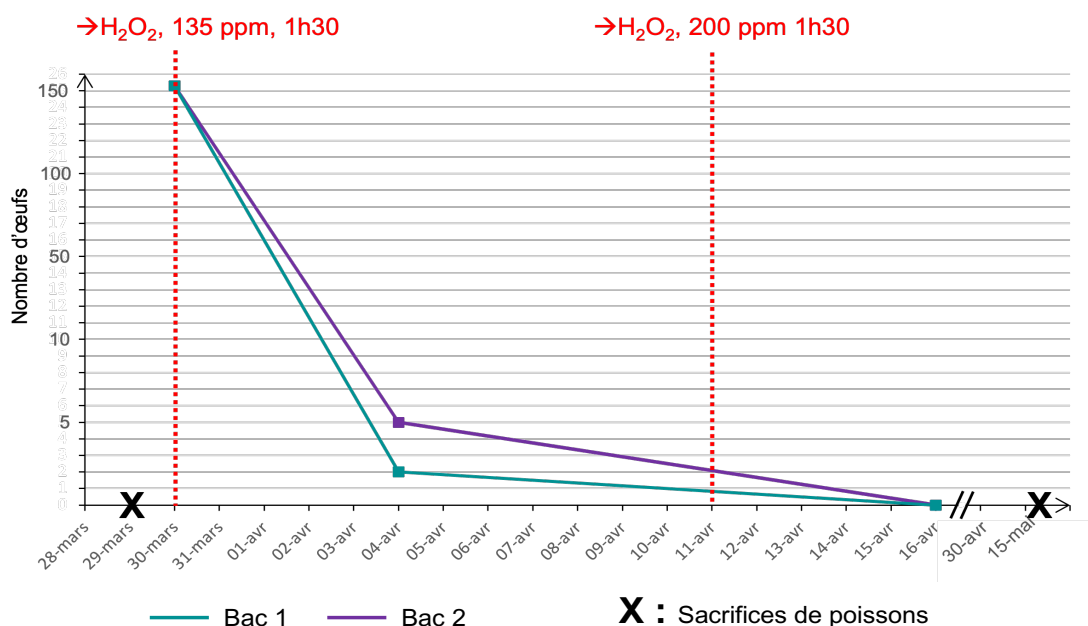


Figure 3.10. Suivi du nombre d'œufs de *Lamellodiscus* produits dans les 2 bacs au cours des traitements au peroxyde d'hydrogène

4. Conclusion, perspectives

Bien qu'une toxicité du peroxyde d'hydrogène ait déjà été rapportée chez certaines espèces de poissons, cela concerne principalement des expositions à des concentrations extrêmes (e.g. 5000 ppm, (Rach *et al.* 1997)) ou chroniques (Jia *et al.* 2020). Les sars à tête noire et les pageots communs semblent avoir bien supporté le traitement au peroxyde d'hydrogène puisqu'aucune mortalité n'a été observée chez les poissons traités.

Des concentrations trop faibles de peroxyde d'hydrogène ne semblent pas suffisantes pour déparasiter entièrement les sparidés et nous n'avons malheureusement pas pu démontrer l'efficacité d'une balnéation au peroxyde d'hydrogène en 1 seul traitement.

Cependant, deux balnéations au peroxyde d'hydrogène pendant 1 h 30 à une concentration de 200 ppm espacées d'une semaine semblent être un traitement efficace pour déparasiter entièrement les sparidés de leurs *Lamellodiscus* puisque tous les poissons qui ont subi deux balnéations au peroxyde d'hydrogène ont été entièrement déparasités de leurs *Lamellodiscus*.

Il est néanmoins possible qu'une seule balnéation au peroxyde d'hydrogène à la bonne concentration soit suffisante à condition qu'une attention particulière soit portée au nettoyage des aquariums et des filtres pendant les traitements et avant d'y réintroduire les poissons traités. En effet les œufs de *Lamellodiscus* sont susceptibles de s'accrocher sur n'importe quel substrat présent dans les aquariums. Il est donc conseillé de vider l'aquarium, de le rincer à l'eau douce, de frotter les parois et de remplacer entièrement les unités de filtration. Si les unités de filtrations ne peuvent pas être remplacées pour des raisons de logistique, il est néanmoins conseillé de changer entièrement la ouate servant de filtration mécanique et de frotter à l'eau claire les parties plastiques du filtre. Les filtrations biologiques pourront être rincées à l'eau de mer filtrée.

Les collecteurs d'œufs semblent être un bon proxy pour évaluer l'état d'infestation des sparidés en *Lamellodiscus* et évaluer la prévalence en *Lamellodiscus* au sein des branchies. En effet, d'après nos observations, l'absence d'œufs sur les collecteurs a toujours été synonyme d'absence de parasite adulte au niveau des branchies.

L'utilisation de ce protocole de déparasitage était une première étape nécessaire à de futures expériences de suivi du microbiote externe du mucus des sparidés en réponse à une infestation artificielle en monogènes. Cependant, l'impact du peroxyde d'hydrogène sur le microbiote externe des sparidés devra également être évalué car susceptible d'affecter les communautés microbiennes.

D. Caractérisation morphologique des stades de vie de *Lamellodiscus*

1. Contexte

Alors que l'identification des monogènes adultes repose principalement sur des critères morphologiques, la morphologie des larves de monogènes est à ce jour peu décrite. Pourtant, elle joue un rôle déterminant dans le cycle de vie du parasite, responsable à la fois de la détection, la localisation de son hôte mais également de son attachement à ce dernier. Si des facteurs sont connus pour favoriser la ponte et l'éclosion ou la détection de l'hôte par les monogènes, peu d'études étudient les structures morphologiques externes liées à ces fonctions en particulier chez les Monopistochotylea. La larve représente un stade de développement complexe et une caractérisation plus approfondie de sa morphologie et notamment de ses structures sensorielles ouvrirait de nouvelles perspectives pour la compréhension des déterminants de la spécificité des monogènes pour leurs hôtes.

L'objectif était de caractériser pour la première fois le stade larvaire des *Lamellodiscus* par microscopie optique et électronique à balayage. Pour cette première description nous nous sommes focalisés sur l'espèce spécialiste retrouvée dans les branchies de *Pagellus erythrinus*, *Lamellodiscus erythrini*.

2. Principaux résultats

21 larves et 19 œufs de *Lamellodiscus erythrini* ont été observés en microscopie électronique à balayage (MEB) et 15 larves en microscopie optique. Nous avons pu mettre en évidence que les œufs de *L. erythrini* étaient lisses, tétraédriques et prolongés d'un long filament polaire à une de ses extrémités. Quand il vient d'être pondu l'œuf est marron, opaque, hermétique, puis devient transparent avec la maturation laissant apparaître la larve et ses tâches oculaires. L'opercule par lequel sort la larve est prédécoupé lorsque l'œuf est mature, pour faciliter son émergence. La larve de *L. erythrini* est allongée, cylindrique et présente une ciliature très

développée recouvrant trois zones : une zone antérieure, une zone pleurale et un cône postérieur. Les cellules ciliées sont jointives et sont organisées en une mosaïque organisée de gouttelettes sphériques où chaque cil vient s'insérer. Le tégument de la larve présente des microvillosités ainsi que des sensilles. 9 paires de sensilles dorsales ont pu être identifiées sur toutes les larves observées et quelques paires supplémentaires sur certaines larves en microscopie électronique à balayage. Le hapter est une structure fermée constituée de six paires de crochets marginaux et une paire de crochet centraux. Un phototropisme positif des larves fraîchement écloses de *L. erythrini* a été observé.

3. Travail réalisé

La mise en place du protocole de fixation pour la microscopie électronique à balayage a été réalisé avec l'aide de Marie-Line Escande (Plateforme BioPIC de l'OOB) et la prise des photos en MEB a été supervisée par Yonko Gorand (plateforme EnRMAT de Perpignan). J'ai réalisé le reste de cette étude, le maintien des poissons en aquariums, le prélèvement et le maintien des œufs *in vitro*, le protocole de fixation pour la microscopie électronique à balayage, les prises d'images, de vidéos au microscope optique et la rédaction du manuscrit ci-dessous.

4. Manuscrit

**First morphological insights on eggs and larvae of
ectoparasitic *Lamellodiscus* (Monogenean, Diplectanidae) by
light and scanning electron microscopy**

Revault Judith*¹, Marie-Line Escande¹, Yves Desdevises¹, Elodie Magnanou¹

¹Sorbonne Université, CNRS, Biologie Intégrative des organismes marins, BIOM,
Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

In Preparation

Introduction

Monogeneans are a very diverse class of ectoparasites that are widespread in all aquatic environments, commonly found on teleost skin and gills. They have a direct life-cycle, meaning that they only require a single host. This characteristic, combined with their hermaphroditism, makes them harmful pathogens in aquaculture where high teleost densities favor the completion of monogenean life cycle and culture cages provide substrates for the entanglement of eggs (Hutson *et al.* 2018; Vaughan *et al.* 2018; Hoai 2020). While traditionally the classification and identification of adult monogenean species rely on morphological criteria (Chisholm & Whittington 1998; Amine *et al.* 2006, 2007), there is a lack of comprehensive descriptions of the morphological structures involved in the early-stages of their life cycle. Adult oviparous monogeneans lay eggs in the water column that are passively hooked to substrates with their polar filament. The eggs then release ciliated larva, named oncomiracidium, that swim and actively seek for suitable host(s) over short period and distances to colonize their skin (Kearn 1967; Buchmann 2002). The larvae then lose their ciliature, and migrate from the skin to the gills of their fish host (Tinsley & Owen 1975; Tinsley 1983; Kearn 1985). Oncomiracidia play then a crucial role in the biology of monogeneans as they are involved in the detection, localization, and attachment to their host. In the literature, most studies focused on aquaculture species and factors enhancing monogenean host infestation success. Thus, monogeneans have been described to display particular egg-laying and hatching rhythms in response to environmental factors such as light (Shirakashi *et al.* 2021), mechanical disturbance (Whittington & Kearn 2011), periodicity (Woo *et al.* 2024) and temperature (Zhang *et al.* 2015) and to host related factors such as their mucus (MacDonald 1974) to maximize opportunities to infect fish host. There is clear evidence that free living stages (i.e., eggs and larvae) exhibit complex behavior in response to many stimuli, suggesting sensory-mediated events but little is known about the morphological structures involved in such mechanisms.

One reason to explain these gaps in the morphological characterization of early-stage life is that working on oncomiracidia is challenging because they are nearly impossible to collect in the wild, they are fragile, very small, and with a short life span (Hutson *et al.* 2018; Shirakashi *et al.* 2021). Efforts are needed to develop easy and non-invasive experimental set-ups to facilitate and encourage the study of the morphology of early life stages of monogeneans.

The present study aims to characterize the larval stage of the genus *Lamellodiscus*, a monogenean belonging to Diplectanidae family (Monopistocotylea) for which, to our knowledge, no images of larvae exist. Yet, this genus is particularly abundant on Mediterranean sparid hosts and has been studied for a long time, and its pattern of host specificity is considered as well known (e.g., Euzet & Oliver 1966, 1967; Oliver 1973, 1974; San Filippo 1978; Euzet 1984; Neifar 1995; Desdevises 2001; Amine *et al.* 2006, 2007; Boudaya *et al.* 2009; Diamanka *et al.* 2011). For this first description, a specialist species of the sparid *Pagellus erythrinus* gills was chosen, *Lamellodiscus erythrini*. This species was chosen for simplicity because it is the only *Lamellodiscus* species parasitizing *Pagellus erythrinus*. In this study, we focused on the description of the external morphology of *L. erythrini* eggs and larvae using a non-invasive technique for their recovery. The morphological structures of *L. erythrini* eggs and larvae were detailed by combining light and scanning electron microscopy. Linked to the sensory structures identified from the morphological study, several behavioral traits of the oncomiracidia of *L. erythrini* were also observed using video recordings following hatching.

Materials and methods

Fish sampling was conducted in July 2023 in the bay of Banyuls-sur-Mer (northwestern Mediterranean Sea, France). 8 wild *Pagellus erythrinus* individuals were caught at night, dazzled by torchlight, and caught in a net. Immediately after their capture, fish were carefully brought to the laboratory. They were placed into a 250 L closed circuit aerated aquarium for 10 weeks in which egg collectors were immersed. Eggs collectors are simple leaded nylon threads placed in the water column on which eggs are passively hooked (Supplementary figure 3.1A). Eggs were recovered by carefully lifting the nylon threads and searched under dissecting microscope. Other oviparous monogenean species parasitizing *Pagellus erythrinus* such as *Sparicotyle* sp. are bigger and their eggs were easily distinguishable from those of *Lamellodiscus erythrini* (Supplementary figure 3.1B-C). *Lamellodiscus erythrini* eggs were placed *in vitro* at 18°C in a Petri dish filled with filtered seawater (1 µm) complemented by streptomycin (20 mg/L) (Oliver 1987). Every day, the culture medium was changed and eggs were observed under a dissecting microscope until they hatch. Right after hatching, larvae and hatched eggs were flattened between a glass slide and a coverslip and examined using light microscopy with oil immersion. Larvae and eggs were fixed for scanning electron microscopy with seawater, 0.4 M Cacodylate, and 2.5 % glutaraldehyde for 2 h at 18 °C and stored at 4 °C.

After larvae and eggs collection was completed, organisms were washed three times for 15 minutes in filtered seawater and 0.4 M Cacodylate. Successive EtOH baths (70, 95, and 100 %) were used to dehydrate the organisms. An ascending series of increasing concentrations of hexamethyldisilazane (HMDS) was applied to the samples until it reached 100 %. Petri dishes with specimens and pure HMDS were then placed under a vertical laminar flow hood and air-dried overnight until HMDS complete evaporation. Organisms were mounted on an aluminum stub with the help of double-sided carbon tape and sputter-coated with about 5 nm conductive layer of Gold-Palladium (60/40) before observation with JEOL JSM 1T800 SHL scanning electron microscope. Observations were performed in high vacuum mode, using the in-chamber Everhart-Thornley secondary electron detector (SED).

Video recordings were carried out using a light microscope (Motic Panthera) equipped with a digital camera (Motic, Moticom 1080).

Results

A regular and easy collection of *Lamellodiscus erythrini* eggs was achieved using 9 nylon threads (i.e., egg collectors, Supplementary figure S3.1) that were immersed in the aquarium containing the 8 wild *Pagellus erythrinus* individuals. After incubating the eggs, the larvae hatched between 1 and 5 days later depending on the maturity of the collected eggs. For this study, we examined 15 larvae under light microscopy; and 21 eggs and 19 larvae under scanning electron microscopy (SEM). Videos of the larvae hatching were recorded (Supplementary file S3.1).

Description of *Lamellodiscus erythrini* eggs

Lamellodiscus erythrini eggs are tetrahedral with a smooth surface (Figure 3.11A-B). Some eggs fixed for SEM were distorted (Supplementary figure S3.2) and their structure were better maintained when eggs were mature or hatched (Figure 3.11A). The ridges measured $54 (\pm 4.8)$ μm in length. One edge of the eggs was extended by a long polar filament which was about 320 μm long, i.e., more than 5 times the length of the egg. The polar filament ended in a slight sticky swelling (Supplementary figure S3.2). Under light microscopy and just after egg has been laid, the egg is brown and opaque (Figure 3.11C). Over the incubation days, it becomes clearer and exhibits a granular appearance (Figure 3.11C) under light microscopy, gradually revealing the pigmented eye spots of the larvae (Figure 3.11D). The larvae are folded inside the eggshell

and the anterior part of the oncomiracidium is directed towards the operculum (Figure 3.11D) During maturation, egg exhibit a pre-cut operculum (Figure 3.11A-B), which facilitates the emergence of the larvae from the egg shell. Once the larva has emerged, the opercula, which is open over $18 (\pm 2.9) \mu\text{m}$, may or may not remain attached to the egg (Figure 3.11E-G).

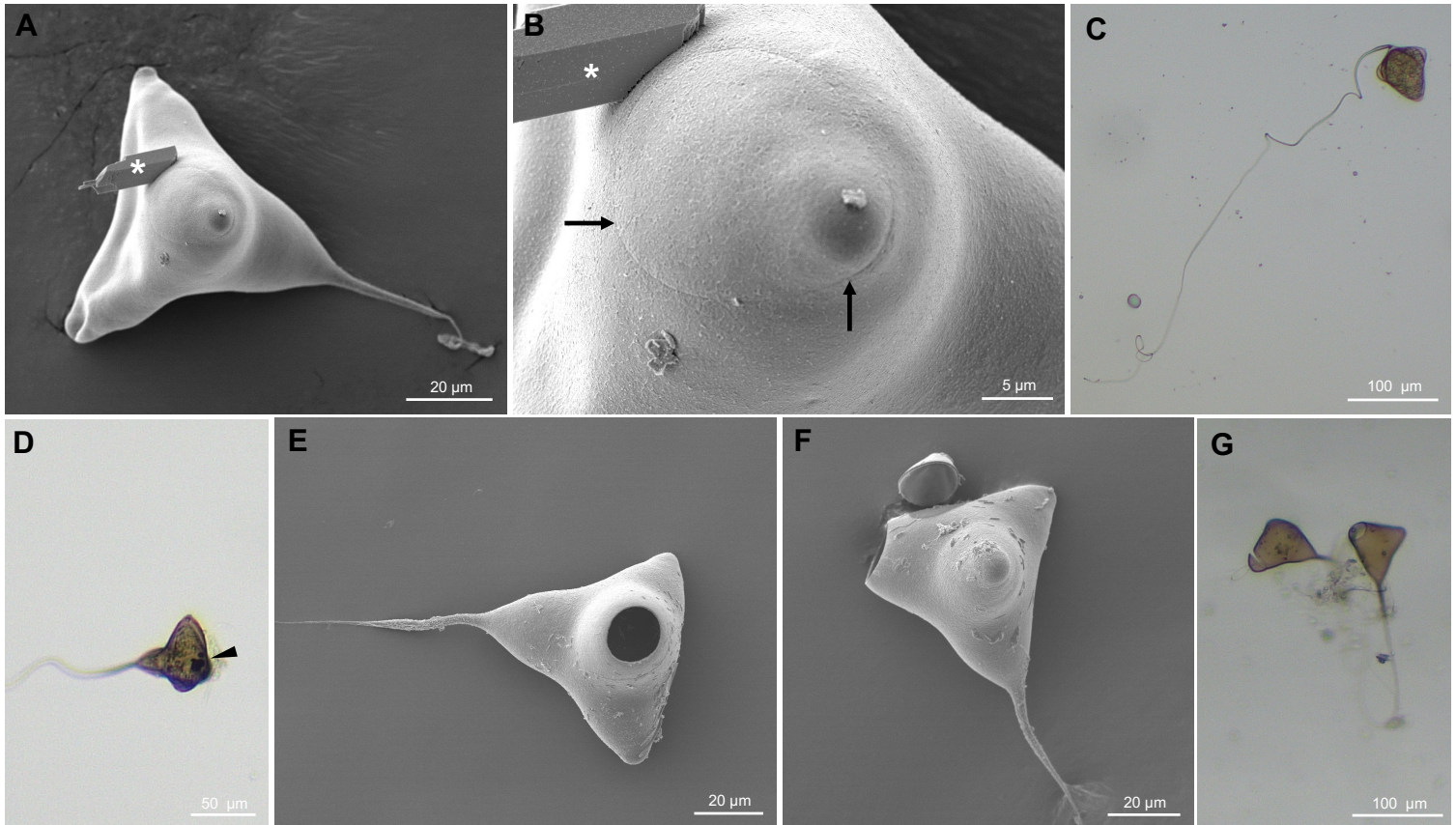


Figure 3.11: Light and scanning electron micrographs of *Lamellodiscus erythrini* eggs. (A-B) Scanning electron micrographs of a pre-operculated (arrows) egg with an artefact (star) (C) Embryonated egg with granular appearance and its polar filament in light microscopy. (D) Mature egg with a folded oncomiracidium visible in transparency (arrowhead) with its anterior part oriented toward the operculum. (E-G) Empty eggshells after oncomiracidium hatching, opercula may or may not remain attached.

***Lamellodiscus erythrini* hatching**

A few hours before hatching, the larva begins to move inside the egg, slowly rotating around the anteroposterior axis of its body (Figure 3.12A, Supplementary file S3.1). Once the egg reaches maturity, hatching could be triggered by changing the culture medium or mimicking water current with a micropipette. A few seconds before hatching, the contraction movements of the oncomiracidium body, combined with ciliary activity, accelerate until the

operculum opens, allowing the larva to be released from the egg shell (Figure 3.12A, Supplementary file S3.1). Freshly hatched oncomiracidia display a positive phototaxis.

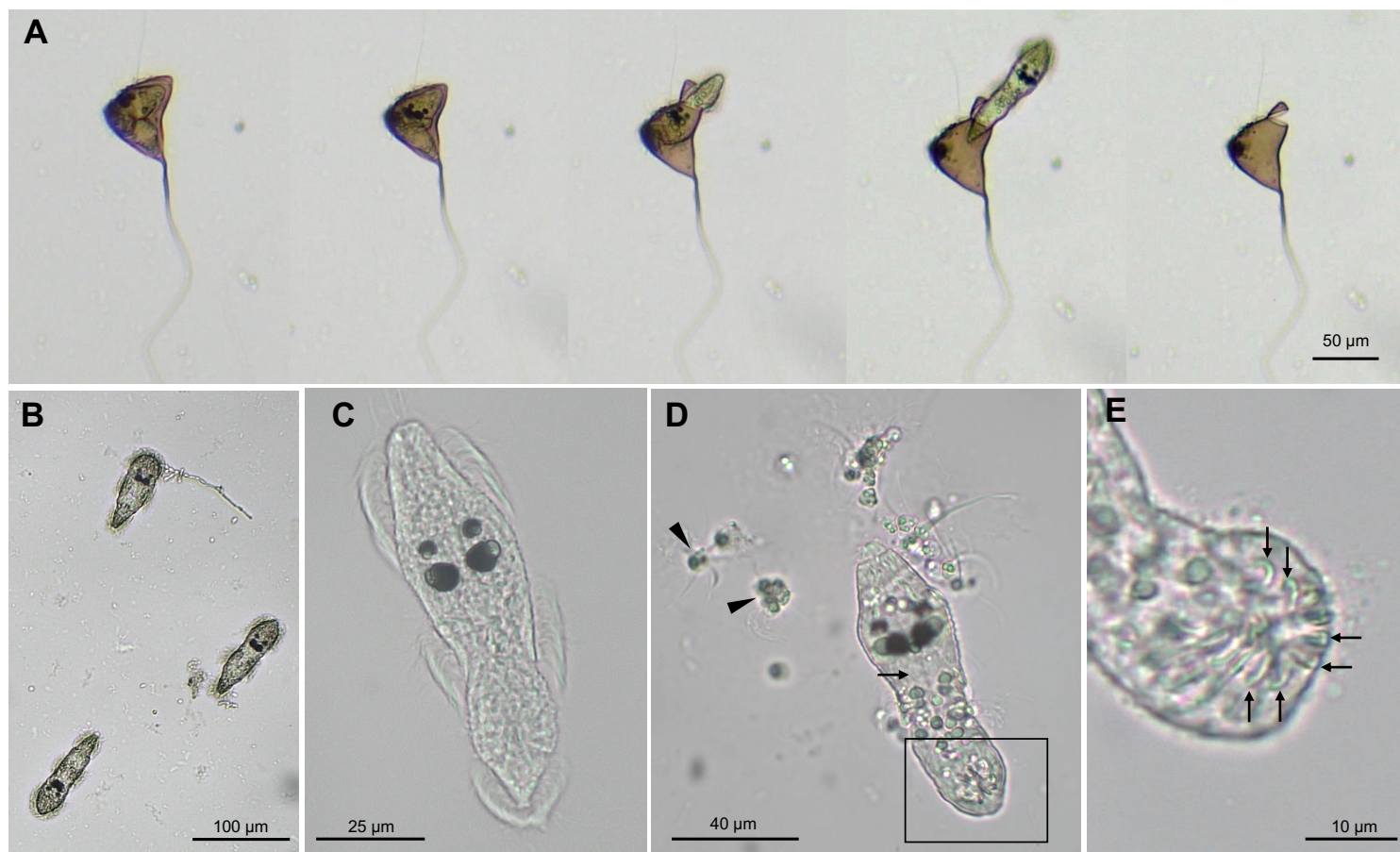


Figure 3.12: Light micrographs of *Lamellodiscus erythrini* egg and larvae. (A) Snapshots of video of hatching (see Supplementary file S1 for the full video). (B-C) Freshly hatched larvae. (D) Oncomiracidium rejecting its ciliated cells (arrowheads); pharynx (arrow), haptor (frame). (E) Detail of a deciliated larva, sclerified parts of the haptor (arrows).

Description of *Lamellodiscus erythrini* oncomiracidium

The oncomiracidium of *Lamellodiscus erythrini* is elongated and cylindrical (Figure 3.12B-C, Figure 3.13A) and measured about $90.5 (\pm 4.8) \mu\text{m}$ in length, $21.2 (\pm 2) \mu\text{m}$ in width when measured under light microscopy and $60.5 (\pm 4.8) \mu\text{m}$ in length, $13.9 (\pm 2.6) \mu\text{m}$ in width when measured under SEM.

Larvae have highly developed cilia covering 4 distinct areas: one on the anterior part, two on each lateral part of the body more extensively on the ventral side than on the dorsal side, and one as a fully ciliated posterior cone (Figure 3.12C, Figure 3.13A-B). Non-ciliated parts of the oncomiracidia tegument display a corrugated aspect with microvilli (Figure 3.13C). Ciliated

cells are joined together, spherical and contain a mosaic of organized spherical droplets onto which each cilium is implanted (Figure 3.13D-E).

On their anterodorsal part, oncomiracidia possess two pairs of well-defined eyespots with two pairs of crystalline lenses that are only visible in light microscopy (Figure 3.12B-C). The most anterior eyespots are smaller, and their crystalline lenses are oriented posterior-laterally. In contrast, the posterior eyespots are larger, and the crystalline lenses are oriented anterior-laterally. The ventromedial and cylindrical pharynx is barely visible by light microscopy (Figure 3.12D), and imperceptible under scanning electron microscopy due to its location between the two extensively ciliated pleural areas on the ventral surface.

The haptor of the larvae is located on the ventral side just in front of the ciliated cone (Figure 3.12C-E). It consists of 14 hooklets with a central pair of hooks. Sclerified parts of the haptor are visible in transparency under light microscopy (Figure 3.12C-E). Most larvae prepared for scanning electron microscopy exhibit a folded haptor (Figure 3.14A). However, one larva with an unfolded haptor was observed, though the 14 hooklets were not visible (Figure 3.14B-C). SEM micrographs revealed ciliated sensory organs or sensilla on the dorsal surface of hatched oncomiracidia, structures not visible under light microscopy (Figure 3.13C, Figure 3.15A-C). These sensilla consist of a single cilium that emerges through a pit in the epidermis bordered by a crown of microvilli (Figure 3.13C, Figure 3.15A-C). In all oncomiracidia examined under SEM, we have identified 9 pairs of mid-dorsal sensilla forming a longitudinal row like a buttonhole, and two pairs of sensilla on either side of the fourth and fifth pair of mid-dorsal sensilla starting from the anterior part of the larva (detailed in yellow on Figure 3.15D).

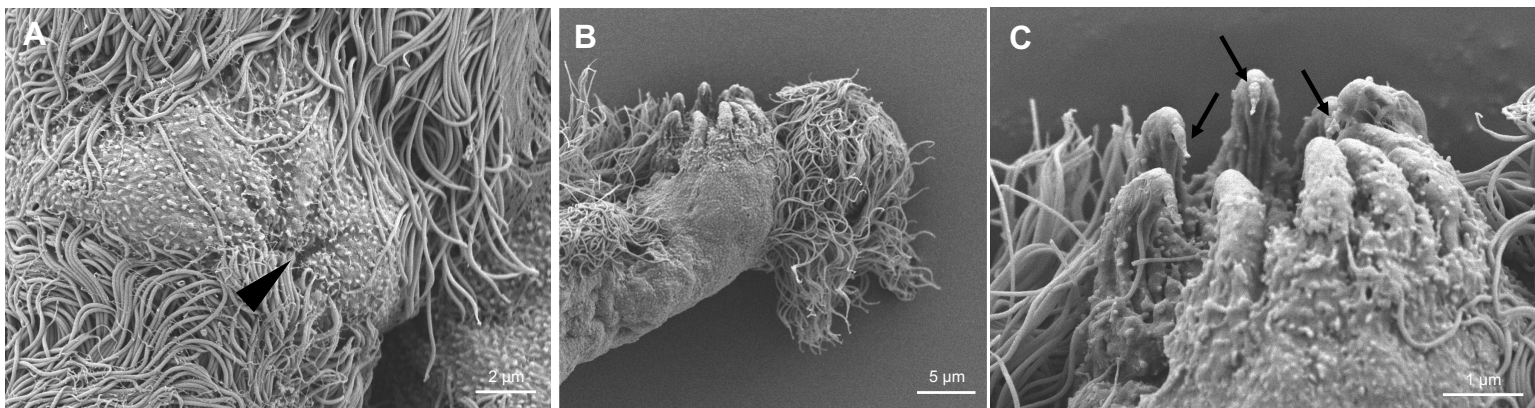


Figure 3.14: Scanning electron micrographs of detailed parts of the haptor of *Lamellogadus erythini* oncomiracidia (A) Folded haptor (arrowhead), ventral view. (C-D) Unfolded haptor with some apparent hooklets (arrows).

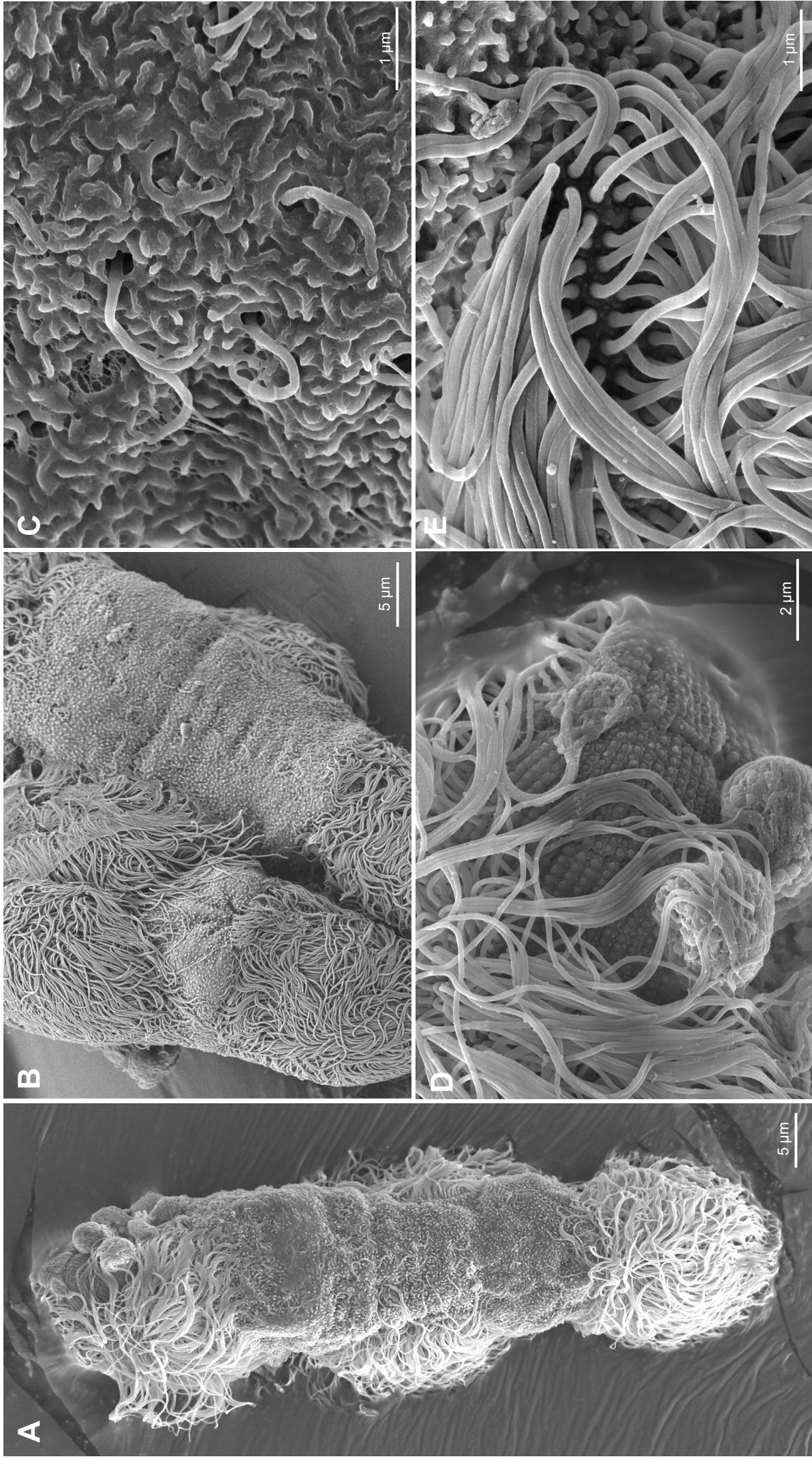


Figure 3.13: Scanning electron micrographs of *Lamellogadiscus erythrini* oncomiracidia. (A) Oncomiracidium, dorsal view. (B) Two oncomiracidia, dorsal view. (C) Detail of the non-ciliated part of the tegument and the insertion of the dorsal sensilla (D) Detail of ciliated cells from the anterior ciliated zone that have lost some of their cilia. (E) Detail of cilia insertion.

In some of these oncomiracidia, supplementary dorsal sensilla were identified (detailed in pink on Figure 3.15D). No sensilla were observed on the ventral part because the majority of the larvae were dorsally oriented and as in the case of the pharynx, the cilia is more developed than in dorsal side and could potentially hide it (Figure 3.13B).

A few hours after hatching, some larvae slow down their movements until they either settle at the base of the plate wells to die or to initiate their metamorphosis by rapidly shedding their ciliated cells through contraction and developing their haptor (Figure 3.12D, Supplementary file S3.2).

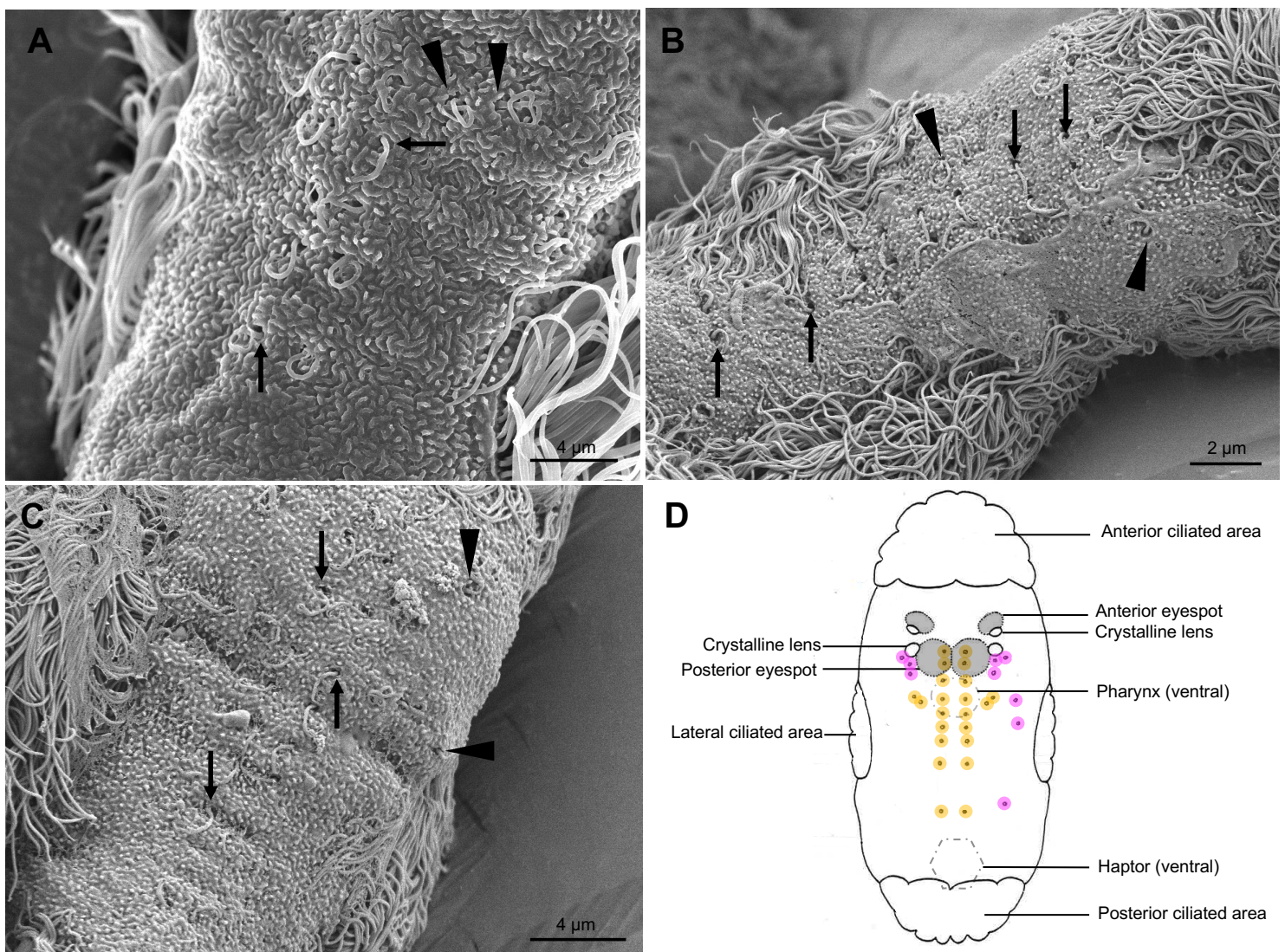


Figure 3.15: (A-C) Scanning electron micrographs of *Lamellogadus erythrini* oncomiracidia, dorsal views; mid pairs sensilla (arrows); supplementary sensilla (arrowhead). (D) Scheme of a freshly hatched oncomiracidia of *Lamellogadus erythrini* on dorsal view, adapted from Oliver (1987). Sensilla observed in all *Lamellogadus erythrini* oncomiracidium observed are highlighted in yellow, sensilla observed in some *L. erythrini* oncomiracidium are highlighted in pink.

Discussion

To our knowledge, we present here the first images of *Lamellodiscus* larvae, organisms that until now have been represented as scheme in the literature (Oliver 1987). The experimental set-up we used to collect eggs and obtain larvae was based on an egg collection system that is cheap and easy to install in any aquarium. This system also provides an effective and non-invasive proxy for determining the oviparous monogenean species present on fish hosts. It can be used to study the biology of monogenean's eggs and larvae without handling and dissecting the host, thereby minimizing the associated stress (Ashley 2007). The size of oncomiracidia measured by light microscopy differed by 33 % from those measured by scanning electron microscopy. This difference has already been reported by Oliver (1987) in another Diplectanidae species and may be due to the elongation caused by the pressure of the coverslip, or to contraction caused by the fixation in glutaraldehyde, or both causes simultaneously.

The presence of a long polar filament and a slight sticky swelling on *L. erythrini* eggs allows them as many other monogenean species to adhere to substrates once laid (Kearn 1986a). This could prevent the eggs from being carried away by water currents and ensures that they remain close to the host's habitat (Kearn 2004). In some species, such as *Dawestrema cycloancistrum* (Maciel *et al.* 2017) and *Dionchus remorae* (Whittington 1990) the eggs have even been shown to attach directly to the gill filaments of the host fish. However, the majority of monogenean eggs are shed by gill aeration or directly transported into the environment by currents after laying (Hutson *et al.* 2018). Since a suitable host species is not usually nearby eggs, different characteristics have the effect to maximize host colonization success. For example, we observed that mechanical disturbance elicits egg hatching, as previously reported (Ktari & Maillard 1972; Kearn 1986a; Whittington & Kearn 1988; Glennon *et al.* 2006). Several hypotheses have been formulated to explain such trait in monogeneans. Turbulence have been suggested to be signal for hatching as this mechanical disturbance mimics the host passage close to the egg (MacDonald 1974; Whittington & Kearn 1988, 2011). We observed that fixation of immature eggs in glutaraldehyde results in a distortion of their structure, except when they were pre-cut or hatched. These findings suggest that immature eggs are hermetic, a well-known characteristic contributing to recurring reinfections in aquaculture linked to their resistance to chemical treatments (Shirakashi *et al.* 2010; Vaughan *et al.* 2018). Interestingly, the presence of mucus stimulates eggs hatching in some

monogenean species as *Acanthocotyle lobianchy* (MacDonald 1974) and *Discocotyle sagittata* (Gannicott & Tinsley 1998). The mechanisms by which mucus penetrates the eggshell and promotes egg hatching could be linked to this pre-opening observed in mature eggs. This could also explain why glutaraldehyde better preserves the overall structure of pre-cut eggs by penetrating the eggshell through this opening.

Once the egg hatches, the oncomiracidium of *L. erythrini* must quickly find and reach its host to transition from a free-living to a parasitic lifestyle. We observed that freshly hatched *L. erythrini* larvae exhibit a positive phototaxis, certainly using their light sensory organ (eyespots and crystalline lenses), morphological structures present in many other monogenean species (Whittington *et al.* 1999; Hendrix 2004; Maciel *et al.* 2017; Wan Sajiri *et al.* 2023). Other monogenean larvae are known to possess this positive phototaxis trait (Whittington *et al.* 1999; Shirakashi *et al.* 2021) and photoreceptors could be used to orient the larvae in the water column (Randel & Jékely 2016). Positive phototaxis would help the larvae to move toward the surface, likely increasing the chance of encountering a suitable fish host leading to higher probability of infection (Shirakashi *et al.* 2021). However, the species *L. erythrini* is specialist and only parasitizes *Pagellus erythrinus*, a bottom-dwelling, semi-pelagic and demersal fish. So, this trait may not necessarily enhance the *L. erythrini* larvae's opportunities to encounter their unique host species. Nevertheless, oncomiracidia of other monogenean species of benthic fish have been documented to also exhibit positive phototactic responses as *Benedenia epinepheli* (Shirakashi *et al.* 2021) or *Entobdella solea* (Kearn 1980). In *E. solea* and in two monogenean species from the genus *Kuhnina*, it has been observed that responses to light evolve with larvae age and maturation (Kearn 1980; Whittington & Kearn 1990). Thus, the hypothesis of Shirakashi *et al.* (Shirakashi *et al.* 2021) could also be apply to *L. erythrini*: larvae may initially exhibit positive phototaxis to enhance dispersion which changes with age to negative phototaxis to help the larvae reach their benthic host. However, this positive phototaxis could be an inherited trait without necessarily being an optimized behavior for each species. Finally, photoreceptors might play a role at the embryonic stage: as the eggshell becomes clearer and transparent along larvae maturation, detecting light could be advantageous for determining the right time of hatching. Indeed, light intensity has been reported as a factor influencing egg hatching as it can maximize opportunities to co-occur with an easily accessible host (Kearn 1986b; Whittington & Kearn 1989; Gannicott & Tinsley 1997; Hoai & Hutson 2014).

External morphological features such as microvillousities and ciliation pattern of the oncomiracidia of *L. erythrini* observed in the present study are coherent to what was reported for another *Lamellodiscus* species previously described, *Furnestinia echeneis* (belonging to *Lamellodiscus* genus based on phylogenetic analysis (see Desdevises (2001)) (Lambert 1980; Oliver 1987) or to other Monopisthocotylea species (Bychowsky 1957; Whittington *et al.* 1999). However, Oliver (1987) described the haptor of *F. echeneis* and *Diplectanum aequans* larvae as an “open cup” structure. Other authors (Yoshinaga 2002; Kearn 2004) have described the haptor of other monogenean oncomiracidia species as “an open-disk-shaped”. The haptor structure we have observed on a larva fixed for SEM, and the sclerotized parts visible in light microscopy looked more like a closed structure folded inside the larva's body until its deployment.

We also observed the presence of several pairs of dorsal sensilla in *L. erythrini* oncomiracidia, although we were unable to exhaustively determine their number and position. However, easily identifiable sensilla described in the larvae of *F. echeneis* by Oliver (1987) do not appear to be present in *L. erythrini*, such as the third pair located against the ciliated pleural areas. We could not identify any sensilla on the ventral part, as it was described in other monogenean species using silver nitrate staining (Lambert 1980; Chisholm 1998; Cribb *et al.* 2003). The existence of sensilla on monogenean oncomiracidia has been reported for a long time (Lambert 1980), yet the exact role of these structures remains unclear. Hypotheses on the possible functions of sensilla for host finding can however be proposed as some of these structures disappears when the larvae attach to its host (Lambert 1980). For example, Cribb (Cribb *et al.* 2003) has shown that 24 hours after host invasion, *Merizocotyle icopae* post-oncomiracidia lost their 8 pairs of mid-dorsal sensilla and authors suggested that these sensilla act as chemoreceptors, involved in recognizing chemical signals emitted by the host. It has been proposed that sensilla play a role as mechanoreceptors or georeceptors (Buchmann 2002) as oncomiracidia of *Entobdella hippoglossi* had been shown to exhibit a very strong geotactic response (Yoon 1998). Villar-Torres *et al.* (2018) showed that *Sparicotyle chrisophrii* larvae display upward and downward behavior in the water column, which could be interpreted as a geotactic response. Furthermore, as proposed by other authors (Whittington 1987; Hodova *et al.* 2010), the dorsal sensilla of monogenean larvae might act as rheoreceptors in detecting water currents. However, here too, evidence of the involvement of the sensilla as sensory receptors is missing. Nevertheless, the absence of sensilla in certain

unciliated monogenean larvae, such as *Udonella caligorum* (Lambert 1980), supports the hypothesis that dorsal sensilla play a significant role during the free-swimming stage.

All these findings highlight the need to continue the morphological characterization of monogeneans eggs and larvae by combining various microscopy technics to provide a comprehensive view of their structures such as the haptor or their sensilla. Finally, the Sparid-*Lamellodiscus* association emerges as a promising biological model to study the morphological structures of early monogenean life stage. Indeed, exploring the morphological adaptation to host-specific biological and ecological traits, such as in mediterranean sparids (i.e., lifestyle, social behavior, position in the water column, diet, life-cycle) and their various specificity profiles undoubtedly presents compelling research directions.

References

- Amine, F., Euzet, L., & Kechemir-Issad, N., 2006. Description de deux nouvelles espèces de *Lamellodiscus* Johnston & Tiegs, 1922 (Monogenea: Diplectanidae) du groupe morphologique 'ignoratus', parasites de *Diplodus sargus* et *D. vulgaris* (Teleostei: Sparidae). *Systematic Parasitology*, 64 (1), 37–45.
- Amine, F., Euzet, L., & Kechemir-Issad, N., 2007. *Lamellodiscus theroni* sp. nov. (Monogenea, Diplectanidae), a gill parasite from *Diplodus puntazzo* (Teleostei, Sparidae) from the Mediterranean Sea. *Acta Parasitologica*, 52 (4), 305–309.
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104 (3), 199–235.
- Boudaya, L., Neifar, L., & Euzet, L., 2009. Diplectanid parasites of *Lithognathus mormyrus* (L.) (Teleostei: Sparidae) from the Mediterranean Sea, with the description of *Lamellodiscus flagellatus* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae). *Systematic Parasitology*, 74 (2), 149–159.
- Buchmann, K., 2002. Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology*, 32 (3), 309–319.
- Bychowsky, 1957. Monogenetic trematodes: their systematics and phylogeny.
- Chisholm, L.A., 1998. Ciliated cells and chaetotaxy of the larvae of seven species of monocotylid monogeneans (Platyhelminthes) from Heron Island, Great Barrier Reef, Australia. *Parasitology Research*, 84 (10), 828–834.
- Chisholm, L.A. & Whittington, I.D., 1998. Morphology and development of the haptors among the Monocotylidae (Monogenea). *Hydrobiologia*, 383 (1), 251–261.
- Cribb, B., Chisholm, L., Gould, R., & Whittington, I., 2003. Morphology, ultrastructure, and implied function of ciliated sensory structures on the developmental stages of *Merizocotyle icopae* (Monogenea: Monocotylidae). *Microscopy Research and Technique*, 62 (3), 267–276.
- Desdevises, Y., 2001. The phylogenetic position of *Furnestinia echeneis* (Monogenea, Diplectanidae) based on molecular data: a case of morphological adaptation? *International Journal for Parasitology*.
- Diamanka, A., Boudaya, L., Toguebaye, B.S., & Pariselle, A., 2011. *Lamellodiscus euzeti* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae), a parasite from *Dentex canariensis* and *D. gibbosus* (Teleostei: Sparidae) in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Parasite: journal de la Société Française de Parasitologie*, 18 (2), 145–150.
- Euzet, L., 1984. Diplectanidae (Monogenea) parasites de poissons des Iles Kerkennah (Tunisie). *Arch Inst Pasteur Tunis*, 61, 436–74.
- Euzet, L. & Oliver, G., 1966. Diplectanidae (Monogenea) des teleosteens de la Mediterranee occidentale. 3. Quelques *Lamellodiscus* Johnston et Tiegs, 1922, parasites de poissons du genre *Diplodus* (Sparidae). *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 41 (6), 573–98.
- Euzet, L. & Oliver, G., 1967. Diplectanidae (Monogenea) de Téléostéens de la Méditerranée occidentale. IV. Quelques *Lamellodiscus* Jonhston et Tiegs, 1922, parasites de poissons du

- genre *Pagellus* Cuvier, 1829 (Sparidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 42(4), 407–25.
- Gannicott, A.M. & Tinsley, R.C., 1997. Egg hatching in the monogenean gill parasite *Discocotyle sagittata* from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasitology*, 114 (6), 569–579.
- Gannicott, A.M. & Tinsley, R.C., 1998. Larval survival characteristics and behaviour of the gill monogenean *Discocotyle sagittata*. *Parasitology*, 117 (5), 491–498.
- Glennon, V., Chisholm, L.A., & Whittington, I.D., 2006. Three unrelated species, 3 sites, same host – monogenean parasites of the southern fiddler ray, *Trygonorrhina fasciata*, in South Australia: egg hatching strategies and larval behaviour. *Parasitology*, 133 (1), 55–66.
- Hendrix, S.S., 2004. Some aspects of the biology and life history of *Bothitrema bothi* (Monogenea: Bothitrematidae) from the flounder *Scophthalmus aquosus* (Bothidae) from New Jersey, USA. *Folia Parasitologica*, 51 (2–3), 229–237.
- Hoai, T.D., 2020. Reproductive strategies of parasitic flatworms (Platyhelminthes, Monogenea): the impact on parasite management in aquaculture. *Aquaculture International*, 28 (1), 421–447.
- Hoai, T.D. & Hutson, K.S., 2014. Reproductive Strategies of the Insidious Fish Ectoparasite, *Neobenedenia* sp. (Capsalidae: Monogenea). *PLOS ONE*, 9 (9), e108801.
- Hodova, I., Matejusova, I., & Gelnar, M., 2010. The surface topography of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) developmental stages parasitizing carp (*Cyprinus carpio* L.). *Central European Journal of Biology*, 5, 702–709.
- Hutson, K.S., Brazenor, A.K., Vaughan, D.B., & Trujillo-González, A., 2018. Monogenean Parasite Cultures: Current Techniques and Recent Advances. In: *Advances in Parasitology*. Elsevier, 61–91.
- Kearn, G.C., 1967. Experiments on host-finding and host-specificity in the monogenean skin parasite *Entobdella soleae*. *Parasitology*, 57 (3), 585–605.
- Kearn, G.C., 1980. Light and gravity responses of the oncomiracidium of *Entobdella soleae* and their role in host location. *Parasitology*, 81 (1), 71–89.
- Kearn, G.C., 1985. Observations on egg production in the monogenean *Entobdella soleae*. *International Journal for Parasitology*, 15 (2), 187–194.
- Kearn, G.C., 1986a. The eggs of monogeneans. *Advances in Parasitology*, 25, 175–273.
- Kearn, G.C., 1986b. Role of chemical substances from fish hosts in hatching and host-finding in monogeneans. *Journal of Chemical Ecology*, 12 (8), 1651–1658.
- Kearn, G.C., ed., 2004. Monogenean (flatworm) skin parasites – *Entobdella*. In: *Leeches, Lice and Lampreys: A Natural History of Skin and Gill Parasites of Fishes*. Dordrecht: Springer Netherlands, 37–60.
- Ktari, M.H. & Maillard, C., 1972. *Neonchocotyle pastinacae* n. g.-n. sp. (Monogenea-Hexabothriidae) parasite de *Dasyatis pastinaca* dans le golfe de Tunis : - Description de l'adulte et de la larve. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 47 (2), 181–191.

- Lambert, A., 1980. Oncomiracidiums et phylogenèse des Monogenea (Plathelminthes): I re Partie : Développement post-larvaire. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 55 (2), 165–198.
- MacDonald, S., 1974. Host skin mucus as a hatching stimulant in *Acanthocotyle lobianchi*, a monogenean from the skin of *Raja* spp. *Parasitology*, 68 (3), 331–338.
- Maciel, P.O., Muniz, C.R., & Alves, R.R., 2017. Eggs hatching and oncomiracidia lifespan of *Dawestrema cycloancistrum*, a monogenean parasitic on *Arapaima gigas*. *Veterinary Parasitology*, 247, 57–63.
- Neifar, 1995. Contribution à l'étude de la biodiversité des monogènes parasites de poissons du secteur nord-est de la Tunisie. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies. Université de Tunis.
- Oliver, G., 1973. *Lamellodiscus obeliae* n. sp. une nouvelle espèce de Diplectanidae (Monogenea, Monopisthocotylea) parasite de *Pagellus centrodontus* (Delaroché, 1809) (Pisces, Sparidae). *Z F Parasitenkunde*, 41, 103–108.
- Oliver, G., 1974. Nouveaux aspects du parasitisme des Diplectanidae Bychowsky, 1957 (Monogenea, Monopisthocotylea) chez les Téléostéens Perciformes des côtes de France. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 279, 803–5.
- Oliver, G., 1987. Les Diplectanidae Bychowsky, 1957 (Monogenea, Monopisthocotylea, Dactylogyroidea), Systématique, Biologie, Ontogénie, Écologie, essai de phylogenèse. Thèse d'État: Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Randel, N. & Jékely, G., 2016. Phototaxis and the origin of visual eyes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371 (1685), 20150042.
- San Filippo, 1978. Microhabitat des Monogènes Dactylogyroidea parasites branchiaux de Téléostéens Mugilidae et Sparidae. Thèse d'Etat: Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Shirakashi, S., Asai, N., & Miura, M., 2021. Phototactic responses in four monogenean oncomiracidia. *Parasitology Research*, 120 (9), 3173–3180.
- Shirakashi, S., Nakatsuka, S., Udagawa, A., & Ogawa, K., 2010. Oncomiracidial Behavior of *Heterobothrium okamotoi* (Monogenea: Diclidophoridae). *Fish Pathology*, 45 (2), 51–57.
- Tinsley, R.C., 1983. Ovoviviparity in platyhelminth life-cycles. *Parasitology*, 86 (Pt 4), 161–196.
- Tinsley, R.C. & Owen, R.W., 1975. Studies on the biology of *Protopolystoma xenopodis* (Monogenoidea): the oncomiracidium and life-cycle. *Parasitology*, 71 (3), 445–463.
- Vaughan, D., Grutter, A., & Hutson, K., 2018. Cleaner shrimp remove parasite eggs on fish cages. *Aquaculture Environment Interactions*, 10, 429–436.
- Villar-Torres, M., Montero, F.E., Raga, J.A., & Repullés-Albelda, A., 2018. Come rain or come shine: environmental effects on the infective stages of *Sparicotyle chrysophrii*, a key pathogen in Mediterranean aquaculture. *Parasites & Vectors*, 11 (1), 558.

- Wan Sajiri, W.M.H., Székely, C., Molnár, K., Buchmann, K., & Sellyei, B., 2023. Reproductive strategies of the parasitic flatworm *Thaparocleidus vistulensis* (Siwak, 1932) (Platyhelminthes, Monogenea) infecting the European catfish *Silurus glanis* Linnaeus, 1758. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 22, 113–120.
- Whittington, I.D., 1987. A comparative study of the anatomy of the oncomiracidia of the hexabothriid monogeneans *Rajonchocotyle emarginata* and *Hexabothrium appendiculatum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67 (4), 757–772.
- Whittington, I.D., 1990. The egg bundles of the monogenean *Dionchus remorae* and their attachment to the gills of the remora, *Echeneis naucrates*. *International Journal for Parasitology*, 20 (1), 45–49.
- Whittington, I.D., Chisholm, L.A., & Rohde, K., 1999. The Larvae of Monogenea (Platyhelminthes). In: *Advances in Parasitology*. Elsevier, 139–232.
- Whittington, I.D. & Kearns, G.C., 1988. Rapid hatching of mechanically-disturbed eggs of the monogenean gill parasite *Diclidophora luscae*, with observations on sedimentation of egg bundles. *International Journal for Parasitology*, 18 (6), 847–852.
- Whittington, I.D. & Kearns, G.C., 1989. Rapid Hatching Induced By Light Intensity Reduction In The Polyopisthocotylean Monogenean *Plectanocotyle Gurnardi* From The Gills Of Gurnards (Triglidae), With Observations On The Anatomy and Behaviour of The Oncomiracidium. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 69 (3), 609–624.
- Whittington, I.D. & Kearns, G.C., 1990. A comparative study of the anatomy and behaviour of the oncomiracidia of the related monogenean gill parasites *Kuhnia scombri*, *K. sprostonae* and *Grubea cochlear* from mackerel, *Scomber scombrus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 70 (1), 21–32.
- Whittington, I.D. & Kearns, G.C., 2011. Hatching Strategies in Monogenean (Platyhelminth) Parasites that Facilitate Host Infection. *Integrative and Comparative Biology*, 51 (1), 91–99.
- Woo, W.-S., Kang, G., Kim, K.-H., Son, H.-J., Sohn, M.-Y., Jung, J.-H., Choi, K.-M., Mun, S.H., & Park, C.-I., 2024. Effects of water temperature and light/dark cycles on in vitro egg laying and hatching of the monogenean *Microcotyle sebastis* on Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture*, 579, 740193.
- Yoon, G.H., 1998. Host finding behavior of oncomiracidium of monogenean parasite *Entobdella hippoglossi* from the Atlantic halibut. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 1 (1), 63–67.
- Yoshinaga, T., 2002. Attachment-inducing capacities of fish skin epithelial extracts on oncomiracidia of *Benedenia seriolae* (Monogenea: Capsalidae). *International Journal for Parasitology*, 32 (3), 381–384.
- Zhang, X.-P., Shang, B.-D., Wang, G.-T., Li, W.-X., Yang, X., & Li, Z.-Y., 2015. The effects of temperature on egg laying, egg hatching and larval development of *Dactylogyrus vastator*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 39 (6), 1177–1183.

Supporting information

Figure S3.1. Eggs collectors examined under a light microscope. (A) *Lamellodiscus erythrini* eggs hooked on nylon thread (B-C) Eggs of other monogeneans species hooked on nylon thread

Figure S3.2. Scanning electron micrographs of *Lamellodiscus erythrini* immature eggs distorted by the fixation in glutaraldehyde

File S3.1. Video recording of *Lamellodiscus erythrini* oncomiracidium hatching under a light microscope. 0-15 sec, contraction movements of the oncomiracidium body. 15-33 sec, the larva escape from the egg shell.

Figure S3.3. End of the polar filament of an egg of *Lamellodiscus erythrini* under a light microscope.

File S3.2. Video recording of *Lamellodiscus erythrini* oncomiracidium shedding its ciliated cells through contraction under a light microscope

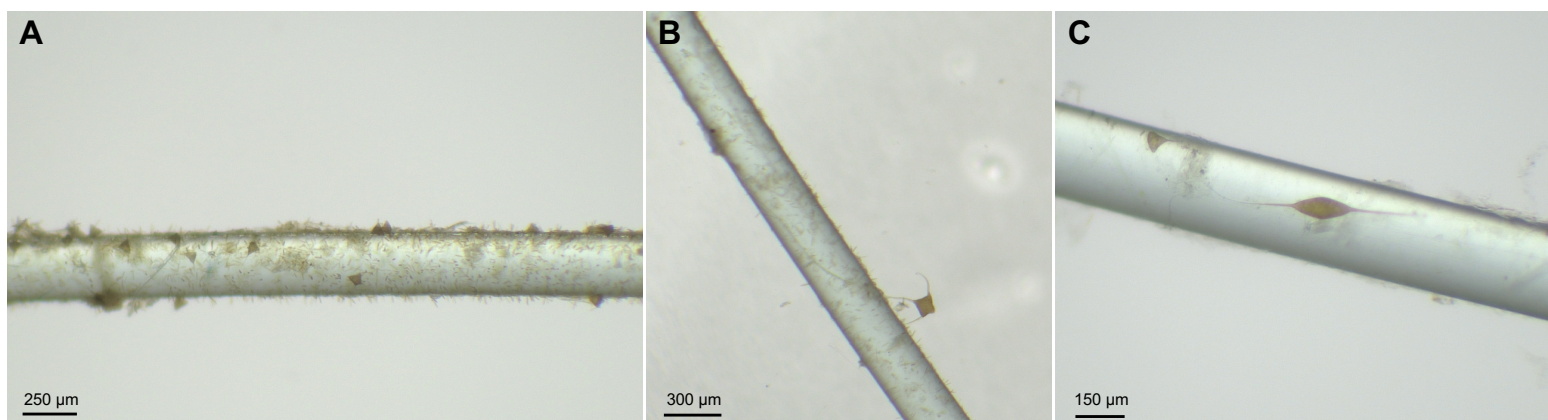


Figure S3.1: Eggs collectors examined under a light microscope. (A) *Lamellodiscus erythrini* eggs hooked on nylon thread. (B-C) Eggs of other monogeneans species hooked on nylon thread

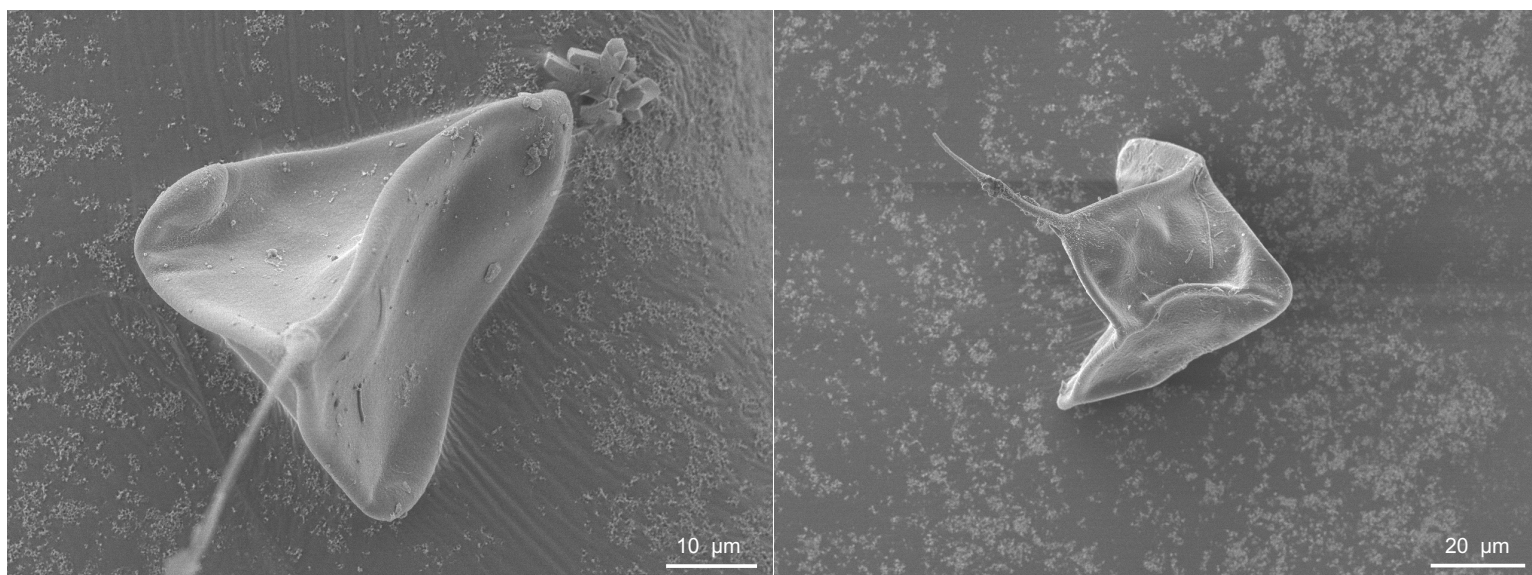


Figure S3.2: Scanning electron micrographs of *Lamellodiscus erythrini* immature eggs distorted by the fixation in glutaraldehyde



File S3.1: Video recording of *Lamellodiscus erythrini* oncomiracidium hatching under a light microscope.
0-15 sec, contraction movements of the oncomiracidium body
15-33 sec, the larva escape from the egg shell



Figure S3.3: End of the polar filament of an egg of *Lamellodiscus erythrini* under a light microscope



File S3.2: Video recording of *Lamellodiscus erythrini* oncomiracidium shedding its ciliated cells through contraction under a light microscope

5. Conclusion, Perspectives

Au début de ma thèse, nous ne disposions d'aucune image d'œufs, de larves ou de stades post-larvaires de *Lamellodiscus*, stades qui n'étaient décrits dans la littérature que sous forme de schéma (Oliver 1987). Les approches expérimentales réalisées lors de cette thèse avec des accès réguliers aux œufs et aux larves de *Lamellodiscus* ont été à l'origine des premières caractérisations morphologiques de larves et d'œufs de *Lamellodiscus*. Elles ont également été l'occasion d'étudier et de décrire les stades post-larvaires des *Lamellodiscus* à partir des branchies de sparidés régulièrement disséqués.

Une fois disséqués, les branchies des poissons ont été prélevées et placées dans de l'eau de mer filtrée à 1 µm. Sous loupe binoculaire, des parasites *Lamellodiscus* adultes et post larvaires ont été décrochés des filaments branchiaux à l'aide de fines pinces et de pinceaux. Des spécimens ont été placés entre lame et lamelle et observés en microscopie optique et d'autres maintenus dans de l'eau de mer.

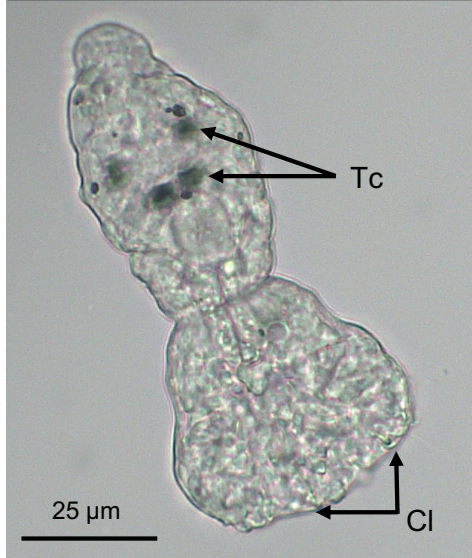
De nombreux stades de vie de *Lamellodiscus* ont été retrouvés dans les branchies. Le stade le plus précoce observé est présenté sur la Figure 11. En raison de sa taille, ce stade de vie n'a été isolé qu'une fois, et sa description n'a pu être que partielle. Cependant, aucune ciliature n'est observée, les tâches oculaires semblent dépourvues de lentilles cristallines et le haptour composé de crochets s'élargit au niveau postérieur et passe d'une orientation ventrale à une orientation ventro-dorsale postérieure. Selon Kearn (1968) et Oliver (1987), c'est à ce stade que les hamuli ventraux, présents sous forme d'ébauche au stade larvaire, se développent et migrent vers la partie postérieure alors que les hamuli dorsaux apparaissent plus tardivement.

Une fois la paire d'hamuli formée, la partie postérieure semble s'élargir latéralement et l'organisme s'allonge dans le sens antéro-postérieur (Figure 3.16). Au stade des « barres transversales » (Figure 3.16), les hamuli semblent avoir atteint leur taille définitive, le corps s'allonge un peu plus et laisse deviner la silhouette définitive du parasite. Selon Oliver (1987) l'apparition des barres médianes se fait en deux temps, la barre transversale médiane apparaissant en premier, suivi des barres transversales latérales. On peut observer qu'à ce stade, les crochets latéraux sont encore visibles et semblent de la même taille que ceux observés chez les stades de vie plus précoces. Contrairement à ce qu'ont observé Euzet et

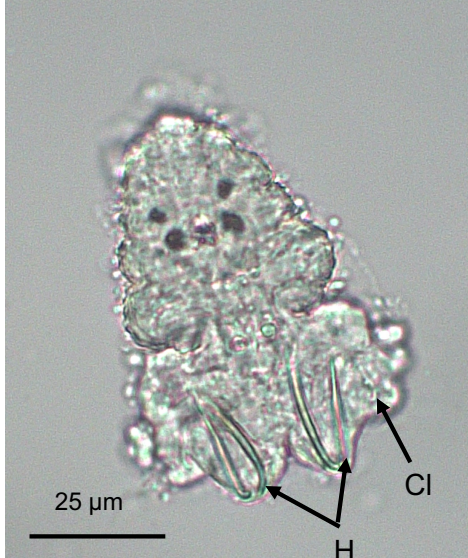
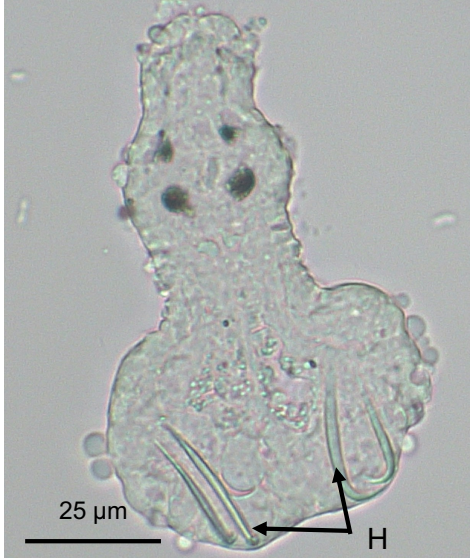
Audouin (1959) chez *Furnestinia echeis*, la différenciation des barres transversales et des lamellogisques ne semble pas concomitante chez les espèces de *Lamellogiscus* observées. En effet l'apparition de deux lamellogisques, un en face ventrale et l'autre en face dorsale, se fait au stade « Protolamellogiscus » (Figure 3.16), également caractérisé par une élongation du corps dans le sens antéro-postérieur. Le stade « *Lamellogiscus* » adulte (Figure 3.16) est caractérisé par l'apparition de la pièce copulatrice mâle située dans le tiers antérieur du corps. Les *Lamellogiscus* adultes mesurent entre 200 à 1200 μm selon l'espèce. Au stade « *Lamellogiscus* », les individus matures se mettent à pondre très peu de temps après leur séparation de l'hôte, ce qui a pu être filmé chez plusieurs espèces de *Lamellogiscus* (Figure 3.17). La ponte suit immédiatement la formation des œufs qui est rapide lorsque les adultes sont détachés de leurs hôtes (quelques minutes) et s'effectue grâce à des contractions répétées du corps. La coquille de l'œuf sort dans un premier temps et le filament polaire dans un second temps (Figure 3.17A). Les œufs semblent avoir des morphologies différentes selon l'espèce avec des extrémités plus ou moins arrondies et une silhouette plus ou moins allongée (Figure 3.17B).

L'ensemble de ces descriptions morphologiques semblent indiquer des différences inter espèces à tous les stades de vie des *Lamellogiscus*. Il est probable que les attributs morphologiques des *Lamellogiscus* aient évolué notamment en fonction de leur spectre d'hôtes et participeraient donc à leur spécificité pour leur hôtes sparidés. Une description systématique de tous les stades de vie de toutes les espèces de *Lamellogiscus* est nécessaire pour comprendre dans quelles mesures les structures morphologiques sont impliquées dans la relation hôte-parasite.

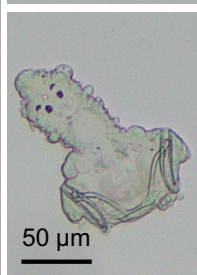
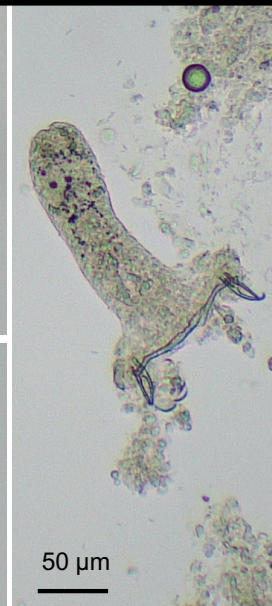
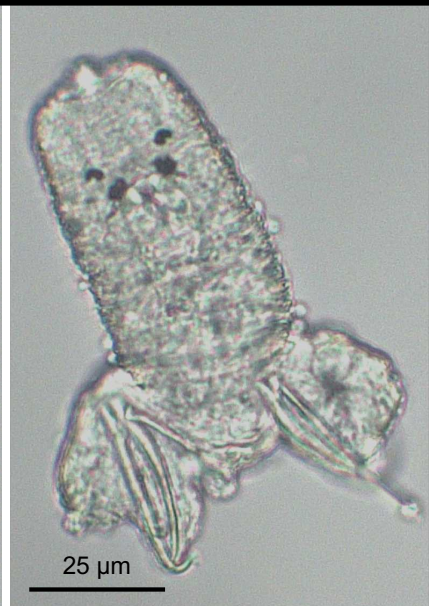
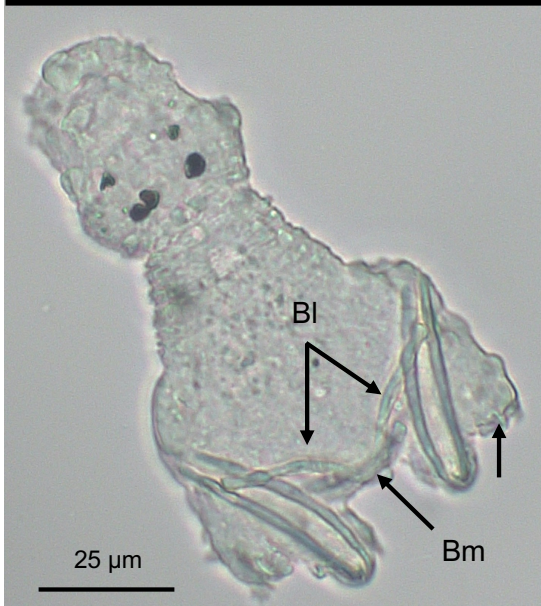
1^{er} stade post-larve



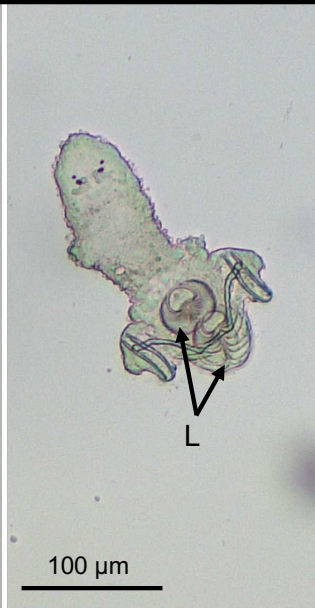
2^{ème} stade post-larve



Stade des « barres transversales »



Stade « Protolamellodiscus »



Stade « Lamellodiscus »

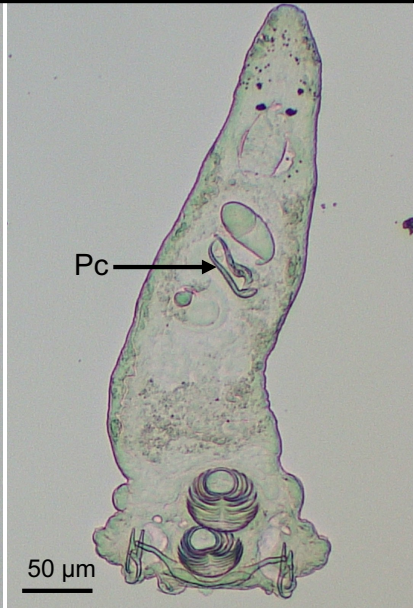
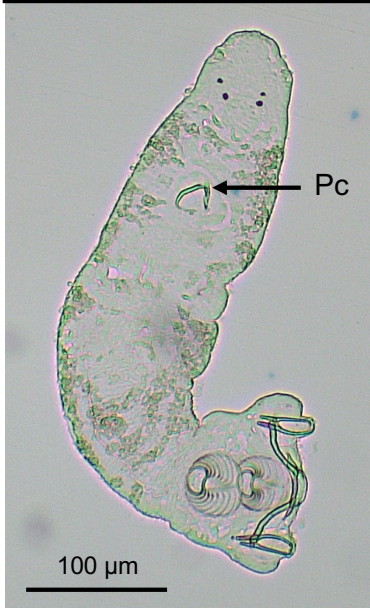


Figure 3.16. Photographies en microscopie optique des stades de vie post-larvaires de *Lamellodiscus* spp. Tc, tâches oculaires ; Cl, Crochetons latéraux ; H, hamuli ; Bm, barre transversale médiane ; Bl, barres transversales latérales ; L, lamellodisques ; Pc, pièce copulatrice mâle.

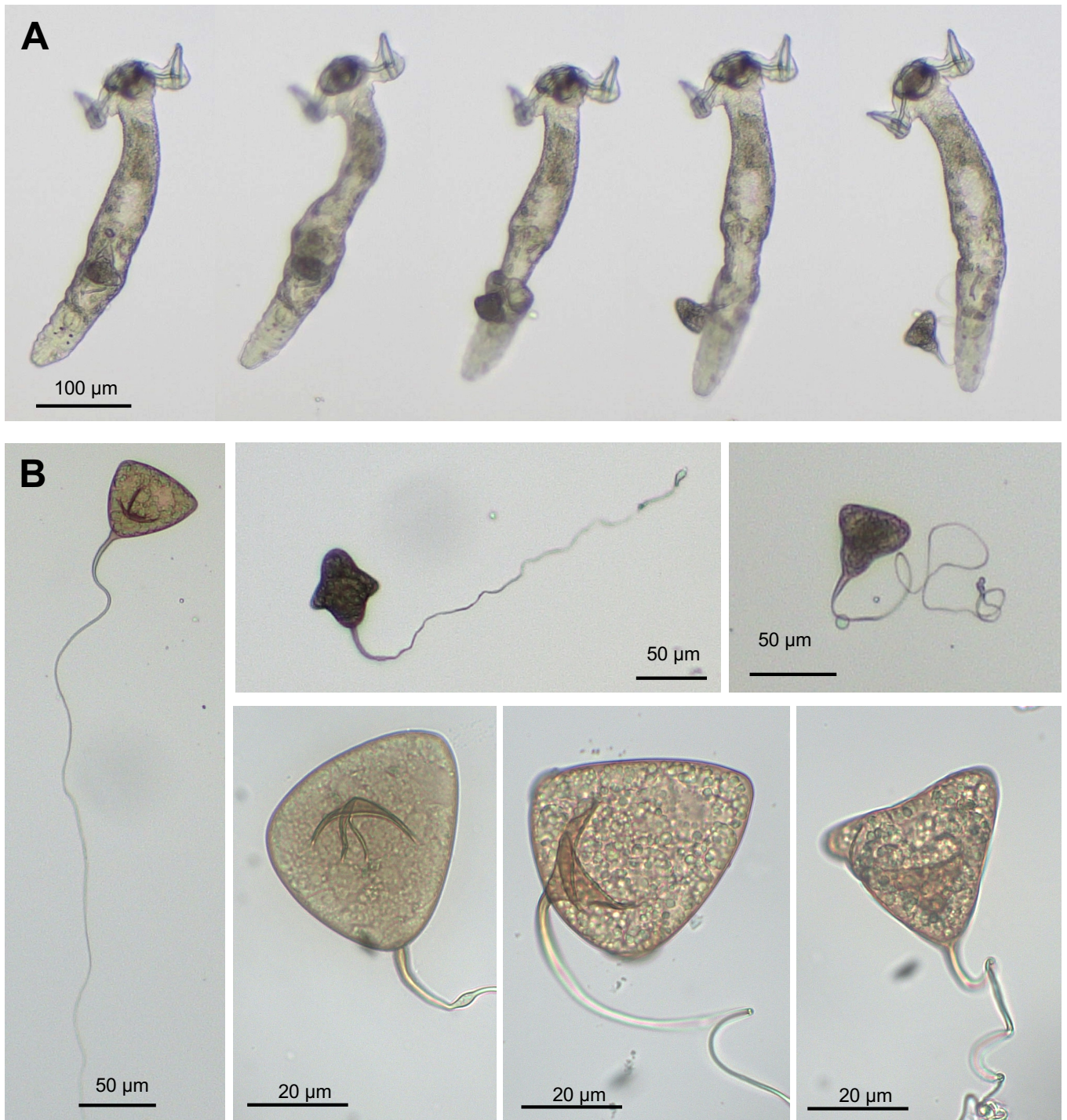


Figure 3.17. (A) Photographies d'une vidéo de ponte de *Lamellodiscus elegans* filmée au microscope optique (B) Photographie au microscope optique d'œufs de *Lamellodiscus* spp.

Discussion générale

Cette thèse avait pour objectif de comprendre l'implication du microbiote du mucus externe dans la spécificité des monogènes pour leurs hôtes téléostéens. Lors de ce travail, nous avons abordé le concept de spécificité au sens large, n'incluant pas seulement le nombre d'hôtes qu'un monogène est capable d'infester, mais également la prévalence et la charge parasitaire à l'échelle individuelle. Nous avons pour cela étudié l'association entre les Sparidae et leurs ectoparasites *Lamellodiscus*.

Dans un premier temps, l'ensemble de nos résultats permet de confirmer que le microbiote du mucus externe est une matrice dynamique qui peut être structurée par de nombreux facteurs endogènes ou exogènes. Nous avons notamment pu décrire la composition taxonomique des communautés bactériennes associées au mucus de la peau et des branchies et nous avons montré que ces communautés bactériennes étaient significativement différentes entre ces tissus. Cela peut être le résultat de pressions de sélection distinctes entre ces deux tissus, favorisé par leur fonction (Lee & Mazmanian 2010 ; Van Kessel *et al.* 2016) ou par la production de métabolites particuliers comme cela a été décrit dans le Chapitre II, où nous avons montré que les métabolomes associés à chacun de ces deux tissus étaient significativement différents. La variabilité des microbiotes et des métabolomes semble également être expliquée par le facteur espèce, autrement dit deux individus appartenant à la même espèce présentent des compositions de mucus (communautés bactériennes et diversité chimique) plus proches que deux individus d'espèces différentes, ce qui est en accord avec ce qui a été observé chez d'autres familles de téléostéens (Larsen *et al.* 2013 ; Reverter *et al.* 2017b ; Chiarello *et al.* 2018 ; Pratte *et al.* 2018 ; Ruiz-Rodríguez *et al.* 2020 ; Ekman *et al.* 2023 ; Heim *et al.* 2023)

La variabilité observée au sein du microbiote externe et des métabolomes semble également dépendre des caractéristiques écologiques des téléostéens. Par exemple, nous avons montré dans le Chapitre II que des espèces pélagiques et semi-pélagiques partageaient une composition de mucus plus similaire entre elles qu'avec des poissons démersaux. Enfin, en accord avec plusieurs études (Huang *et al.* 2011 ; Minich *et al.* 2020 ; Scheifler *et al.* 2023),

nous avons constaté que l'environnement semble jouer un rôle important dans la structuration des communautés bactériennes et des métabolites du mucus externe. Nos résultats montrent que les microbiotes sont différents entre des individus pêchés à Banyuls-sur-Mer et Argelès-sur-Mer, ou pêchés à des dates différentes. Ces observations permettent de suggérer que la colonisation des surfaces des téléostéens se fait entre autres par le recrutement de bactéries dans les communautés de l'eau environnante, dont la composition varie également selon des facteurs environnementaux comme la température, la salinité ou la position dans la colonne d'eau (Schauer *et al.* 2003 ; Celussi *et al.* 2009). La date d'échantillonnage semble également avoir un effet significatif sur la charge parasitaire en *Lamellodiscus* chez les sars communs (Chapitre I). Ainsi les facteurs environnementaux ne semblent pas seulement influencer la composition des microbiotes et des métabolomes mais aussi l'occurrence et l'abondance de monogènes chez certains poissons (Cecchini *et al.* 1998 ; Šimková *et al.* 2001).

La variabilité du microbiote en fonction des facteurs environnementaux semble compliquer l'identification de taxons bactériens ou de métabolites en lien avec des infestations parasitaires. C'est une des hypothèses pour expliquer le faible nombre de corrélations significatives entre la charge parasitaire et l'abondance de taxons bactériens spécifiques dans le mucus branchial des pageots acarnés par rapport aux sars communs (Chapitre I). En effet, les pageots acarnés ont été pêchés à des lieux et des dates différentes alors que les sars communs ont tous été pêchés à Banyuls et à deux dates relativement proches. Cette hypothèse pourrait aussi rendre compte du fait que nous n'avons pas détecté a priori de molécules en lien direct avec le parasitisme dans le mucus des bogues (Chapitre II). Une étude plus complète pour évaluer l'incidence de ces facteurs sur la structuration du microbiote, du métabolome et des charges parasitaires pourra être réalisée grâce à l'analyse de l'ensemble des poissons échantillonnés au cours de ma thèse (Annexe I).

Lors de ce travail nous avons montré que la présence et l'abondance d'espèces de monogènes étaient liées à des diversités et des structures de communautés bactériennes particulières, comme observé dans d'autres associations hôte-parasites (Llewellyn *et al.* 2017 ; Kashinskaya *et al.* 2021 ; Lutz *et al.* 2022 ; Rajarajan *et al.* 2022). Dans le premier chapitre, nous avons pu établir que des individus appartenant à la même espèce, évoluant dans des milieux similaires

et capturés à des dates proches, présentaient des communautés bactériennes distinctes, et que certains taxons bactériens étaient fortement corrélés à la charge parasitaire en *Lamellodiscus*. Nous avons par exemple identifié des taxons bactériens appartenant à la famille des Flavobacteriaceae dans les branchies des sars communs et des pageots acarnés dont l'abondance était fortement corrélée à la charge en *Lamellodiscus* (Chapitre I). Bien que cette famille soit régulièrement retrouvée après des infestations parasitaires (Bandilla *et al.* 2006 ; Llewellyn *et al.* 2017 ; Zhang *et al.* 2018) et notamment de monogènes (Busch *et al.* 2003 ; Shoemaker *et al.* 2008), elle n'a pas été retrouvée enrichie ni dans le mucus branchial ni dans le mucus cutané des poissons parasités de l'étude du Chapitre II. Cela suggère que ces taxons bactériens ne sont pas nécessairement retrouvés en abondance après une infestation par les monogènes *Lamellodiscus* et que des dynamiques de co-infection se produisent plus probablement par l'établissement de bactéries opportunistes de l'environnement plutôt que par un apport de ces bactéries par un microbiote spécifique du parasite comme observé dans quelques études (Dalvin *et al.* 2020 ; Gonçalves *et al.* 2020 ; Mathieu-Bégné *et al.* 2023). Cependant, d'autres taxons bactériens potentiellement pathogènes appartenant à la famille des Vibrionaceae, comme les genres *Photobacterium* et *Vibrio*, ont été retrouvés enrichis dans le mucus de la peau des poissons parasités (Chapitre II). Des co-infections impliquant des souches pathogènes identifiées, comme *V. splendidus* ou *V. alginolyticus*, ont déjà été retrouvées après une infestation de la grande sérieole par *Zeuxapta seriola* (Sepulveda *et al.* 2017). De la même manière, d'autres espèces comme *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* qui peuvent être associées à des pathologies graves chez les poissons (Khouadja *et al.* 2014 ; Remuzgo-Martínez *et al.* 2014 ; Shimada *et al.* 2020 ; Irshath *et al.* 2023) ont été observées à la suite d'infestations de monogènes (López *et al.* 2002). L'établissement de ces taxons pathogènes peut être le résultat d'un changement histopathologique créé par le parasite, susceptible de créer une voie d'entrée pour des infections secondaires (Buchmann 2002 ; Rahman *et al.* 2015). Cela pourrait également résulter d'un stress (Ilgová *et al.* 2021) ou d'une modulation du système immunitaire induit par la présence du parasite à la surface de l'hôte (Henry *et al.* 2015 ; Zhang, Li, *et al.* 2015). Cependant, les espèces appartenant à ces genres et plus généralement à la famille des Vibrionaceae ne sont pas nécessairement responsables de pathologies chez les poissons et peuvent faire partie d'un microbiote externe sain (Smith *et al.* 2007 ; Wilson *et al.* 2008 ; Ruiz-Rodríguez *et al.* 2020). Nous avons également trouvé que le genre *Photobacterium* était très

négativement corrélé à la charge parasitaire en *Lamellodiscus* dans le mucus branchial des sars communs (Chapitre I). De plus, une abondance importante de *Vibrio* a été trouvée enrichie dans le mucus branchial de bogues (Scheifler *et al.* 2022a) ainsi que dans le mucus branchial de *Chaetodon lunulatus*, une espèce de poisson-papillon qui n'est jamais parasitée par les monogènes de la famille des Dactylogyridae (Reverter *al.* 2017a). Ainsi il est possible que ces taxons puissent avoir un rôle dans la protection de certains individus face aux ectoparasites. La famille Vibrionaceae semble donc regrouper des bactéries avec un rôle potentiellement protecteur ou pathogène pour le poisson. Des expériences *in vitro*, en isolant précisément des souches de Vibrionaceae du mucus de sparidés, permettraient de mieux comprendre leur rôle dans les interactions hôte-parasite. Ces approches paraissent d'autant plus nécessaires que la discrimination des espèces, en particulier celles du genre *Vibrio*, à partir des séquences d'ARNr 16s, reste très difficile (Sawabe *et al.* 2013). Ces résultats soulignent la complexité de l'étude de ces interactions tripartites entre les parasites, le microbiote et l'hôte, où de nombreux mécanismes bénéfiques ou délétères peuvent se produire au sein et entre ces trois compartiments.

Nous avons identifié au sein des branchies des bogues l'abondance d'un taxon bactérien très rarement décrit dans le microbiote externe des poissons, la famille Cardiobacteriaceae (Chapitre I). Ces bactéries sont anaérobies, ce qui peut paraître étonnant dans la mesure où elles ont été identifiées dans un organe particulièrement oxygéné. Cette même famille a été retrouvée spécifiquement enrichie dans le mucus d'autres bogues dans une étude antérieure de notre équipe (Scheifler *et al.* 2022a) ce qui permet a priori d'exclure une contamination qui expliquerait la présence de ces bactéries. Dans cette étude, il a également été observé l'abondance de *Fusobacteria* dans les branchies des bogues (Scheifler *et al.* 2022a), taxon dont l'abondance a été retrouvée négativement corrélée avec les charges en *Lamellodiscus* dans le microbiote branchial des individus de *Pagellus acarne* (Chapitre I). Reverter *et al.* (2020) ont également observé une forte abondance de *Fusobacteria* dans le mucus branchial des poissons-papillons, un taxon connu pour augmenter la production de mucus via la production de butyrate. La présence de taxons bactériens anaérobies dans le mucus branchial de ces espèces suggère que la diffusion de l'oxygène au sein de leur mucus se fait moins bien que chez d'autres espèces, potentiellement due à une épaisseur et/ou une densité et/ou une viscosité accrue de ce dernier. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les propriétés

physicochimiques du mucus externe des hôtes soient un des déterminants de la spécificité des monogènes et participent à la protection de certaines espèces.

Bien que nous n'ayons pas d'informations sur le rôle fonctionnel des communautés bactériennes associées au microbiote externe, nos résultats suggèrent que les mécanismes de protection mis en place au sein d'une même espèce ne sont pas identiques à ceux favorisés chez la bogue pour se protéger des *Lamellodiscus*. Il aurait été intéressant de comparer ces mécanismes en ajoutant à nos analyses l'espèce *Dentex dentex* (denté), une autre espèce de sparidés pour laquelle aucun *Lamellodiscus* n'a été répertorié dans les branchies. Cela aurait notamment permis d'étudier les communautés bactériennes de son mucus externe pour voir si, de la même manière que chez la bogue, des taxons anaérobies y sont identifiés, ce qui conforterait l'hypothèse que des propriétés rhéologiques peuvent être à l'origine de la protection de certains poissons. L'ajout de cette espèce non parasitée en plus des bogues dans l'étude du métabolome (Chapitre II) aurait également permis de s'affranchir d'une partie de la variabilité liée au facteur espèce, et ainsi d'augmenter les chances d'identifier des molécules ou des taxons bactériens partagés en lien avec le parasitisme et leur protection vis-à-vis des *Lamellodiscus*. Seulement, il s'est avéré compliqué de travailler avec ces deux espèces qui vivent plus éloignées des côtes et nous n'avons pas pu capturer de dentés malgré la dizaine d'échantillonnages réalisés (Annexe I). Seules quelques bogues ont été capturées lors de ces échantillonnages dans des lieux et à des moments différents par rapport aux autres espèces de sparidés, introduisant ainsi une nouvelle source de variabilité et compliquant l'analyse des différences entre espèces parasitées et non parasitées.

Les déterminants de la spécificité des *Lamellodiscus* ont ensuite été explorés à la lumière de la morphologie et du comportement de leurs stades de vie libre (œuf et larve) (Chapitre III). Nous avons pour cela décrit la morphologie des œufs et des larves de *L. erythrini* pour la première fois par microscopie électronique à balayage et microscopie optique. Nous avons observé que les œufs de *L. erythrini* étaient tétraédriques et possédaient un long filament polaire qui leur permet de s'accrocher aux substrats environnants, les conduisant à rester dans l'habitat de leur hôte (Kearn 2004b). Nous avons pu décrire les stades de maturation des œufs de *Lamellodiscus* passant d'opakes et hermétiques à transparents et operculés. Cet opercule semble rendre la coquille perméable et suggère que des composés chimiques liés à l'hôte

favorisent l'éclosion en atteignant la larve à travers cette ouverture, comme cela a été observé chez différentes espèces de monogènes (MacDonald 1974 ; Gannicott & Tinsley 1998). Cette éclosion semble également favorisée par une perturbation mécanique qui peut être interprétée comme l'imitation du passage d'un hôte à proximité (MacDonald 1974 ; Whittington & Kearn 1988, 2011). Nous nous sommes notamment intéressés à la présence de structures sensorielles à la surface des larves qui pourraient expliquer leur réponse à divers stimuli pour détecter et atteindre leurs hôtes comme décrit dans la littérature (Kearn 1967 ; Zhang, Shang, *et al.* 2015 ; Woo *et al.* 2024). Elles effectuent une recherche active grâce à leur ciliature très développée et nous avons notamment proposé que la réception des messages chimiques émanant de l'hôte et de son mucus puisse s'effectuer via les sensilles dorsales observées chez les larves de *L. erythrini* et non observés chez des stades post-larvaires (Lambert 1980 ; Cribb *et al.* 2003) ou chez des larves non ciliées (Lambert 1980). Ces sensilles dorsales pourraient aussi avoir un rôle dans la réception de messages géotactiques ou méchanotactiques (Buchmann 2002). En lien avec les structures sensorielles identifiées lors de cette étude morphologique, plusieurs traits comportementaux des oncomiracidia de *L. erythrini* ont également été observés après éclosion, avec notamment un phototactisme positif, qui peut être attribué à la présence de tâches et lentilles oculaires fonctionnelles. Nos résultats suggèrent que les stades de vie libre des monogènes sont complexes et répondent à de nombreux stimuli en lien avec leurs hôtes. Une meilleure description morphologique de ces stades de vie encore jamais observés par ces approches, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension des déterminants de la spécificité.

Perspectives

Les variations de microbiote en lien avec le parasitisme, causes ou conséquences ?

Bien que nous n'ayons pas pu établir si ces différences de microbiotes étaient la cause ou la conséquence de ces infestations, la mise au point d'un protocole de déparasitage en *Lamellodiscus* et d'un système non invasif de collecte d'œufs (Chapitre III) permettront de réaliser des infestations artificielles et de suivre l'évolution du microbiote à l'échelle de chaque individu, avant et après infestation. Ainsi, ce suivi de microbiote permettra de déduire si les changements précèdent ou succèdent à cette infestation en monogènes. Il sera également possible de suivre l'évolution des métabolomes associés à chaque tissu du poisson pour caractériser la réponse du système biologique. Des approches analytiques complémentaires pourront être utilisées pour déterminer la diversité chimique présente au sein de ces mucus. Les conditions analytiques en LC-MS utilisées lors de l'étude du mucus de la bogue (Chapitre II) étaient optimisées pour l'étude de métabolites de polarité moyenne (comme par exemple les métabolites secondaires). Or, les résultats obtenus suggèrent qu'il est possible que certaines molécules plus polaires telles que des sucres ou des acides aminés, ou de plus haute masse moléculaire telles que des protéines, jouent un rôle dans l'interaction hôte-parasite. Ainsi, des analyses protéomiques et l'utilisation d'autres systèmes analytiques en LC-MS (colonnes de type Hilic) ou de la résonance magnétique nucléaire constituent des approches pertinentes pour décrire plus finement la diversité chimique associée au mucus externe des téléostéens.

Mécanismes de co-infections

Lors de la description taxonomique des communautés bactériennes du mucus externe (Chapitre I et II), nous avons observé la présence d'un certain nombre de taxons bactériens potentiellement pathogènes, laissant penser à des mécanismes de co-infection. L'origine de ces taxons n'est pas connue, et les mécanismes par lesquels leur installation est favorisée dans les branchies des individus parasités non plus. Les différences de microbiote décrits chez les sars communs et les pageots acarnés pourront être explorées à la lumière de la composition chimique associée à chaque individu, laquelle pourra être analysée à partir de données déjà

acquises (Annexe I). L'importance du système immunitaire dans ces mécanismes de co-infection pourra également être évaluée lors d'expériences d'infestations artificielles par des *Lamellodiscus in vivo*. En effet, la réponse immunitaire du poisson pourra être suivie par des approches ciblées d'expression de gène (RT-qPCR) ou des études plus globales de transcriptomiques au niveau de la peau (lieu de la fixation des larves), des branchies (lieu de fixation des adultes), ou au niveau d'organes avec un rôle important dans la réponse immunitaire pour le poisson, comme la rate ou les reins (Mokhtar *et al.* 2023). Ces deux types d'approches ont déjà été utilisées pour suivre l'expression de gènes lors d'infestations par des monogènes. Par exemple, Faliex *et al.* (2008) ont montré qu'une infestation du loup *Dicentrarchus labrax* par le monogène *Diplectanum aequans* induisait une augmentation de l'expression de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire du poisson. Des résultats similaires avaient été observés chez la truite arc-en-ciel infestée par le monogène *Gyrodactylus derjavini* (Lindenstrøm *et al.* 2003, 2004). Plus récemment, une étude plus exhaustive (transcriptomique) a pu mettre en évidence qu'une infestation par le monogène *Sparicotyle chrysophrii* induisait des réactions opposées chez les daurades royales, avec une inhibition de gènes impliqués dans la réponse systémique (rate) et l'augmentation de la réponse inflammatoire au niveau des branchies (Piazzon *et al.* 2019). Les auteurs de cette étude ont notamment formulé l'hypothèse que la diminution de la réaction systémique pouvait être une stratégie de modulation du système immunitaire par le parasite et faciliter l'apparition de taxons bactériens pathogènes au sein des branchies. Ainsi, suivre la réaction immunitaire du poisson permettrait de mieux comprendre les mécanismes de co-infection souvent observés lors d'infestation par des monogènes (Zhang, Li, *et al.* 2015 ; Attia *et al.* 2022). L'implication du microbiote dans la relation hôte-monogènes pourra également être évaluée en modifiant le microbiote par l'utilisation d'antibiotiques et en comparant la réponse des poissons traités à ceux qui ne le sont pas.

Il serait également informatif de prendre en compte la réponse fonctionnelle du microbiote face à une infestation parasitaire en s'intéressant aux transcrits bactériens (métatranscriptomique). En effet, il est probable que les bactéries à la surface des tissus soient elles-mêmes modifiées lors d'une infestation parasitaire et qu'elles puissent jouer un rôle dans la défense de l'hôte ou dans les stratégies de contournement du parasite.

Mucus : attraction ou répulsion ?

Une autre partie de ce travail de thèse a consisté à étudier les mécanismes qui expliquent que le *Boops boops* (bogue) n'est jamais parasité par des *Lamellodiscus*, dont aucun adulte n'a été observé au niveau des branchies. Pourtant, cette espèce partage de nombreux traits écologiques avec d'autres Sparidae et est phylogénétiquement proche d'espèces parasitées (e.g., *Sarpa salpa*, Annexe I). Cette espèce semble donc avoir développé des mécanismes de protection envers ce groupe de monogènes. Lors de ce travail, nous avons exploré la diversité du métabolome du mucus externe de la bogue en partant de l'hypothèse que sa protection pourrait être due à des métabolites antiparasitaires produits et/ou métabolisés par l'hôte ou ses taxons bactériens à la surface des branchies et de la peau. Bien que nous ayons identifié des molécules appartenant à la classe des eicosanoïdes qui sont des molécules de l'immunité engagé dans la défense de l'hôte, il reste difficile de trouver un lien direct entre la présence de ces molécules dans le mucus de la bogue et leur protection vis-à-vis des *Lamellodiscus*. En dehors de cette classe de molécules nous n'avons pas été en mesure d'en identifier d'autres avec un effet potentiellement antiparasitaire au sein du mucus branchial et cutané. Plusieurs raisons ont été avancées, et nous avons notamment évoqué que l'absence de *Lamellodiscus* puisse être liée à l'absence de molécules d'attraction ou de reconnaissance à la surface des branchies des bogues. Ces molécules pourraient être présentes chez les autres espèces de sparidés qui sont parasitées, comme cela a été établi pour le monogène *Heterobothrium okamotoi* qui reconnaît spécifiquement les immunoglobulines de son hôte *Takifugu rubripes*, ce qui lui permet de le distinguer d'autres hôtes (Igarashi *et al.* 2017). Nous n'avons cependant pas exploré la présence de ces molécules à la surface d'hôtes parasités lors de cette étude (Chapitre II) car nous n'aurions pas pu les distinguer des molécules produites par l'hôte en réaction au parasite (e.g., molécules d'immunité ; Ilgová *et al.* 2021)), ou des molécules produites par le parasite lui-même (Shao *et al.* 2019). Cette hypothèse pourra être testée grâce au développement des tests d'attractivité larvaire présentés dans le Chapitre III. L'implication des communautés bactériennes de ce mucus dans l'attraction ou la répulsion des larves pourra notamment être évaluée en utilisant des extraits de mucus traités aux antibiotiques et en comparant leur effet à des extraits de mucus non traités. Il sera aussi possible d'évaluer l'effet attractif ou répulsif de certains taxons bactériens en mettant en culture des extraits de mucus, puis en isolant des bactéries et en testant la réponse des larves face à ces extraits bactériens. On pourra notamment tester des bactéries de la famille des

Vibrionaceae, comme celles mentionnées dans la discussion générale, pour éclaircir leur rôle dans les relations hôte-parasite. Si des bactéries actives sont identifiées, il sera également possible de caractériser les métabolites qu'elles émettent afin d'identifier les molécules à l'origine de leur pouvoir d'attraction ou de répulsion.

Existe-t-il un filtre de spécificité au stade larvaire ?

Les tests de préférences permettront également de déterminer s'il existe au stade larvaire des filtres de spécificité pour des mucus d'hôtes particuliers. En effet, le spectre d'hôte ne semble pas aussi restrictif au stade larvaire qu'au stade adulte car il n'est pas rare de trouver des associations non spécifiques entre des larves de monogènes et certains hôtes (Le Brun *et al.* 1988 ; Whittington *et al.* 2000 ; Igarashi *et al.* 2017 ; Matsui *et al.* 2020 ; Sato *et al.* 2023). Des associations entre des larves de *Lamellodiscus* et des bogues ont d'ailleurs été observées au niveau de la peau des hôtes (Scheifler *et al.* 2022b) alors qu'aucun adulte ne s'établit définitivement dans les branchies. Il est possible que le mucus branchial de bogue émette des composés antiparasitaires qui empêcheraient la migration des larves vers le lieu de leur installation définitive. Dans les branchies des bogues, d'autres espèces de monogènes sont présentes comme *Microcotyle isyebi* et *Sparicotyle chrysophrii* (Mladineo *et al.* 2009 ; Bouguerche *et al.* 2019). Cependant, ces monogènes appartiennent tous à la classe des Polyopisthocotylea qui se nourrissent du sang de leur hôte et non de l'épithélium et du mucus comme les Monopisthocotylea dont font partie les *Lamellodiscus*. Cette protection pourrait par exemple venir de composés qui, une fois ingérés par les monogènes Monopisthocotylea, seraient toxiques et favoriseraient alors leur détachement. De plus, il est possible que les Polyopisthocotylea soient plus résistants à des facteurs immunitaires, car en contact permanent avec ces derniers véhiculés par le sang. C'est en tous cas une des hypothèses avancées par Leef & Lee (2009) pour expliquer la différence de survie observée *in vitro* des monogènes *Zeuxapta seriolae* (Polyopisthocotylea) qui survivent mieux que les monogènes *Benedenia seriolae* (Monopisthocotylea) lorsqu'ils sont mis en présence de sérum de leur hôte *Seriola lalandi*. Des tests similaires pourraient ainsi être réalisés avec des *Lamellodiscus* adultes, en les exposant à du mucus de bogue et en comparant leur temps de survie à d'autres individus mis en présence du mucus d'un autre hôte sparidé. Ces tests permettraient d'évaluer la présence de composés toxiques au sein du mucus et pourraient contribuer à expliquer la protection des bogues vis-à-vis des *Lamellodiscus*.

Vers de nouvelles stratégies en aquaculture ?

L'utilisation d'un logiciel de tracking vidéo (Chapitre III) paraît prometteur pour suivre toutes les expériences *in vitro* évoquées ci-dessus. Cela permettrait de préciser le comportement des larves de *Lamellodiscus* au cours de leur maturation, sans se limiter à l'état final « attirées/non attirées ». De plus, explorer les différences comportementales et morphologiques entre les espèces de *Lamellodiscus* généralistes et spécialistes, et examiner comment elles se sont adaptées aux contraintes spécifiques de leurs hôtes qui possèdent des écologies variées, permettrait d'appréhender de nouveaux déterminants de spécificité. L'étude des larves de *Lamellodiscus erythrini* (Chapitre III) constitue en ce sens une première étape dans la description de cette interaction. Bien que les *Lamellodiscus* ne soient pas associés à des infestations aux conséquences graves en aquaculture, leur interaction avec la famille des sparidés pourrait contribuer à identifier des facteurs favorisant les mécanismes d'infestation qui pourraient être transposés à d'autres interactions hôte-parasite plus problématiques. Ainsi, connaître la réponse des larves de *Lamellodiscus* à divers stimuli pourrait ouvrir des perspectives intéressantes pour la gestion des infestations en aquaculture, où les monogènes sont responsables de grandes pertes économiques (Doan *et al.* 2020). Par exemple, si des molécules d'attraction sont identifiées, un dispositif d'appât chimique pourrait être imaginé, ce qui paraît prometteur pour le développement de traitements innovants (Skilton *et al.* 2020). Au contraire, si des bactéries sont identifiées comme ayant un rôle de répulsion, on pourra imaginer l'utilisation de probiotiques pour favoriser l'établissement et le maintien de ces taxons bactériens protecteurs au sein du mucus externe des téléostéens (Austin *et al.* 2022). Si des larves présentent un phototactisme positif à un moment de leur maturation, l'utilisation de pièges lumineux pourra être développée pour mieux contrôler les infestations de monogènes en aquaculture, comme cela est proposé par plusieurs auteurs (Flamarique *et al.* 2009 ; Yamamoto *et al.* 2014 ; Nordtug *et al.* 2021 ; Shirakashi *et al.* 2021). Ces nouvelles stratégies permettraient de développer des méthodes moins invasives, plus efficaces et respectueuses de l'environnement (Skilton *et al.* 2020). Cependant, le déploiement de tels systèmes doit s'accompagner d'études sur le cycle de vie des monogènes, pour faire coïncider leur utilisation avec l'émergence des stades infectieux et le moment du cycle de vie où ils peuvent s'avérer pertinents et efficaces (Skilton *et al.* 2020).

Propriétés physiques du mucus, un rôle dans la spécificité des monogènes ?

Lors de ce travail, nous avons émis l'hypothèse que les propriétés rhéologiques du mucus externe pourraient avoir un rôle dans la protection de certains individus face aux infestations, notamment de monogènes. La famille des sparidés pourrait à ce titre être un bon modèle pour étudier des mécanismes de protection vis-à-vis des ectoparasites en lien avec les propriétés rhéologiques du mucus externe. En effet, on trouve au sein de cette famille des espèces comme *Oblada melanura*, *Sarpa salpa* et *Pagellus erythrinus*, qui présentent de façon relativement constante des charges parasitaires élevées en *Lamellodiscus* quand d'autres espèces comme *Spicara maena* et *Pagrus pagrus* semblent relativement protégées avec de faibles charges parasitaires observées (Annexe 1). L'analyse physico-chimique du mucus externe de toutes les espèces de sparidés permettrait éventuellement de révéler des liens entre l'abondance de *Lamellodiscus* et des propriétés rhéologiques spécifiques. Bien que rarement prises en compte, les propriétés physiques du mucus pourraient avoir un rôle important dans la protection de l'hôte face aux pathogènes (Guardiola *et al.* 2015).

Travailler avec des populations sauvages

L'échantillonnage a été un facteur très limitant pour la réalisation de ce travail ce qui met en lumière les défis associés à la recherche au sein de populations sauvages et la difficulté d'effectuer un échantillonnage pertinent pour un questionnement scientifique précis.

Il est donc apparu évident que l'utilisation de conditions contrôlées serait pertinente pour mieux préciser le rôle du microbiote dans les relations hôtes-monogènes. Cependant, une fois que les mécanismes de la spécificité parasitaire seront mieux compris *in vitro* et *in vivo*, il sera nécessaire d'étudier la façon dont ces mécanismes s'expriment en milieu naturel, car les conditions contrôlées ne peuvent pas refléter entièrement la réalité biologique de ces associations. Il restera néanmoins plus simple de cibler des mécanismes précis et connus au sein de ces populations.

Conclusion

Tout au long de ma thèse, j'ai cherché à comprendre comment s'établit le profil de spécificité des monogènes au sein de l'association *Lamellodiscus*-Sparidae, en considérant notamment le rôle du microbiote externe. Les résultats obtenus au cours de ce travail suggèrent que la spécificité des monogènes est le résultat de nombreux facteurs et se met en place de manière complexe. La variabilité du microbiote externe, sous l'influence d'une multitude de facteurs, et la complexité des interactions parasitaires, nécessitent des approches interdisciplinaires, comme nous avons pu le montrer lors de ce travail. Si l'association entre les sparidés et les *Lamellodiscus* émerge comme un modèle biologique prometteur pour l'étude des déterminants de la spécificité parasitaire, il faudrait néanmoins confirmer les résultats avec d'autres associations téléostéens-monogènes ou plus généralement téléostéens-ectoparasites. Cette thèse ouvre de nouvelles perspectives pour étudier les déterminants de la spécificité des monogènes à l'échelle de l'holobionte.

Annexe

Tableau récapitulatif des individus échantillonnés au cours de ce travail et pour lesquels nous disposons des données de séquençage de l'ARNr 16S et les données brutes de LC-MS associés à leur mucus externe (peau et branchies). La couleur de la police indique les individus qui ont été injectés dans une même séquence de LC-MS et qui peuvent donc être comparés les uns aux autres (échantillons randomisés, QCs, blancs d'extraction...). Sur fond jaune apparaissent les individus qui ont été utilisés lors du Chapitre I, sur fond bleu les individus utilisés lors du chapitre II et sur fond vert les individus qui ont été utilisés dans les analyses des deux chapitres. La charge parasitaire indiquée est celle qui a été retrouvée au sein de 3 arcs branchiaux les plus externes.

Identité	Famille	Espèce	Date de capture	Lieu de capture	Taille (cm)	Poids (g)	Charge parasitaire
107	Sparidae	<i>Boops boops</i>	14/07/2021	Argelès	17,5	56,3	0
125	Sparidae	<i>Boops boops</i>	21/07/2021	Argelès	11,5	13	0
141	Sparidae	<i>Boops boops</i>	05/12/2021	Argelès	28	238,8	0
142	Sparidae	<i>Boops boops</i>	05/12/2021	Argelès	30	338,1	0
143	Sparidae	<i>Boops boops</i>	05/12/2021	Argelès	28	235,2	0
144	Sparidae	<i>Boops boops</i>	05/12/2021	Argelès	28	277,2	0
145	Sparidae	<i>Boops boops</i>	05/12/2021	Argelès	26	199,6	0
146	Sparidae	<i>Boops boops</i>	05/12/2021	Argelès	28	237,3	0
147	Sparidae	<i>Boops boops</i>	05/12/2021	Argelès	27	210,6	0
29	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	03/06/2021	Banyuls	12,5	27	0
37	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	03/06/2021	Banyuls	13,5	43,2	17
38	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	03/06/2021	Banyuls	14,5	52,7	6
41	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	03/06/2021	Banyuls	12	29,5	8
42	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	03/06/2021	Banyuls	12,5	35,9	0
43	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	03/06/2021	Banyuls	14,5	55	0
44	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	03/06/2021	Banyuls	14,5	52,8	0
80	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	24/06/2021	Banyuls	13	27,9	23
109	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	14/07/2021	Argelès	12,5	35,2	13
110	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	14/07/2021	Argelès	13	36,5	0
121	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	20/07/2021	Banyuls	14,5	51,5	49
122	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	20/07/2021	Banyuls	15	61,1	20
123	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	20/07/2021	Banyuls	12,5	31,7	90
124	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	20/07/2021	Banyuls	11,5	36,5	26
131	Sparidae	<i>Diplodus vulgaris</i>	22/07/2021	Argelès	18	92,1	0
132	Sparidae	<i>Diplodus vulgaris</i>	22/07/2021	Argelès	26	242,2	56
133	Sparidae	<i>Diplodus vulgaris</i>	22/07/2021	Argelès	20,5	140,6	33
135	Sparidae	<i>Diplodus vulgaris</i>	22/07/2021	Argelès	20	129,4	12
138	Sparidae	<i>Diplodus vulgaris</i>	14/09/2021	Argelès	19	108,5	1
101	Sparidae	<i>Oblada melanura</i>	14/07/2021	Argelès	22,5	131,6	89
102	Sparidae	<i>Oblada melanura</i>	14/07/2021	Argelès	26,5	234,8	64
103	Sparidae	<i>Oblada melanura</i>	14/07/2021	Argelès	25	199,5	68
104	Sparidae	<i>Oblada melanura</i>	14/07/2021	Argelès	25	207	167
105	Sparidae	<i>Oblada melanura</i>	14/07/2021	Argelès	22	158	22
112	Sparidae	<i>Oblada melanura</i>	20/07/2021	Banyuls	18	71,3	7

Identity	Famille	Espèce	Date de capture	Lieu de capture	Taille (cm)	Poids (g)	Charge parasitaire
167	Sparidae	<i>Sparus aurata</i>	29/03/2022	Argelès	27	256,1	13
168	Sparidae	<i>Sparus aurata</i>	29/03/2022	Argelès	30	330,8	20
169	Sparidae	<i>Sparus aurata</i>	29/03/2022	Argelès	30	303,6	5
65	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	11/06/2021	Banyuls	18	74,2	7
87	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	07/07/2021	Argelès	20,5	116,4	84
88	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	07/07/2021	Argelès	20	107,3	0
89	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	07/07/2021	Argelès	22	186,9	32
90	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	07/07/2021	Argelès	25,5	221	64
113	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	20/07/2021	Banyuls	19,5	91,2	1
114	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	20/07/2021	Banyuls	18	81,3	19
115	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	20/07/2021	Banyuls	18	67,8	0
116	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	20/07/2021	Banyuls	18	81	189
126	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	21/07/2021	Argelès	21	108,2	58
127	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	21/07/2021	Argelès	19,5	110,3	4
157	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	24/03/2022	Banyuls	19	88,3	12
163	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	29/03/2022	Argelès	22,5	137,7	82
164	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	29/03/2022	Argelès	18,5	188,3	23
165	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	29/03/2022	Argelès	24	209,6	19
166	Sparidae	<i>Pagellus acarne</i>	29/03/2022	Argelès	21,5	123,2	136
46	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	11/06/2021	Banyuls	16,5	51,3	29
49	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	11/06/2021	Banyuls	17,5	62,4	48
50	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	11/06/2021	Banyuls	18,5	67,4	41
52	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	11/06/2021	Banyuls	19,5	95,4	113
54	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	11/06/2021	Banyuls	17	58,6	37
55	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	11/06/2021	Banyuls	15,5	47,4	40
73	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	24/06/2021	Banyuls	15,5	49,8	43
75	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	24/06/2021	Banyuls	15,5	51,2	X
82	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	07/07/2021	Argelès	29	287,1	72
85	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	07/07/2021	Argelès	24	185,1	27
86	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	07/07/2021	Argelès	24	156	44
94	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	08/07/2021	Banyuls	16	58,6	53
118	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	20/07/2021	Banyuls	17	67,2	31
128	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	21/07/2021	Argelès	19	90,7	43
129	Sparidae	<i>Pagellus erythrinus</i>	22/07/2021	Argelès	21	119,7	21
59	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	11/06/2021	Banyuls	21,5	143,5	2
60	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	11/06/2021	Banyuls	18,5	76,7	0
62	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	11/06/2021	Banyuls	19	92,5	4
63	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	11/06/2021	Banyuls	19	83,5	0
70	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	16/06/2021	Banyuls	18,5	80,7	1
71	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	16/06/2021	Banyuls	19,5	95,5	3
72	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	16/06/2021	Banyuls	18	77,3	2
151	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	24/03/2022	Banyuls	21	109,2	2
152	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	24/03/2022	Banyuls	20	78,9	4
153	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	24/03/2022	Banyuls	20	90,3	1
154	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	24/03/2022	Banyuls	19	74,3	0
155	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	24/03/2022	Banyuls	18,5	67,2	1
156	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	24/03/2022	Banyuls	18,5	61,7	2
162	Sparidae	<i>Spicara maena</i>	24/03/2022	Banyuls	17,5	66,6	8

Identity	Famille	Espèce	Date de capture	Lieu de capture	Taille (cm)	Poids (g)	Charge parasitaire
31	Sparidae	<i>Sarpa salpa</i>	03/06/2021	Banyuls	21	137,2	24
96	Sparidae	<i>Sarpa salpa</i>	14/07/2021	Argelès	22,5	158	6
97	Sparidae	<i>Sarpa salpa</i>	14/07/2021	Argelès	23	165	25
98	Sparidae	<i>Sarpa salpa</i>	14/07/2021	Argelès	21,5	144,3	17
99	Sparidae	<i>Sarpa salpa</i>	14/07/2021	Argelès	22	145,5	36
100	Sparidae	<i>Sarpa salpa</i>	14/07/2021	Argelès	21,5	127,1	66
130	Sparidae	<i>Sarpa salpa</i>	22/07/2021	Argelès	26,5	277,4	38
140	Sparidae	<i>Sarpa salpa</i>	14/09/2021	Argelès	23,5	175,4	72
33	Sparidae	<i>Pagrus pagrus</i>	03/06/2021	Banyuls	15	62,7	0
68	Sparidae	<i>Pagrus pagrus</i>	16/06/2021	Banyuls	15	57,2	3
93	Sparidae	<i>Pagrus pagrus</i>	08/07/2021	Banyuls	14	45,3	3
106	Sparidae	<i>Pagrus pagrus</i>	14/07/2021	Argelès	16,5	64,9	4
137	Sparidae	<i>Pagrus pagrus</i>	14/09/2021	Argelès	21,5	146,1	0
EdM1	water	water	11/06/2021	Banyuls	water	water	X
EdM2	water	water	16/06/2021	Banyuls	water	water	X
EdM3	water	water	24/06/2021	Banyuls	water	water	X
EdM4	water	water	08/07/2021	Banyuls	water	water	X
EdM5	water	water	20/07/2021	Banyuls	water	water	X
EdM6	water	water	24/03/2022	Banyuls	water	water	X

Références

- Ab Rahman, M., Arshad, R., Shaharom, F., & Ariffin, N.A., 2012. Amino Acid and Fatty Acid Profile in Epidermal Mucus of Bluestreak Cleaner Wrasse (*Labroides dimidiatus*): Possible Role as Defense Mechanism against Pathogens, 6, 1371–1377.
- Adamson, M.L. & Caira, J.N., 1994. Evolutionary factors influencing the nature of parasite specificity. *Parasitology*, 109 Suppl, S85-95.
- Afrin, T., Murase, K., Kounosu, A., Hunt, V.L., Bligh, M., Maeda, Y., Hino, A., Maruyama, H., Tsai, I.J., & Kikuchi, T., 2019. Sequential Changes in the Host Gut Microbiota During Infection With the Intestinal Parasitic Nematode *Strongyloides venezuelensis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 217.
- Agosta, S., Janz, N., & Brooks, D., 2010. How Specialists Can Be Generalists: Resolving the 'Parasite Paradox' and Implications for Emerging Infectious Disease. *Zoologia (Curitiba)*, 27.
- Amine, F., Euzet, L., & Kechemir-Issad, N., 2006. Description de deux nouvelles espèces de *Lamellodiscus* Johnston & Tiegs, 1922 (Monogenea: Diplectanidae) du groupe morphologique 'ignoratus', parasites de *Diplodus sargus* et *D. vulgaris* (Teleostei: Sparidae). *Systematic Parasitology*, 64 (1), 37–45.
- Amine, F., Euzet, L., & Kechemir-Issad, N., 2007. *Lamellodiscus theroni* sp. nov. (Monogenea, Diplectanidae), a gill parasite from *Diplodus puntazzo* (Teleostei, Sparidae) from the Mediterranean Sea. *Acta Parasitologica*, 52 (4), 305–309.
- Archie, E.A. & Theis, K.R., 2011. Animal behaviour meets microbial ecology. *Animal Behaviour*, 82 (3), 425–436.
- Arts, M. & Kohler, C., 2009. Health and condition in fish: The influence of lipids on membrane competency and immune response. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*. 237–256.
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104 (3), 199–235.
- Attia, M.M., Abdelsalam, M., Elgendy, M.Y., & Sherif, A.H., 2022. *Dactylogyrus extensus* and *Pseudomonas fluorescens* dual infection in farmed common carp (*Cyprinus carpio*). *Microbial Pathogenesis*, 173, 105867.
- Bader, C., Starling, D.E., Jones, D.E., & Brewer, M.T., 2019. Use of praziquantel to control platyhelminth parasites of fish. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42 (2), 139–153.
- Baedke, J., Fábregas-Tejeda, A., & Nieves Delgado, A., 2020. The holobiont concept before Margulis. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 334 (3), 149–155.
- Bandilla, M., Valtonen, E., Suomalainen, L., Aphalo, P., & Hakalahti, T., 2006. A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. *International Journal for Parasitology*, 36 (9), 987–991.

- Barber, I., Hoare, D., & Krause, J., 2000. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10 (2), 131–165.
- Barko, P.C., McMichael, M.A., Swanson, K.S., & Williams, D.A., 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32 (1), 9–25.
- de Bary, A., 1879. *Die Erscheinung der Symbiose: Vortrag gehalten auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte zu Cassel*. Strassburg: Verlag von Karl J. Trübner.
- Bellay, S., de Oliveira, E.F., Almeida-Neto, M., Lima Junior, D.P., Takemoto, R.M., & Luque, J.L., 2013. Developmental Stage of Parasites Influences the Structure of Fish-Parasite Networks. *PLoS ONE*, 8 (10), e75710.
- Besson, M., Gilliot, P.-A.M.A., Gorochowski, T.E., & Clements, C.F., 2022. Automated tracking and species classification of shape-changing microorganisms.
- Bhatnagar, A., Kumari, S., & Tyor, A.K., 2023. Assessment of bactericidal role of epidermal mucus of *Heteropneustes fossilis* and *Clarias batrachus* (Asian cat fishes) against pathogenic microbial strains. *Aquaculture and Fisheries*, 8 (1), 50–58.
- Boeger, W.A. & Kritsky, D.C., 1993. Phylogeny and a revised classification of the Monogeneoidea Bychowsky, 1937 (Platyhelminthes). *Systematic Parasitology*, 26 (1), 1–32.
- Bondad-Reantaso, M.G., Ogawa, K., Fukudome, M., & Wakabayashi, H., 1995. Reproduction and Growth of *Neobenedenia girellae* (Monogenea: Capsalidae), a Skin Parasite of Cultured Marine Fishes of Japan. *Fish Pathology*, 30 (3), 227–231.
- Bordenstein, S.R. & Theis, K.R., 2015. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLoS biology*, 13 (8), e1002226.
- Boudaya, L., Neifar, L., & Euzet, L., 2009. Diplectanid parasites of *Lithognathus mormyrus* (L.) (Teleostei: Sparidae) from the Mediterranean Sea, with the description of *Lamellodiscus flagellatus* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae). *Systematic Parasitology*, 74 (2), 149–159.
- Bouguerche, C., Gey, D., Justine, J.-L., & Tazerouti, F., 2019. Towards the resolution of the *Microcotyle erythrini* species complex: description of *Microcotyle isyebi* n. sp. (Monogenea, Microcotylidae) from Boops boops (Teleostei, Sparidae) off the Algerian coast. *Parasitology Research*, 118 (5), 1417–1428.
- Brazenor, A.K. & Hutson, K.S., 2015. Effects of temperature and salinity on the life cycle of *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae) infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*). *Parasitology Research*, 114 (5), 1875–1886.
- Brinchmann, M.F., 2016. Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies. *Molecular BioSystems*, 12 (7), 2056–2063.
- Brooker, A.J., Shinn, A.P., Souissi, S., & Bron, J.E., 2013. Role of kairomones in host location of the pennellid copepod parasite, *Lernaecocera branchialis* (L. 1767). *Parasitology*, 140 (6), 756–770.
- Buchmann, K., 1988. Temperature-dependent reproduction and survival of *Pseudodactylogyrus bini* (Monogenea) on the European eel (*Anguilla anguilla*). *Parasitology Research*, 75 (2), 162–164.

- Buchmann, K., 1999. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans--a model. *Folia Parasitologica*, 46 (1), 1–9.
- Buchmann, K., 2002. Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology*, 32 (3), 309–319.
- Buchmann, K. & Bresciani, J., 1997. Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitology Research*, 84 (1), 17–24.
- Buchmann, K. & Jørgensen, L., 2021. *Ichthyophthirius multifiliis*. In: *Fish parasites: A Handbook of Protocols for their Isolation, Culture and Transmission*.
- Busch, S., Dalsgaard, I., & Buchmann, K., 2003. Concomitant exposure of rainbow trout fry to *Gyrodactylus derjavini* and *Flavobacterium psychrophilum*: effects on infection and mortality of host. *Veterinary Parasitology*, 117 (1–2), 117–122.
- Bush, A., Fernández, J., Esch, G., & Seed, J., 2001. *Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites*. Parasitology.
- Butt, R.L. & Volkoff, H., 2019. Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 9.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., & Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (supplement_1), 4516–4522.
- Cardon, M., Loot, G., Grenouillet, G., & Blanchet, S., 2011. Host characteristics and environmental factors differentially drive the burden and pathogenicity of an ectoparasite: a multilevel causal analysis. *The Journal of Animal Ecology*, 80 (3), 657–667.
- Cecchini, Saroglia, Berni, & Cognetti-Varriale, 1998. Influence of temperature on the life cycle of *Diplectanum aequans* (Monogenea, Diplectanidae), parasitic on sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of fish diseases*, 21 1, 73–75.
- Celussi, M., Cataletto, B., Fonda Umani, S., & Del Negro, P., 2009. Depth profiles of bacterioplankton assemblages and their activities in the Ross Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 56 (12), 2193–2205.
- Chavez, I.N., Brown, T.M., Assié, A., Bryant, A.S., Samuel, B.S., & Hallem, E.A., 2021. Skin-penetrating nematodes exhibit life-stage-specific interactions with host-associated and environmental bacteria. *BMC Biology*, 19 (1), 221.
- Cheney, K.L. & Côté, I.M., 2005. Mutualism or parasitism? The variable outcome of cleaning symbioses. *Biology Letters*, 1 (2), 162–165.
- Chiarello, M., Auguet, J.-C., Bettarel, Y., Bouvier, C., Claverie, T., Graham, N.A.J., 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 (1), 147.

- Chiarello, M., Villéger, S., Bouvier, C., Bettarel, Y., & Bouvier, T., 2015. High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiology Ecology*, 91 (7), fiv061.
- Chigasaki, M., Nakane, M., Ogawa, K., & Wakabayashi, H., 2000. Standardized Method for Experimental Infection of Tiger Puffer Takifugu rubripes with Oncomiracidia of Heterobothrium okamotoi (Monogenea: Diclidophoridae) with Some Data on the Oncomiracidial Biology. *Fish Pathology*, 35 (4), 215–221.
- Chomicki, G., Beinart, R., Prada, C., Ritchie, K.B., & Weber, M.G., 2022. Editorial: Symbiotic Relationships as Shapers of Biodiversity. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10.
- Chong, K., Joshi, S., Jin, L.T., & Shu-Chien, A.C., 2006. Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior. *Proteomics*, 6 (7), 2251–2258.
- Clemente, J., Ursell, L., Wegener Parfrey, L., & Knight, R., 2012. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*, 148, 1258–70.
- Clerissi, C., Chaïb, S., Raviglione, D., Espiau, B., Bertrand, C., & Meyer, J.-Y., 2023. Metabarcoding and Metabolomics Reveal the Effect of the Invasive Alien Tree *Miconia calvescens* DC. on Soil Diversity on the Tropical Island of Mo'orea (French Polynesia). *Microorganisms*, 11 (4), 832.
- Cleveland, A., Verde, E.A., & Lee, R.W., 2011. Nutritional exchange in a tropical tripartite symbiosis: direct evidence for the transfer of nutrients from anemonefish to host anemone and zooxanthellae. *Marine Biology*, 158 (3), 589–602.
- Colorni, A., Ullal, A., Heinisch, G., & Noga, E.J., 2008. Activity of the antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites. *Journal of Fish Diseases*, 31 (6), 423–432.
- Combes, C., 1995. *Interactions durables. Écologie et évolution du parasitisme*.
- Combes, C., 2001. *Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Cooper, D. & Eleftherianos, I., 2016. Parasitic Nematode Immunomodulatory Strategies: Recent Advances and Perspectives. *Pathogens*, 5 (3), 58.
- Cotton, S., Donnelly, S., Robinson, M.W., Dalton, J.P., & Thivierge, K., 2012. Defense peptides secreted by helminth pathogens: antimicrobial and/or immunomodulator molecules? *Frontiers in Immunology*, 3.
- Cribb, B., Chisholm, L., Gould, R., & Whittington, I., 2003. Morphology, ultrastructure, and implied function of ciliated sensory structures on the developmental stages of *Merizocotyle icopae* (Monogenea: Monocotylidae). *Microscopy Research and Technique*, 62 (3), 267–276.
- Dalvin, S., Skaftnesmo, K.O., Malde, K., Glover, K.A., Leong, J.S., Koop, B.F., Edvardsen, R.B., & Sandlund, N., 2020. Microbial communities associated with the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*. *Marine Genomics*, 49, 100688.
- Dash, S., Das, S.K., Samal, J., & Thatoi, H.N., 2018. Epidermal mucus, a major determinant in fish health:

- a review. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19 (2), 72–81.
- Desdevises, Y., 2000. Recherche des déterminants de la spécificité parasitaire dans le modèle *Lamellodiscus* (Diplectanidae, Monogenea)-Sparidae (Teleostei) en Méditerranée.
- Desdevises, Y., 2001. The phylogenetic position of *Furnestinia echeneis* (Monogenea, Diplectanidae) based on molecular data: a case of morphological adaptation? *International Journal for Parasitology*.
- Devine, G., Ingvarsdottir, A., Mordue, W., Pike, A., Pickett, J., Duce, I., & Mordue, A., 2000. Salmon Lice, *Lepeophtheirus salmonis*, Exhibit Specific Chemotactic Responses to Semiochemicals Originating from the Salmonid, *Salmo salar*. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 1833–1847.
- Dheilly, N.M., 2014. Holobiont–Holobiont Interactions: Redefining Host–Parasite Interactions. *PLOS Pathogens*, 10 (7), e1004093.
- Diamanka, A., Boudaya, L., Toguebaya, B.S., & Pariselle, A., 2011. *Lamellodiscus euzeti* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae), a parasite from *Dentex canariensis* and *D. gibbosus* (Teleostei: Sparidae) in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Parasite : journal de la Société Française de Parasitologie*, 18 (2), 145–150.
- Díaz-Puertas, R., Adamek, M., Mallavia, R., & Falco, A., 2023. Fish Skin Mucus Extracts: An Underexplored Source of Antimicrobial Agents. *Marine Drugs*, 21 (6), 350.
- Doan, H.V., Soltani, E., Ingelbrecht, J., & Soltani, M., 2020. Medicinal Herbs and Plants: Potential Treatment of Monogenean Infections in Fish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28 (2), 260–282.
- Doherty, J.-F., Milotic, M., Filion, A., & Eriksson, A., 2022. Host specificity and the reproductive strategies of parasites. *Parasitology*, 149 (4), 534–541.
- Ducklow, H. & Kirchman, D., 2000. *Bacterial Production and Biomass in the Oceans*. Microbial Ecology of the Oceans.
- Dunn, A.M., 2009. Chapter 7 Parasites and Biological Invasions. *In: Advances in Parasitology*. Academic Press, 161–184.
- Ekman, D.R., Evich, M.G., Mosley, J.D., Doering, J.A., Fay, K.A., Ankley, G.T., & Collette, T.W., 2023. Expanding non-invasive approaches for fish-health monitoring: A survey of the epidermal mucous metabolomes of phylogenetically diverse freshwater fish species. *Journal of Fish Biology*, 103 (5), 1178–1189.
- Ernst, I. & Whittington, I.D., 1996. Hatching rhythms in the capsalid monogeneans *Benedenia lutjani* from the skin and *B. rohdei* from the gills of *Lutjanus carponotatus* at Heron Island, Queensland, Australia. *International Journal for Parasitology*, 26 (11), 1191–1204.
- Escalas, A., Auguet, J.-C., Avouac, A., Seguin, R., Gradel, A., Borrossi, L., & Villéger, S., 2021. Ecological Specialization Within a Carnivorous Fish Family Is Supported by a Herbivorous Microbiome Shaped by a Combination of Gut Traits and Specific Diet. *Frontiers in Marine Science*, 8.
- Esteban, M., 2012. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology*, 2012.

- Euzet, L., 1984. Diplectanidae (Monogenea) parasites de poissons des Iles Kerkennah (Tunisie). *Arch Inst Pasteur Tunis*, 61, 436–74.
- Euzet, L. & Audouin, J., 1959. Sur un genre nouveau de monogénoïde parasite de la dorade *Chrysophrys aurata* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 23 (3), 317–322.
- Euzet, L. & Oliver, G., 1966. Diplectanidae (Monogenea) des téléostéens de la Méditerranée occidentale. 3. Quelques *Lamellodiscus* Johnston et Tiegs, 1922, parasites de poissons du genre *Diplodus* (Sparidae). *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 41 (6), 573–98.
- Euzet, L. & Oliver, G., 1967. Diplectanidae (Monogenea) de Téléostéens de la Méditerranée occidentale. IV. Quelques *Lamellodiscus* Johnston et Tiegs, 1922, parasites de poissons du genre *Pagellus* Cuvier, 1829 (Sparidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 42(4), 407–25.
- Ezenwa, V.O., Gerardo, N.M., Inouye, D.W., Medina, M., & Xavier, J.B., 2012. Microbiology. Animal behavior and the microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 338 (6104), 198–199.
- Fajer-Ávila, E.J., Velásquez-Medina, S.P., & Betancourt-Lozano, M., 2007. Effectiveness of treatments against eggs, and adults of *Haliotrema* sp. and *Euryhaliotrema* sp. (Monogenea: Ancyrocephalinae) infecting red snapper, *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 264 (1–4), 66–72.
- Faliex, E., Dasilva, C., Simon, G., & Sasal, P., 2008. Dynamic expression of immune response genes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, experimentally infected with the monogenean *Diplectanum aequans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 24 (6), 759–767.
- Fautin, D., 1991. The anemonefish symbiosis: What is known and what is not. *Symbiosis*, 10.
- Federici, E., Rossi, R., Fidati, L., Paracucchi, R., Scargetta, S., Montalbani, E., Franzetti, A., La Porta, G., Fagotti, A., Simonceli, F., Cenci, G., & Di Rosa, I., 2015. Characterization of the Skin Microbiota in Italian Stream Frogs (*Rana italica*) Infected and Uninfected by a Cutaneous Parasitic Disease. *Microbes and environments*, 30 (3), 262–269.
- Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Viscor, G., Gisbert, E., Herrera, M., & Ibarz, A., 2018. Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A valuable non-invasive method to study teleost marine species. *The Science of the Total Environment*, 644, 1323–1335.
- Flamarique, I., Gulbransen, C., Galbraith, M., & Stucchi, D., 2009. Monitoring and potential control of sea lice using an LED-based light trap. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66, 1371–1382.
- Forwood, J.M., Harris, J.O., & Deveney, M.R., 2013. Efficacy of current and alternative bath treatments for *Lepidotrema bidyana* infecting silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture*, 416–417, 65–71.
- Fraile, L., Escoufier, Y., & Raibaut, A., 1993. Analyse des correspondances de données planifiées: étude de la chémotaxie de la larve infestante d'un parasite. *Biometrics*, (49), 1142–1153.
- Frank, S.A., 1996. Models of Parasite Virulence. *The Quarterly Review of Biology*, 71 (1), 37–78.

- Fredensborg, B.L., Fossdal Í Kálvalíð, I., Johannesen, T.B., Stensvold, C.R., Nielsen, H.V., & Kapel, C.M.O., 2020. Parasites modulate the gut-microbiome in insects: A proof-of-concept study. *PLOS ONE*, 15 (1), e0227561.
- Fuochi, V., Li Volti, G., Camiolo, G., Tiralongo, F., Giallongo, C., Distefano, A., Petronio Petronio, G., Barbagallo, I., Viola, M., Furneri, P.M., Di Rosa, M., Avola, R., & Tibullo, D., 2017. Antimicrobial and Anti-Proliferative Effects of Skin Mucus Derived from *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). *Marine Drugs*, 15 (11), 342.
- Gannicott, A.M. & Tinsley, R.C., 1997. Egg hatching in the monogenean gill parasite *Discocotyle sagittata* from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasitology*, 114 (6), 569–579.
- Gannicott, A.M. & Tinsley, R.C., 1998. Larval survival characteristics and behaviour of the gill monogenean *Discocotyle sagittata*. *Parasitology*, 117 (5), 491–498.
- Ghehdarijani, M.S., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., & Roohi, Z., 2016. The effects of garlic-supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 79–83.
- Glennon, V., Chisholm, L.A., & Whittington, I.D., 2007. Experimental infections, using a fluorescent marker, of two elasmobranch species by unciliated larvae of *Branchotenthes octohamatus* (Monogenea: Hexabothriidae): invasion route, host specificity and post-larval development. *Parasitology*, 134 (Pt 9), 1243–1252.
- Gomez, D., Sunyer, J.O., & Salinas, I., 2013. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 35 (6), 1729–1739.
- Gonçalves, A.T., Collipal-Matamal, R., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C., 2020. Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens. *Scientific Reports*, 10 (1), 2895.
- Grutter, A.S., 2001. Parasite infection rather than tactile stimulation is the proximate cause of cleaning behaviour in reef fish. *Proceedings. Biological Sciences*, 268 (1474), 1361–1365.
- Grutter, A.S. & Bshary, R., 2003. Cleaner wrasse prefer client mucus: support for partner control mechanisms in cleaning interactions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (suppl_2), S242–S244.
- Grutter, A.S., Rumney, J.G., Sinclair-Taylor, T., Waldie, P., & Franklin, C.E., 2011. Fish mucous cocoons: the ‘mosquito nets’ of the sea. *Biology Letters*, 7 (2), 292–294.
- Guardiola, F.A., Cuartero, M., Del Mar Collado-González, M., Arizcún, M., Díaz Baños, F.G., Meseguer, J., Cuesta, A., & Esteban, M.A., 2015. Description and comparative study of physico-chemical parameters of the teleost fish skin mucus. *Biorheology*, 52 (4), 247–256.
- Haas, W., Stiegeler, P., Keating, A., Kullmann, B., Rabenau, H., Schönamsgruber, E., & Haberl, B., 2002. *Diplostomum spathaceum* cercariae respond to a unique profile of cues during recognition of their fish host. *International Journal for Parasitology*, 32 (9), 1145–1154.
- Hahn, M.A. & Dheilly, N.M., 2016. Experimental Models to Study the Role of Microbes in Host-Parasite

- Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Hall, M.J., 1995. Trapping the flies that cause myiasis: their responses to host-stimuli. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 89 (4), 333–357.
- Hatcher, M., Dick, J., & Dunn, A., 2012. Diverse effects of parasites in ecosystems: Linking interdependent processes. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 10, 186–194.
- Heim, S., Teav, T., Gallart-Ayala, H., Ivanisevic, J., & Salamin, N., 2023. Divergence in metabolomic profile in clownfish and damselfish skin mucus. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11.
- Hellio, C., Pons, A.M., Beaupoil, C., Bourgougnon, N., & Gal, Y.L., 2002. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20 (3), 214–219.
- Henry, M.A., Nikoloudaki, C., Tsigenopoulos, C., & Rigos, G., 2015. Strong effect of long-term *Sparicotyle chrysophrii* infection on the cellular and innate immune responses of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 51 (1), 185–193.
- Hirazawa, N., Ishizuka, R., & Hagiwara, H., 2016. The effects of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection on host amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae): Hematological and histopathological analyses. *Aquaculture*, 461, 32–39.
- Hirazawa, N., Oshima, S., Mitsuboshi, T., & Yamashita, S., 2003. Mucus pH of the tiger puffer *Takifugu rubripes* is an important factor for host identification by the monogenean *Heterobothrium okamotoi*. *Parasitology*, 127 (3), 225–230.
- Hoai, T.D., 2020. Reproductive strategies of parasitic flatworms (Platyhelminthes, Monogenea): the impact on parasite management in aquaculture. *Aquaculture International*, 28 (1), 421–447.
- Hoai, T.D. & Hutson, K.S., 2014. Reproductive Strategies of the Insidious Fish Ectoparasite, *Neobenedenia* sp. (Capsalidae: Monogenea). *PLOS ONE*, 9 (9), e108801.
- Hodova, I., Matejusova, I., & Gelnar, M., 2010. The surface topography of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) developmental stages parasitizing carp (*Cyprinus carpio* L.). *Central European Journal of Biology*, 5, 702–709.
- Huang, Z.-H., Ma, A.-J., & Wang, X.-A., 2011. The immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), skin to high water temperature. *Journal of Fish Diseases*, 34 (8), 619–627.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P., & Lafferty, K.D., 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution*, 21 (7), 381–385.
- Hussain, A. & Ghosh Sachan, S., 2023. Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of Epidermal Mucus Extract from Air-Breathing Fish (*Channa punctatus*) and Identification of the Peptides Serving as Immune Components. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 30 (1), 4.
- Hutson, K.S., Brazenor, A.K., Vaughan, D.B., & Trujillo-González, A., 2018. Monogenean Parasite Cultures: Current Techniques and Recent Advances. *In: Advances in Parasitology*. Elsevier, 61–91.

- Igarashi, K., Matsunaga, R., Hirakawa, S., Hosoya, S., Suetake, H., Kikuchi, K., Suzuki, Y., Nakamura, O., Miyadai, T., Tasumi, S., & Tsutsui, S., 2017. Mucosal IgM Antibody with D-Mannose Affinity in Fugu *Takifugu rubripes* Is Utilized by a Monogenean Parasite *Heterobothrium okamotoi* for Host Recognition. *The Journal of Immunology*, 198 (10), 4107–4114.
- Ilgová, J., Salát, J., & Kašný, M., 2021. Molecular communication between the monogenea and fish immune system. *Fish & Shellfish Immunology*, 112, 179–190.
- Ings, T.C., Montoya, J.M., Bascompte, J., Blüthgen, N., Brown, L., Dormann, C.F., Edwards, F., Figueroa, D., Jacob, U., Jones, J.I., Lauridsen, R.B., Ledger, M.E., Lewis, H.M., Olesen, J.M., van Veen, F.J.F., Warren, P.H., & Woodward, G., 2009. Ecological networks--beyond food webs. *The Journal of Animal Ecology*, 78 (1), 253–269.
- Irshath, A.A., Rajan, A.P., Vimal, S., Prabhakaran, V.-S., & Ganesan, R., 2023. Bacterial Pathogenesis in Various Fish Diseases: Recent Advances and Specific Challenges in Vaccine Development. *Vaccines*, 11 (2), 470.
- Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S.N., Boelio, L.M., & Perlman, S.J., 2010. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science (New York, N.Y.)*, 329 (5988), 212–215.
- Jia, R., Du, J., Cao, L., Feng, W., He, Q., Xu, P., & Yin, G., 2020. Chronic exposure of hydrogen peroxide alters redox state, apoptosis and endoplasmic reticulum stress in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 229, 105657.
- Jochum, L. & Stecher, B., 2020. Label or Concept - What Is a Pathobiont? *Trends in Microbiology*, 28 (10), 789–792.
- Kashinskaya, E.N., Simonov, E.P., Andree, K.B., Vlasenko, P.G., Polenogova, O.V., Kiriukhin, B.A., & Solovyev, M.M., 2021. Microbial community structure in a host–parasite system: the case of Prussian carp and its parasitic crustaceans. *Journal of Applied Microbiology*, 131 (4), 1722–1741.
- Kearn, G., 2004a. *Leeches, Lice and Lampreys: A Natural History of Skin and Gill Parasites of Fishes*.
- Kearn, G.C., 1963. The egg, oncomiracidium and larval development of *Entobdella soleae*, a monogenean skin parasite of the common sole. *Parasitology*, 53 (3–4), 435–447.
- Kearn, G.C., 1967. Experiments on host-finding and host-specificity in the monogenean skin parasite *Entobdella soleae*. *Parasitology*, 57 (3), 585–605.
- Kearn, G.C., 1973. An endogenous circadian hatching rhythm in the monogenean skin parasite *Entobdella soleae*, and its relationship to the activity rhythm of the host (*Solea solea*). *Parasitology*, 66 (1), 101–122.
- Kearn, G.C., 1974. Nocturnal hatching in the monogenean skin parasite *Entobdella hippoglossi* from the halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Parasitology*, 68 (2), 161–172.
- Kearn, G.C., ed., 2004b. Monogenean (flatworm) skin parasites – *Entobdella*. In: *Leeches, Lice and Lampreys: A Natural History of Skin and Gill Parasites of Fishes*. Dordrecht: Springer Netherlands, 37–60.

- Kelly, C. & Salinas, I., 2017. Under Pressure: Interactions between Commensal Microbiota and the Teleost Immune System. *Frontiers in Immunology*, 8, 559.
- Kennedy, D.A., Kurath, G., Brito, I.L., Purcell, M.K., Read, A.F., Winton, J.R., & Wargo, A.R., 2016. Potential drivers of virulence evolution in aquaculture. *Evolutionary Applications*, 9 (2), 344–354.
- Khouadja, S., Lamari, F., Bakhrouf, A., & Gaddour, K., 2014. Virulence properties, biofilm formation and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolates from cultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microbial Pathogenesis*, 69.
- Kiemer, M.C.B. & Black, K.D., 1997. The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmo solar* L. *Aquaculture*, 153 (3), 181–189.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41 (1), e1–e1.
- Kolarova, J., Zuskova, E., & Velisek, J., 2023. Efficacy of a therapeutic bath with selected antiparasitic drugs on a *Dactylogyrus anchoratus* infection in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinární medicína*, 67 (12), 620–627.
- Koops, H. & Hartmann, F., 1989. Anguillicola-infestations in Germany and in German eel imports. *Journal of Applied Ichthyology* 5, pp. 41–45.
- Koprivnikar, J. & Randhawa, H.S., 2013. Benefits of fidelity: does host specialization impact nematode parasite life history and fecundity? *Parasitology*, 140 (5), 587–597.
- Kosmides, A.K., Kamisoglu, K., Calvano, S.E., Corbett, S.A., & Androulakis, I.P., 2013. Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 41 (3), 205–221.
- Kueneman, J.G., Woodhams, D.C., Harris, R., Archer, H.M., Knight, R., & McKenzie, V.J., 2016. Probiotic treatment restores protection against lethal fungal infection lost during amphibian captivity. *Proceedings. Biological Sciences*, 283 (1839), 20161553.
- Kumari, S. & Yadav, S., 2020. Study of Antifungal Activity of Epidermal Mucus of Three Fresh Water Fishes. *Annals of Biology*, 36, 75–80.
- Lafferty, K., 2008. Ecosystem consequences of fish parasites*. *Journal of Fish Biology*, 73, 2083–2093.
- Lambert, A., 1980. Oncomiracidiums et phylogénèse des Monogenea (Plathelminthes): I^{re} Partie : Développement post-larvaire. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 55 (2), 165–198.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S.A., & Arias, C.R., 2013. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiology Ecology*, 85 (3), 483–494.
- Larsen, A.M., Bullard, S.A., Womble, M., & Arias, C.R., 2015. Community Structure of Skin Microbiome of Gulf Killifish, *Fundulus grandis*, Is Driven by Seasonality and Not Exposure to Oiled Sediments

- in a Louisiana Salt Marsh. *Microbial Ecology*, 70 (2), 534–544.
- Le Brun, N., Renaud, F., & Lambert, A., 1988. The genus *Diplozoon* (Monogenea, Polyopisthocotylea) in southern France: Speculation and specificity. *International Journal for Parasitology*, 18 (3), 395–400.
- Lee, S.C., Tang, M.S., Lim, Y.A.L., Choy, S.H., Kurtz, Z.D., Cox, L.M., Gundra, U.M., Cho, I., Bonneau, R., Blaser, M.J., Chua, K.H., & Loke, P., 2014. Helminth Colonization Is Associated with Increased Diversity of the Gut Microbiota. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8 (5), e2880.
- Lee, Y.K. & Mazmanian, S.K., 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science (New York, N.Y.)*, 330 (6012), 1768–1773.
- Leef, M.J. & Lee, P.S., 2009. Preliminary investigation into the killing effect of kingfish (*Seriola lalandi*) serum and mucus against the monogenean parasites *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*. *Aquaculture International*, 17 (6), 607–614.
- Legrand, T.P.R.A., Catalano, S.R., Wos-Oxley, M.L., Stephens, F., Landos, M., Bansemmer, M.S., Stone, D.A.J., Qin, J.G., & Oxley, A.P.A., 2018. The Inner Workings of the Outer Surface: Skin and Gill Microbiota as Indicators of Changing Gut Health in Yellowtail Kingfish. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Lengfelder, I., Sava, I.G., Hansen, J.J., Kleigrewe, K., Herzog, J., Neuhaus, K., Hofmann, T., Sartor, R.B., & Haller, D., 2019. Complex Bacterial Consortia Reprogram the Colitogenic Activity of *Enterococcus faecalis* in a Gnotobiotic Mouse Model of Chronic, Immune-Mediated Colitis. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Leonard, G., Maie, T., Moody, K.N., Schrank, G.D., Blob, R.W., & Schoenfuss, H.L., 2012. Finding paradise: cues directing the migration of the waterfall climbing Hawaiian gobioid *Sicyopterus stimpsoni*. *Journal of Fish Biology*, 81 (2), 903–920.
- Leung, T. & Poulin, R., 2008. Parasitism, commensalism, and mutualism: Exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu*, 58, 107–115.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., & Gordon, J.I., 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science (New York, N.Y.)*, 320 (5883), 1647–1651.
- Lindenstrøm, T., Buchmann, K., & Secombes, C.J., 2003. *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin. *Fish & Shellfish Immunology*, 15 (2), 107–115.
- Lindenstrøm, T., Secombes, C.J., & Buchmann, K., 2004. Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 97 (3), 137–148.
- Llewellyn, M.S., Boutin, S., Hoseinifar, S.H., & Derome, N., 2014. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Llewellyn, M.S., Leadbeater, S., Garcia, C., Sylvain, F.-E., Custodio, M., Ang, K.P., Powell, F., Carvalho, G.R., Creer, S., Elliot, J., & Derome, N., 2017. Parasitism perturbs the mucosal microbiome of

- Atlantic Salmon. *Scientific Reports*, 7 (1), 43465.
- Lokesh, J. & Kiron, V., 2016. Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 6, 19707.
- López, C., Jesudhasan, P., Lin, H.-Y., & Yang, H.-L., 2002. Disease outbreak in farmed Cobia (*Rachycentron canadum*) associated with *Vibrio* Spp., *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, monogenean and myxosporean parasites. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*, 22, 206–211.
- López Nadal, A., Ikeda-Ohtsubo, W., Sipkema, D., Peggs, D., McGurk, C., Forlenza, M., Wiegertjes, G.F., & Brugman, S., 2020. Feed, Microbiota, and Gut Immunity: Using the Zebrafish Model to Understand Fish Health. *Frontiers in Immunology*, 11, 114.
- Lowrey, L., Woodhams, D.C., Tacchi, L., & Salinas, I., 2015. Topographical Mapping of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Microbiome Reveals a Diverse Bacterial Community with Antifungal Properties in the Skin. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (19), 6915–6925.
- Lutz, H.L., Gilbert, J.A., & Dick, C.W., 2022. Associations between Afrotropical bats, eukaryotic parasites, and microbial symbionts. *Molecular Ecology*, 31 (7), 1939–1950.
- MacDonald, S., 1974. Host skin mucus as a hatching stimulant in *Acanthocotyle lobianchi*, a monogenean from the skin of *Raja* spp. *Parasitology*, 68 (3), 331–338.
- Maciel, P.O. & Affonso, E.G., 2021. Praziquantel against monogeneans of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture International*, 29 (5), 2369–2386.
- Maillard, C., 1971. [Evolutionary cycle of *Cainocreadium labracis* (Dujardin, 1845) (Trematoda, Allocreadiidae)]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles*, 272 (26), 3303–3306.
- Marchiori, N., Tancredo, K., Roubledakis, K., Gonçalves, E.L.T., Pereira, J., & Martins, M.L., 2013. New technique for collecting eggs from monogenean parasites. *Experimental Parasitology*, 134 (2), 138–140.
- Marcogliese, D., 2004. Parasites: Small Players with Crucial Roles in the Ecological Theater. *EcoHealth*, 1, 151–164.
- van der Marel, M., Caspari, N., Neuhaus, H., Meyer, W., Enss, M.-L., & Steinhagen, D., 2010. Changes in skin mucus of common carp, *Cyprinus carpio* L., after exposure to water with a high bacterial load. *Journal of Fish Diseases*, 33 (5), 431–439.
- Margulis, L. & Fester, R., 1991. *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. L. Margulis RFE, editor. Cambridge: MIT press.
- Mathieu-Bégné, E., Blanchet, S., Rey, O., Toulza, E., Veyssièrre, C., Manzi, S., Lefort, M., Scelsi, O., & Loot, G., 2023. A longitudinal survey in the wild reveals major shifts in fish host microbiota after parasite infection. *Molecular Ecology*, 32 (11), 3014–3024.
- Matsui, S., Goto, T., Tsubouchi, Y., Hirakawa, S., Suetake, H., Miyadai, T., Nakamura, O., Tasumi, S., &

- Tsutsui, S., 2020. D-Mannose-Specific Immunoglobulin M in Grass Puffer (Takifugu niphobles), a Nonhost Fish of a Monogenean Ectoparasite Heterobothrium okamotoi, Can Act as a Trigger for Its Parasitism. *Journal of Parasitology*, 106 (2), 276.
- Mazorra-Alonso, M., Tomás, G., & Soler, J.J., 2021. Microbially Mediated Chemical Ecology of Animals: A Review of Its Role in Conspecific Communication, Parasitism and Predation. *Biology*, 10 (4), 274.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M.G., Bosch, T.C.G., Carey, H.V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A.E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S.F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A.H., Kremer, N., Mazmanian, S.K., Metcalf, J.L., Neelson, K., Pierce, N.E., Rawls, J.F., Reid, A., Ruby, E.G., Rumpho, M., Sanders, J.G., Tautz, D., & Wernegreen, J.J., 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (9), 3229–3236.
- Mendlová, M. & Šimková, A., 2014. Evolution of host specificity in monogeneans parasitizing African cichlid fish. *Parasites & Vectors*, 7 (1), 69.
- Mennerat, A., Nilsen, F., Ebert, D., & Skorping, A., 2010. Intensive Farming: Evolutionary Implications for Parasites and Pathogens. *Evolutionary Biology*, 37 (2), 59–67.
- Meyer-Abich, A., 1943. I. Das Typologische Grundgesetz und Seine Folgerungen Für Phylogenie und Entwicklungsphysiologie. *Acta Biotheoretica*, 7 (1), 1–80.
- Miller, T.L., Small, H.J., Peemoeller, B.-J., Gibbs, D.A., & Shields, J.D., 2013. Experimental infections of *Orchitophrya stellarum* (Scuticociliata) in American blue crabs (*Callinectes sapidus*) and fiddler crabs (*Uca minax*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 114 (3), 346–355.
- Minich, J.J., Petrus, S., Michael, J.D., Michael, T.P., Knight, R., & Allen, E.E., 2020. Temporal, Environmental, and Biological Drivers of the Mucosal Microbiome in a Wild Marine Fish, *Scomber japonicus*. *mSphere*, 5 (3), e00401-20.
- Mladineo, I., Šegvić, T., & Grubišić, L., 2009. Molecular evidence for the lack of transmission of the monogenean *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea, Polyopisthocotylea) and isopod *Ceratothoa oestroides* (Crustacea, Cymothoidae) between wild bogue (*Boops boops*) and cage-reared sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 295 (3), 160–167.
- Moisander, P.H., Sexton, A.D., & Daley, M.C., 2015. Stable Associations Masked by Temporal Variability in the Marine Copepod Microbiome. *PLOS ONE*, 10 (9), e0138967.
- Mokhtar, D.M., Zaccone, G., Alesci, A., Kuciel, M., Hussein, M.T., & Sayed, R.K.A., 2023. Main Components of Fish Immunity: An Overview of the Fish Immune System. *Fishes*, 8 (2), 93.
- Mooney, A.J., Ernst, I., & Whittington, I.D., 2006. An egg-laying rhythm in *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae), a gill parasite of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 253 (1–4), 10–16.
- Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M.J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J.A., Dzutsev, A., Kong, H., Campbell, D.J., Trinchieri, G., Segre, J.A., & Belkaid, Y., 2012. Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. *Science*, 337 (6098), 1115–1119.

- Neifar, 1995. Contribution à l'étude de la biodiversité des monogènes parasites de poissons du secteur nord-est de la Tunisie. *Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies. Université de Tunis.*
- Noga, E.J., 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment, Second Edition. *In: Fish Disease.* John Wiley & Sons, Ltd.
- Nordtug, T., Kvæstad, B., & Hagemann, A., 2021. Responses and preferences of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer 1836) copepodids to underwater artificial light sources. *Aquaculture*, 532, 736036.
- Ohashi, H., Umeda, N., Hirazawa, N., Ozaki, Y., Miura, C., & Miura, T., 2007. Purification and identification of a glycoprotein that induces the attachment of oncomiracidia of *Neobenedenia girellae* (Monogenea, Capsalidae). *International Journal for Parasitology*, 37 (13), 1483–1490.
- Ohashi, Y., Yoshinaga, T., & Ogawa, K., 2007. Involvement of host recognition by oncomiracidia and post-larval survivability in the host specificity of *Heterobothrium okamotoi* (Monogenea: Dicliphoridae). *International Journal for Parasitology*, 37 (1), 53–60.
- Oliver, G., 1973. *Lamellogaster obeliae* n. sp. une nouvelle espèce de Diplectanidae (Monogenea, Monopisthocotylea) parasite de *Pagellus centrodontus* (Delaroche, 1809) (Pisces, Sparidae). *Z F Parasitenkunde*, 41, 103–108.
- Oliver, G., 1974. Nouveaux aspects du parasitisme des Diplectanidae Bychowsky, 1957 (Monogenea, Monopisthocotylea) chez les Téléostéens Perciformes des côtes de France. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 279, 803–5.
- Oliver, G., 1987. Les Diplectanidae Bychowsky, 1957 (Monogenea, Monopisthocotylea, Dactylogyridea), Systématique, Biologie, Ontogénie, Écologie, essai de phylogénèse. *Thèse d'État: Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.*
- Pei, Y., Chen, C., Mu, Y., Yang, Y., Feng, Z., Li, B., Li, H., & Li, K., 2021. Integrated Microbiome and Metabolome Analysis Reveals a Positive Change in the Intestinal Environment of Myostatin Edited Large White Pigs. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628685.
- Piazzon, M.C., Mladineo, I., Naya-Català, F., Dirks, R.P., Jong-Raadsen, S., Vrbatović, A., Hrabar, J., Pérez-Sánchez, J., & Sitjà-Bobadilla, A., 2019. Acting locally - affecting globally: RNA sequencing of gilthead sea bream with a mild *Sparicotyle chrysophrii* infection reveals effects on apoptosis, immune and hypoxia related genes. *BMC Genomics*, 20 (1), 200.
- Porat, D. & Chadwick-Furman, N.E., 2004. Effects of anemonefish on giant sea anemones: expansion behavior, growth, and survival. *Hydrobiologia*, 530 (1), 513–520.
- Poulin, R., 1992. Determinants of host-specificity in parasites of freshwater fishes. *International Journal for Parasitology*, 22 (6), 753–758.
- Poulin, R. & Cribb, T.H., 2002. Trematode life cycles: short is sweet? *Trends in Parasitology*, 18 (4), 176–183.
- Poulin, R. & Morand, S., 1999. Geographical distances and the similarity among parasite communities of conspecific host populations. *Parasitology*, 119 (Pt 4), 369–374.

- Poulin, R. & Morand, S., 2004. *Parasite Biodiversity*. Smithsonian.
- Pratte, Z.A., Besson, M., Hollman, R.D., & Stewart, F.J., 2018. The Gills of Reef Fish Support a Distinct Microbiome Influenced by Host-Specific Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (9), e00063-18.
- Pratte, Z.A., Patin, N.V., McWhirt, M.E., Caughman, A.M., Parris, D.J., & Stewart, F.J., 2018. Association with a sea anemone alters the skin microbiome of clownfish. *Coral Reefs*, 37 (4), 1119–1125.
- Price, P.W., 1980. Evolutionary biology of parasites. *Monographs in Population Biology*, 15, 1–237.
- Rach, J., Schreier, T., HOWE, G., & REDMAN, S., 1997. Effect of Species, Life Stage, and Water Temperature on the Toxicity of Hydrogen Peroxide to Fish. *The Progressive Fish-culturist*, 59, 41–46.
- Rahman, T., Suga, K., Kanai, K., & Sugihara, Y., 2015. Infection Kinetics of *Tenacibaculum maritimum* on the Abraded Skin of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology*, 50 (2), 44–52.
- Rajarajan, A., Wolinska, J., Walser, J.-C., Mäder, M., & Spaak, P., 2022. Infection by a eukaryotic gut parasite in wild *Daphnia* sp. associates with a distinct bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 98 (10), fiac097.
- Rausch, S., Midha, A., Kuhring, M., Affinass, N., Radonic, A., Kühl, A.A., Bleich, A., Renard, B.Y., & Hartmann, S., 2018. Parasitic Nematodes Exert Antimicrobial Activity and Benefit From Microbiota-Driven Support for Host Immune Regulation. *Frontiers in Immunology*, 9, 2282.
- Reed, P., Francis-Floyd, R., Klinger, R., & Petty, D., 2012. Monogenean Parasites of Fish: FA28/FA033, rev. 6/2012. *EDIS*, 2012.
- Remuzgo-Martínez, S., Lázaro-Díez, M., Padilla, D., Vega, B., El Aamri, F., Icardo, J.M., Acosta, F., & Ramos-Vivas, J., 2014. New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Pili, motility and adherence to solid surfaces. *Veterinary Microbiology*, 174 (1–2), 247–254.
- Repullés-Albelda, A., Kostadinova, A., Raga, J.A., & Montero, F.E., 2013. Seasonal population dynamics of *Zeuxapta seriola* (Monogenea: Heteraxinidae) parasitising *Seriola dumerili* (Carangidae) in the Western Mediterranean. *Veterinary Parasitology*, 193 (1–3), 163–171.
- Reverter, M., Sasal, P., Banaigs, B., Lecchini, D., Lecellier, G., & Tapissier-Bontemps, N., 2017b. Fish mucus metabolome reveals fish life-history traits. *Coral Reefs*, 36 (2), 463–475.
- Reverter, M., Sasal, P., Suzuki, M.T., Raviglione, D., Inguibert, N., Pare, A., Banaigs, B., Voisin, S.N., Bulet, P., & Tapissier-Bontemps, N., 2020. Insights into the Natural Defenses of a Coral Reef Fish Against Gill Ectoparasites: Integrated Metabolome and Microbiome Approach. *Metabolites*, 10 (6), 227.
- Reverter, M., Sasal, P., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., & Suzuki, M., 2017a. Characterisation of the gill mucosal bacterial communities of four butterflyfish species: a reservoir of bacterial diversity in coral reef ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*, 93 (6).

- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P., 2018. Biological and Ecological Roles of External Fish Mucus: A Review. *Fishes*, 3 (4), 41.
- Rohde, K., 1994. Niche restriction in parasites: proximate and ultimate causes. *Parasitology*, 109 (S1), S69–S84.
- Rohde, K., 2005. *Marine Parasitology*.
- Rosado, D., Pérez-Losada, M., Pereira, A., Severino, R., & Xavier, R., 2021. Effects of aging on the skin and gill microbiota of farmed seabass and seabream. *Animal Microbiome*, 3 (1), 10.
- Rosenbaum, M., Knight, R., & Leibel, R.L., 2015. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 26 (9), 493–501.
- Ruiz-Rodríguez, M., Scheifler, M., Sanchez-Brosseau, S., Magnanou, E., West, N., Suzuki, M., Duperron, S., & Desdevises, Y., 2020. Host Species and Body Site Explain the Variation in the Microbiota Associated to Wild Sympatric Mediterranean Teleost Fishes. *Microbial Ecology*, 80 (1), 212–222.
- Sadeghi, J., Chaganti, S.R., Johnson, T.B., & Heath, D.D., 2023. Host species and habitat shape fish-associated bacterial communities: phylosymbiosis between fish and their microbiome. *Microbiome*, 11 (1), 258.
- Salinas, I., 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*, 4 (3), 525–539.
- San FD, 1978. Microhabitat des Monogènes Dactylogyroidea parasites branchiaux de Téléostéens Mugilidae et Sparidae. *Thèse d'Etat: Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier*.
- Sanchez, L.M., Wong, W.R., Riener, R.M., Schulze, C.J., & Lington, R.G., 2012. Examining the Fish Microbiome: Vertebrate-Derived Bacteria as an Environmental Niche for the Discovery of Unique Marine Natural Products. *PLoS ONE*, 7 (5), e35398.
- Sasal, P., Trouvé, S., Müller-Graf, C., & Morand, S., 1999. Specificity and host predictability: a comparative analysis among monogenean parasites of fish. *Journal of Animal Ecology*, 68 (3), 437–444.
- Sato, Y., Matsunaga, R., Tasumi, S., Mizuno, N., Nakane, M., Hosoya, S., Yamamoto, A., Nakamura, O., Tsutsui, S., Shiozaki, K., & Kikuchi, K., 2023. I-fucoside localization in the gills of the genus Takifugu and its possible implication in the parasitism of Heterobothrium okamotoi (Monogenea: Diclidophoridae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1867 (12), 130467.
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A.R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., & Hayashi, T., 2013. Updating the Vibrio clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of Vibrio tritonus sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, 4, 414.
- Schauer, M., balagué, V., Pedrós-Alió, C., & Massana, R., 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in coastal oligotrophic system. *Aquatic Microbial Ecology* -

- AQUAT MICROB ECOL, 31, 163–174.
- Scheifler, M., Magnanou, E., Sanchez-Brosseau, S., & Desdevises, Y., 2022b. Host specificity of monogenean ectoparasites on fish skin and gills assessed by a metabarcoding approach. *International Journal for Parasitology*, 52 (8), 559–567.
- Scheifler, M., Magnanou, E., Sanchez-Brosseau, S., & Desdevises, Y., 2023. Host-microbiota-parasite interactions in two wild sparid fish species, *Diplodus annularis* and *Oblada melanura* (Teleostei, Sparidae) over a year: a pilot study. *BMC Microbiology*, 23 (1), 340.
- Scheifler, M., Ruiz-Rodríguez, M., Sanchez-Brosseau, S., Magnanou, E., Suzuki, M.T., West, N., Duperron, S., & Desdevises, Y., 2019. Characterization of ecto- and endoparasite communities of wild Mediterranean teleosts by a metabarcoding approach. *PLOS ONE*, 14 (9), e0221475.
- Scheifler, M., Sanchez-Brosseau, S., Magnanou, E., & Desdevises, Y., 2022a. Diversity and structure of sparids external microbiota (Teleostei) and its link with monogenean ectoparasites. *Animal Microbiome*, 4 (1), 27.
- Schmahl, G. & Taraschewski, H., 1987. Treatment of fish parasites. *Parasitology Research*, 73 (4), 341–351.
- Schmidt, V.T., Smith, K.F., Melvin, D.W., & Amaral-Zettler, L.A., 2015. Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation. *Molecular Ecology*, 24 (10), 2537–2550.
- Sepahi, A., Cordero, H., Goldfine, H., Esteban, M.Á., & Salinas, I., 2016. Symbiont-derived sphingolipids modulate mucosal homeostasis and B cells in teleost fish. *Scientific Reports*, 6 (1), 39054.
- Shao, S., Sun, X., Chen, Y., Zhan, B., & Zhu, X., 2019. Complement Evasion: An Effective Strategy That Parasites Utilize to Survive in the Host. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Sharp, N.J., Diggles, B.K., Poortenaar, C.W., & Willis, T.J., 2004. Efficacy of Aquil-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. *Aquaculture*, 236 (1), 67–83.
- Shephard, K.L., 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4 (4), 401–429.
- Shimada, M.T., Yunis Aguinaga, J., Cueva-Quiroz, V.A., Claudiano, G.S., Engrácia Filho, J.R., Mouriño, J.L.P., Ruas De Moraes, F., & Engrácia De Moraes, J.R., 2020. Isolation and characterization of pathology in case of massive mortality by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in *Rachycentron canadum*. *Bioscience Journal*, 36 (5).
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Bron, J.E., Paladini, G., Brooker, E.E., & Brooker, A.J., 2015. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology*, 142 (1), 196–270.
- Shirakashi, S., Asai, N., & Miura, M., 2021. Phototactic responses in four monogenean oncomiracidia. *Parasitology Research*, 120 (9), 3173–3180.
- Shoemaker, C., Xu, D.-H., Klesius, P.H., & Evans, J., 2008. Concurrent infections (parasitism and bacterial disease) in Tilapia. *Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Cairo, Egypt*, 1365–1375.

- Šimková, A., Sasal, P., Kadlec, D., & Gelnar, M., 2001. Water temperature influencing dactylogyrid species communities in roach, *Rutilus rutilus*, in the Czech Republic. *Journal of Helminthology*, 75 (4), 373–383.
- Sitjà-Bobadilla, A., De Felipe, M.C., & Alvarez-Pellitero, P., 2006. In vivo and in vitro treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261 (3), 856–864.
- Sjoblad, R.D., Chet, I., & Mitchell, R., 1978. Quantitative assay for algal chemotaxis. *Applied and Environmental Microbiology*, 36 (6), 847–850.
- Skilton, D.C., Saunders, R.J., & Hutson, K.S., 2020. Parasite attractants: Identifying trap baits for parasite management in aquaculture. *Aquaculture*, 516, 734557.
- Smith, C.J., Danilowicz, B.S., & Meijer, W.G., 2007. Characterization of the bacterial community associated with the surface and mucus layer of whiting (*Merlangius merlangus*). *FEMS microbiology ecology*, 62 (1), 90–97.
- Smith, S.E. & Read, D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd Edition. London: Academic Press.
- Speer, K.A., 2022. Microbiomes mediate host–parasite interactions. *Molecular Ecology*, 31 (7), 1925–1927.
- Staley, C., Unno, T., Gould, T.J., Jarvis, B., Phillips, J., Cotner, J.B., & Sadowsky, M.J., 2013. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *Journal of Applied Microbiology*, 115 (5), 1147–1158.
- Stevens, E.J., Bates, K.A., & King, K.C., 2021. Host microbiota can facilitate pathogen infection. *PLOS Pathogens*, 17 (5), e1009514.
- Stevens, J.L., Jackson, R.L., & Olson, J.B., 2016. Bacteria associated with lionfish (*Pterois volitans/miles* complex) exhibit antibacterial activity against known fish pathogens. *Marine Ecology Progress Series*, 558, 167–180.
- Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O’Connor, M.P., Rosen, G.L., Knight, R., Kilham, S.S., & Russell, J.A., 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology*, 21 (13), 3363–3378.
- Sylvain, F.-É., Cheaib, B., Llewellyn, M., Gabriel Correia, T., Barros Fagundes, D., Luis Val, A., & Derome, N., 2016. pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Scientific Reports*, 6 (1), 32032.
- Sylvain, F.-É., Holland, A., Bouslama, S., Audet-Gilbert, É., Lavoie, C., Val, A.L., & Derome, N., 2020. Fish Skin and Gut Microbiomes Show Contrasting Signatures of Host Species and Habitat. *Applied and Environmental Microbiology*, 86 (16), e00789-20.
- Székely, C., Haenen, O., & Molnár, K., 2021. *Anguillicoloides crassus*. In: *Fish parasites: A Handbook of Protocols for their Isolation, Culture and Transmission*.
- Takeuchi, M., Fujiwara-Nagata, E., Katayama, T., & Suetake, H., 2021. Skin bacteria of rainbow trout antagonistic to the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Scientific Reports*, 11 (1),

7518.

- Takeuchi, R., Jimbo, M., Tanimoto, F., Tanaka, C., Harii, S., Nakano, Y., Yasumoto, K., & Watabe, S., 2017. Establishment of a model for chemoattraction of Symbiodinium and characterization of chemotactic compounds in *Acropora tenuis*. *Fisheries Science*, 83 (3), 479–487.
- Theis, K.R., Venkataraman, A., Dycus, J.A., Koonter, K.D., Schmitt-Matzen, E.N., Wagner, A.P., Holekamp, K.E., & Schmidt, T.M., 2013. Symbiotic bacteria appear to mediate hyena social odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (49), 19832–19837.
- Thijs, S., Op De Beeck, M., Beckers, B., Truyens, S., Stevens, V., Van Hamme, J.D., Weyens, N., & Vangronsveld, J., 2017. Comparative Evaluation of Four Bacteria-Specific Primer Pairs for 16S rRNA Gene Surveys. *Frontiers in Microbiology*, 8, 494.
- Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35 (12), 1366–1375.
- Trujillo-González, A., Constantinoiu, C.C., Rowe, R., & Hutson, K.S., 2015. Tracking transparent monogenean parasites on fish from infection to maturity. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4 (3), 316–322.
- Tubbs, L.A., Poortenaar, C.W., Sewell, M.A., & Diggles, B.K., 2005. Effects of temperature on fecundity in vitro, egg hatching and reproductive development of *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae* (Monogenea) parasitic on yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *International Journal for Parasitology*, 35 (3), 315–327.
- Turgut, E., 2012. Influence of Temperature and Parasite Intensity on Egg Production and Hatching of the Monogenean *Dactylogyrus extensus*. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 64.
- Van Kessel, M.A.H.J., Mesman, R.J., Arshad, A., Metz, J.R., Spanings, F.A.T., Van Dalen, S.C.M., Van Niftrik, L., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., Jetten, M.S.M., Klaren, P.H.M., & Op Den Camp, H.J.M., 2016. Branchial nitrogen cycle symbionts can remove ammonia in fish gills. *Environmental Microbiology Reports*, 8 (5), 590–594.
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., & Wade, W.G., 2010. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS microbiology letters*, 309 (1), 1–7.
- Vaughan, D., Grutter, A., & Hutson, K., 2018. Cleaner shrimp remove parasite eggs on fish cages. *Aquaculture Environment Interactions*, 10, 429–436.
- Vaughan, D. & Hutson, K., 2021. *Cryptocaryon irritans*. In: *Fish parasites: A Handbook of Protocols for their Isolation, Culture and Transmission*. 17–28.
- Verhulst, N.O., Takken, W., Dicke, M., Schraa, G., & Smallegange, R.C., 2010. Chemical ecology of interactions between human skin microbiota and mosquitoes: Human skin microbiota and mosquito interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 74 (1), 1–9.
- Villar-Torres, M., Montero, F.E., Raga, J.A., & Repullés-Albelda, A., 2018. Come rain or come shine: environmental effects on the infective stages of *Sparicotyle chrysophrii*, a key pathogen in Mediterranean aquaculture. *Parasites & Vectors*, 11 (1), 558.

- Villar-Torres, M., Montero, F.E., Raga, J.A., & Repullés-Albelda, A., 2023. The influence of water temperature on the life-cycle of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae), a common parasite in gilthead seabream aquaculture. *Aquaculture*, 565, 739103.
- Wang, H., Tang, W., Zhang, R., & Ding, S., 2019. Analysis of enzyme activity, antibacterial activity, antiparasitic activity and physico-chemical stability of skin mucus derived from *Amphiprion clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 653–661.
- Whittington, I.D., 1987. A comparative study of the anatomy of the oncomiracidia of the hexabothriid monogeneans *Rajonchocotyle emarginata* and *Hexabothrium appendiculatum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67 (4), 757–772.
- Whittington, I.D., Chisholm, L.A., & Rohde, K., 1999. The Larvae of Monogenea (Platyhelminthes). In: *Advances in Parasitology*. Elsevier, 139–232.
- Whittington, I.D., Cribb, B.W., Hamwood, T.E., & Halliday, A., 2000. Host-specificity of monogenean (platyhelminth) parasites: a role for anterior adhesive areas? *International Journal for Parasitology*.
- Whittington, I.D. & Kearns, G.C., 1988. Rapid hatching of mechanically-disturbed eggs of the monogenean gill parasite *Diclidophora luscae*, with observations on sedimentation of egg bundles. *International Journal for Parasitology*, 18 (6), 847–852.
- Whittington, I.D. & Kearns, G.C., 2011. Hatching Strategies in Monogenean (Platyhelminth) Parasites that Facilitate Host Infection. *Integrative and Comparative Biology*, 51 (1), 91–99.
- Wilson, B., Danilowicz, B.S., & Meijer, W.G., 2008. The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua*. *Microbial Ecology*, 55 (3), 425–434.
- Woo, W.-S., Kang, G., Kim, K.-H., Son, H.-J., Sohn, M.-Y., Jung, J.-H., Choi, K.-M., Mun, S.H., & Park, C.-I., 2024. Effects of water temperature and light/dark cycles on in vitro egg laying and hatching of the monogenean *Microcotyle sebastis* on Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture*, 579, 740193.
- Xie, J., Vilchez, I., & Mateos, M., 2010. Spiroplasma bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS One*, 5 (8), e12149.
- Yamamoto, S., Fukushima, A., Ishimaru, K., & Shirakashi, S., 2014. Shading of net cage is an effective control measure against skin fluke *Neobenedenia girellae* infection in chub mackerel *Scomber japonicus*. *Fisheries Science*, 80, 1021–1026.
- Yoon, G.H., 1998. Host finding behavior of oncomiracidium of monogenean parasite *Entobdella hippoglossi* from the Atlantic halibut. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 1 (1), 63–67.
- Yoshinaga, T., 2002. Attachment-inducing capacities of fish skin epithelial extracts on oncomiracidia of *Benedenia seriola* (Monogenea: Capsalidae). *International Journal for Parasitology*, 32 (3), 381–384.
- Yoshinaga, T., Segawa, I., Kamaishi, T., & Sorimachi, M., 2000. Effects of Temperature, Salinity and Chlorine Treatment on Egg Hatching of the Monogenean *Neoheterobothrium hirame* Infecting

- Japanese Flounder. *Fish Pathology*, 35, 85–88.
- Zamzow, J.P., 2007. Ultraviolet-absorbing compounds in the mucus of shallow-dwelling tropical reef fishes correlate with environmental water clarity. *Marine Ecology Progress Series*, 343, 263–271.
- Zhang, C., Li, D., Chi, C., Ling, F., & Wang, G., 2015. Dactylogyrus intermedius parasitism enhances Flavobacterium columnare invasion and alters immune-related gene expression in Carassius auratus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 116 (1), 11–21.
- Zhang, X., Ding, L., Yu, Y., Kong, W., Yin, Y., Huang, Z., Zhang, X., & Xu, Z., 2018. The Change of Teleost Skin Commensal Microbiota Is Associated With Skin Mucosal Transcriptomic Responses During Parasitic Infection by Ichthyophthirius multifiliis. *Frontiers in Immunology*, 9, 2972.
- Zhang, X.-P., Shang, B.-D., Wang, G.-T., Li, W.-X., Yang, X., & Li, Z.-Y., 2015. The effects of temperature on egg laying, egg hatching and larval development of Dactylogyrus vastator. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 39 (6), 1177–1183.
- Zhang, Y., Feng, X., Tian, G., & Jia, C., 2022. Rheological Properties and Drag Reduction Performance of Puffer Epidermal Mucus. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8.
- Zhou, S., Xia, L., Dong, J., Liu, Y., Yang, Q., Xu, N., Yang, Y., & Ai, X., 2023. Anthelmintic efficacy of febantel against a monogenean parasite, Gyrodactylus kobayashii. *Veterinary Parasitology*, 324, 110058.

Résumé : Alors que les poissons téléostéens représentent les deux tiers des vertébrés marins, l'interaction entre leur microbiote externe et leur environnement reste peu étudié, en particulier chez les populations sauvages. Ainsi, le lien entre le microbiote et les ectoparasites n'est pas bien compris. Le microbiote peut agir comme une barrière protectrice contre les pathogènes et/ou être impliqué dans la reconnaissance de l'hôte par les parasites. Les associations hôte-parasite devraient désormais être considérées comme des interactions tripartites où le microbiote façonne le phénotype de l'hôte et sa relation avec les parasites. Ces interactions ont déjà été décrites chez certaines espèces de téléostéens qui peuvent être parasitées par des monogènes (Plathelminthes) qui sont des ectoparasites à cycle de vie direct que l'on trouve couramment sur leur peau et leurs branchies. Leurs larves nagent activement, s'orientent et repèrent leur hôte grâce à des stimuli chimiques. Les communautés bactériennes sont soupçonnées de contribuer à la production de ces signaux et pourraient donc jouer un rôle important dans les mécanismes de spécificité parasitaire.

L'objectif de cette thèse était d'explorer les mécanismes qui sous-tendent la spécificité des monogènes pour leur(s) hôte(s) en caractérisant le microbiote, la composition chimique du mucus externe des téléostéens (peau et branchies), et en développant des approches expérimentales pour mieux caractériser le rôle des stades précoces des *Lamellodiscus* dans cette spécificité. Nous nous sommes concentrés sur l'association entre les Sparidae, une famille de poissons retrouvée en Méditerranée, et les monogènes du genre *Lamellodiscus* qui présentent des profils de spécificité variés pour leurs hôtes.

Au cours de cette thèse, nous avons tout d'abord (i) étudié l'évolution des communautés bactériennes du mucus externe de deux espèces sauvages de sparidés présentant des charges parasitaires en *Lamellodiscus* contrastées. Nous avons ensuite (ii) caractérisé les communautés bactériennes et la composition chimique du mucus externe de quatre espèces de sparidés sauvages et étudié l'influence de différents facteurs sur leur variabilité (environnementaux ou propres à l'hôte). Nous nous sommes ensuite concentrés sur une espèce qui n'est jamais parasitée par les monogènes du genre *Lamellodiscus*. Nous avons exploré si cette espèce se distinguait des trois autres par une signature bactérienne et chimique particulière qui pourrait expliquer sa protection vis à vis des *Lamellodiscus*. Enfin, l'objectif de la dernière partie (iii) était de développer des approches expérimentales pour comprendre quels facteurs sont susceptibles de favoriser l'établissement et le maintien des différents stades de vie du parasite sur son hôte. Un système non-invasif de collecte d'œufs de *Lamellodiscus* a d'abord été développé. À partir de là, nous avons pu établir des conditions optimales de maintien *in vitro* d'œuf de *Lamellodiscus* pour favoriser leur éclosion. Nous avons, alors, réalisé une première caractérisation morphologique des stades de vie précoces d'une espèce de *Lamellodiscus* à l'aide de microscopie optique et électronique à balayage. En parallèle, nous avons développé une méthode pour, à terme, étudier le comportement et la préférence larvaire pour des mucus de différentes espèces de sparidés.

Mots clés (6) : Sparidae, Mucus externe, Microbiote, Ectoparasite, Metabarcoding, Metabolomique

Abstract: While teleost fishes represent two-third of all marine vertebrates, the interaction between their external microbiota and their environment remains poorly studied, especially for wild populations. Hence, the role of their microbiota in relationship with ectoparasites is largely unknown. Microbiota can act as a protective barrier against pathogens, and/or be involved in host recognition by parasites, and host-parasite associations should be considered as a tripartite interplay where the microbiota shapes the host phenotype and its relation to parasites. These interactions have already been described in some teleost species that can be parasitized by Monogeneans (Platyhelminthes) which are direct life cycle ectoparasites commonly found on their skin and gills. Their larvae actively swim towards their host based on chemical stimuli. Bacterial communities are suspected to contribute to these cues and could play a significant role in host-parasite specificity mechanisms.

The objective of this thesis was to explore the mechanisms involved in the specificity of monogenean for their host(s) through the characterization of wild teleost external mucus (skin and gills) microbiota and metabolite production and the development of experimental approaches to better characterize the role of early life stages of *Lamellodiscus* in host specificity. We used as biological model a well-known association formed by Sparidae, a fish family found in Mediterranean Sea, and *Lamellodiscus* monogeneans, a species-rich genus that exhibits various patterns of host specificity.

During this thesis, we first (i) studied the evolution of bacterial communities in the external mucus of two wild sparid species with contrasting *Lamellodiscus* monogeneans parasitic loads. We have then (ii) characterized the bacterial communities and chemical composition of the external mucus of four wild sparid species and studied the influence of different environmental or host-specific factors on their variability. One of these species, never parasitized by the *Lamellodiscus* monogeneans, was especially studied to determine whether it has a distinct bacterial and chemical signature that could explain its protection against *Lamellodiscus*. The objective of the last part (iii) was to develop experimental approaches to investigate the factors that promote the establishment and maintenance of different life stages of monogeneans on their host. A non-invasive system was developed for collecting *Lamellodiscus* eggs in aquariums. From there, we cultured larvae *in vitro* by establishing optimal conditions to maintain *Lamellodiscus* eggs and induce their hatching. We conducted an initial morphological characterization of the early stages of a *Lamellodiscus* species using light and scanning electron microscopy. We have, in parallel, developed a method to ultimately study *in vitro* oncomiracidia behavior and preference for mucus from different sparid species.

Key words (6): Sparidae, External mucus, Microbiota, Ectoparasite, Metabarcoding, Metabolomic