



HAL
open science

**Étude de la dynamique de populations d'oursins
comestibles *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en
zone pêchée et anthropisée.: Évaluation de l'efficacité et
de l'impact d'opérations de lâchers de juvéniles pour le
repeuplement.**

Sylvain Couvray

► **To cite this version:**

Sylvain Couvray. Étude de la dynamique de populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en zone pêchée et anthropisée.: Évaluation de l'efficacité et de l'impact d'opérations de lâchers de juvéniles pour le repeuplement.. Biologie animale. Université de Toulon, 2014. Français. NNT : 2014TOUL0022 . tel-01360424

HAL Id: tel-01360424

<https://theses.hal.science/tel-01360424>

Submitted on 5 Sep 2016

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.

Ecole Doctorale Mer et Sciences (ED 548)

Laboratoire PROcessus de Transferts et d'Échanges
dans l'Environnement (E.A. 3819)

Equipe de Biologie Moléculaire Marine

Institut Océanographique Paul Ricard

THÈSE présentée par :

Sylvain COUVRAY

soutenue le : 11 Décembre 2014

pour obtenir le grade de Docteur en Biologie

Spécialité : Biologie marine

**Étude de la dynamique de populations d'oursins
comestibles *Paracentrotus lividus* (Lamarck,
1816) en zone pêchée et anthropisée. Évaluation
de l'efficacité et de l'impact d'opérations de
lâchers de juvéniles pour le repeuplement.**

JURY :

Pr. FRANCOUR Patrice

Rapporteur - Université Nice-Sophia Antipolis

Dr. AURELLE Didier

Rapporteur - Université Aix-Marseille

Pr. VICENTE Nardo

Examineur - Université Aix-Marseille.

Dr. BONNEFONT Jean-Luc

Examineur - Institut Océanographique Paul Ricard

Pr. GRILLASCA Joël-Paul

Directeur de thèse - Université de Toulon

Dr. MARTIN Yvan

Directeur de thèse - Institut Océanographique Paul Ricard

Dr. COUPE Stéphane

Co-encadrant - Université de Toulon

Je dédie cette thèse à mes parents, à Agnès, à pépé et mémé, et à toute ma famille pour m'avoir toujours encouragé à poursuivre mes études dans la voie qui me plaisait, ce qui m'a permis de faire de ma passion mon métier.

Remerciements

Je remercie Messieurs Patrice Francour et Didier Aurelle pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Merci Yvan Martin pour m'avoir accompagné depuis la fin de mon cycle de Master, de m'avoir offert une première expérience professionnelle puis de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse.

Je remercie Jean-Luc Bonnefont de me supporter au quotidien, pour sa bienveillance, son soutien et sa bonne humeur.

Merci Nardo Vicente pour m'avoir encouragé, suivi mon travail tout au long de ces années et d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

Un grand merci à Patricia Ricard de me permettre de réaliser ce beau métier dans ce magnifique cadre de travail, ainsi que de me permettre d'évoluer et de m'épanouir au sein de l'Institut.

Je remercie tous les membres de l'équipe de l'Institut pour votre soutien et votre aide précieuse au quotidien. Vous m'avez permis de passer du monde étudiant au monde professionnel, puis d'évoluer et de continuer ma formation, tant professionnelle que dans mon épanouissement personnel. Merci à Thomas, Damien, Robert, Sergio, Nathalie, Patrick, Fabienne, Philippe, Tchoupi, Tiphaine et tous les autres... Merci aussi aux stagiaires de l'IOPR et de l'EB2M avec lesquels j'ai passé de bons moments.

Merci Daniel Rebillard pour nous accompagner et de veiller à chaque plongée ainsi que pour ta participation dans les diverses études.

Merci Joël Grillasca pour m'avoir accueilli au sein de la chaleureuse équipe EB2M et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse.

Un grand merci à Stéphane Coupé qui m'a encadré, encouragé, soutenu (pris le relai quand y en avait besoin) et travaillé à mes côtés tout au long de cette étude. Et ce n'est pas fini !

Cette thèse m'a permis de rencontrer et collaborer avec l'équipe EB2M ; merci à vous tous (Rémy, Nathalie, Simone, Sandrine, Stéphanie, Marine, Laura, Sylvain, Sonia) pour votre accueil et votre aide tout au long de ses années. Ne croyez pas que vous allez vous débarrasser de moi après la soutenance, on a encore des projets en commun !

Je remercie tous mes amis pour leur soutiens tout au long de cette thèse, même ceux qui croient toujours que j'ai passé ces dernières années à compter des oursins et boire du Ricard ; et même ceux qui pensent encore que ma thèse consiste à démontrer que les oursins sont des ours avec des seins.

Merci Cécile de m'avoir toujours soutenu et d'avoir été présente même dans les moments difficiles.

Et je remercie tous ceux que je n'ai pas cités et qui m'ont accompagné ou aidé dans cette aventure.

Table des matières

Résumé.....	15
Abstract	17
CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	19
CHAPITRE 1. L'OURSIN COMESTIBLE DE MEDITERRANEE : <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i> . GENERALITES SUR L'ESPECE ET LA RESSOURCE	21
I. Présentation de l'espèce	21
1. Généralités	21
2. Cycle de vie	22
3. Rôle écologique	24
II. Structuration des populations.....	25
1. Notion de population	25
2. Hétérogénéité environnementale, métapopulation et connectivité.....	27
3. Structuration génétique des populations à l'échelle de l'aire de répartition et locale : l'apport de la génétique des populations	30
III. Dynamique des populations.....	32
1. Généralité	32
2. Vie pélagique	34
3. Vie benthique	35
4. Facteurs biotiques et abiotiques influençant les populations d'adultes.....	36
IV. La ressource oursinière	42
1. Contexte économique	42
2. États des lieux des stocks naturels mondiaux	43
3. Gestion de la ressource	45
4. Bilan	50
V. Le réensemencement.....	51
1. Historique	51
2. Objectifs et prérequis pour le développement d'opérations de lâchers de juvéniles	52
3. Risques et préconisations.....	53
CHAPITRE 2. CARACTERISATION DE L'ETAT ET DE L'EVOLUTION DES STOCKS D'OURSINS DE L'AIRE TOULONNAISE	55
I. Introduction.....	56
1. Etats des lieux des stocks naturels français.....	56

2. Effet de la pêche sur les populations de <i>P. lividus</i>	57
3. Mesure de gestion et réglementation actuelle.....	57
4. Caractérisation des populations d'oursins comestibles <i>P. lividus</i> de l'agglomération de Toulon et mise en place d'un suivi des stocks à long terme.	58
III. Matériels et méthodes	60
1. Zone et sites d'étude	60
2. Recensement des populations de <i>Paracentrotus lividus</i>	70
3. Traitement des données.....	73
IV. Résultats.....	75
1. État des peuplements de <i>P. lividus</i> de l'aire toulonnaise.....	75
2. Structuration spatiale des peuplements	79
3. Fluctuation temporelle des peuplements de <i>P. lividus</i>	81
4. Interaction entre <i>Arbacia lixula</i> et <i>Paracentrotus lividus</i>	82
V. Discussion.....	82
CHAPITRE 3. AQUACULTURE ET PRODUCTION DE JUVENILES	89
I. Introduction.....	90
1. L'échiniculture	90
II. L'écloserie expérimentale	92
III. Production de juvéniles de <i>P. lividus</i>	95
1. Obtention de géniteurs, récolte des gamètes et fécondation	96
2. Les bacs d'élevage et renouvellement d'eau	97
3. Température et photopériode	98
4. Densités d'élevage.....	99
5. Suivi des paramètres de développement larvaire.....	99
6. Alimentation	99
7. La métamorphose larvaire	100
IV. Transfert dans le milieu naturel	102
V. Discussion.....	103
1. Elevage larvaire	103
2. Grossissement	104
VI. Conclusion	105
CHAPITRE 4. EVALUATION DE LA REUSSITE ET DE L'IMPACT DE L'ENSEMENCEMENT DE JUVENILES D'OURSINS A ECHELLE PILOTE.....	107
I. Introduction.....	108
II. Matériel et méthode	109

1. Sites de réensemencement	109
2. Caractérisation des densités d'oursins et des peuplements algaux.	110
3. Échantillonnage	111
4. Extraction d'ADN et génotypage	111
5. Création de la base de données	112
6. Analyses statistiques	113
III. Résultats	114
1. Présentation du jeu de données génétiques.....	114
Réussite et impact des opérations de lâchers.....	119
Discussion	120
DISCUSSION GENERALE	123
Etat de la ressource dans l'aire toulonnaise et effet de la pêche.	123
Aquaculture et lâchers expérimentaux de juvéniles d'oursins à l'échelle pilote.....	128
Proposition de méthodes de gestion de la ressource	130
Analyses génétiques.....	132
PERSPECTIVES.....	134
Distribution de diversité génétique à l'échelle régionale. Connectivité.	134
Suivi de la dynamique des populations.....	135
Amélioration des mesures de gestions	137
Aquaculture	137
REFERENCES	138
ANNEXES.....	151
Articles.....	151
Autres contributions à la production scientifique de l'IOPR et du laboratoire PROTEE	195
Rapports scientifiques	199
Colloques	201

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des Echinodermata.	21
Figure 2 : L'oursin comestible <i>Paracentrotus lividus</i> (Photo : © P. Lelong).	22
Figure 3 : Chronologie du cycle de vie de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i> (© T. Miard et S. Couvray)...	23
Figure 4 : impact des oursins sur les communautés algales. a et b : algues dressées et diversifiées sur site à faibles densités d'oursins. c et d : algues gazonnantes et roches à nues sur site à fortes densités d'oursins (Photo : © P. Lelong et S. Couvray).	25
Figure 5 : Répartition hétérogène des biocénoses marine le long du littoral, exemple du pourtour de l'île des Embiez (source : Institut Océanographique Paul Ricard, 2008).....	28
Figure 6 : Différents modes d'organisation de métapopulations (D'après Harrison et Taylor 1997 et Stith et al. 1996)	29
Figure 7 : Modèles source-puits des métapopulations.....	30
Figure 8 : Relation entre la durée de phase larvaire et la dispersion moyenne estimée sur la base des distances génétiques pour 32 espèces (d'après Siegel et al. 2003)	31
Figure 9 : Influence des processus impactant la survie des individus au cours des différentes phases de vie des organismes benthopélagiques (d'après Pineda 2000).....	32
Figure 10 : Distance de dispersion des organismes benthopélagique au cours des différentes phases de vie (d'après Pineda et al. 2007).	33
Figure 11 : Schéma d'un effet cascade impliquant des poissons prédateurs avec un contrôle direct négatif par prédation (p-), les oursins herbivores avec un effet direct négatif par broutage (b-), contrôlant les communautés algales à la base du réseau trophique. Les prédateurs ont une conséquence indirecte positive (+) sur les communautés algales. (D'après Menge 1995 ; Pinnegar et al. 2000).	37
Figure 12 : évolution du taux de croissance et de la taille d'une population soumise à l'effet Allee...	40
Figure 13 : Evolution des débarquements en oursins des principales pêcheries mondiales entre 1950 et 2008. a : débarquement des 4 plus grands pays producteurs (Chili, U.S.A., Japon et Canada) et total mondial des débarquements ; b : débarquement des autres principaux pays producteurs (Russie Corée du Sud, Mexique et Pérou). Remarque : l'axe des abscisses n'est pas à la même échelle entre les 2 graphiques (Données FAO, 2012).	44

Figure 14 : Evolution des débarquements déclarés de <i>P. lividus</i> sur les côtes françaises atlantiques et méditerranéennes.....	56
Figure 15 : Sites d'études pour l'ensemencement de juvéniles et le suivi des densités de <i>Paracentrotus lividus</i> (© D. Kirchhofer).....	61
Figure 16 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de Rayolet.....	62
Figure 17 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site du Petit Rousseau.....	63
Figure 18 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site du Rix.....	64
Figure 19 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de la Bomasse.....	65
Figure 20 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de la Sicié.....	66
Figure 21 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de la Coudoulière.....	67
Figure 22 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site des Oursinière.....	68
Figure 23 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site des Baux Rouge.....	69
Figure 24 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de Podestat.....	70
Figure 25 : Mise en place des balises (petites bornes de géomètre "Feno") utilisées pour matérialiser les transects permanents. D'après www.bornes-feno.com (photo : © D. Rebillard).....	71
Figure 26 : Schéma de la méthodologie utilisée pour le comptage d'oursins <i>Paracentrotus lividus</i> le long d'un transect permanent (© E. Rouanet).....	72
Figure 27 : Schéma de l'arborescence adoptée pour le comptage d'oursins <i>Paracentrotus lividus</i> . Exemple du site de la Coudoulière.....	72
Figure 28 : Nature du substrat (pourcentage de recouvrement) sur chaque transect des neuf sites échantillonnés.....	73
Figure 29 : Densités moyennes des petits (< 4 cm) et gros (> 4 cm) individus sur chaque transect de chaque site de l'aire toulonnaise pour la période 2011 à 2013.....	75
Figure 30 : Évolution des densités moyennes des petits (<4 cm) et gros (>4 cm) individus de l'ensemble des sites de l'aire toulonnaise entre le printemps 2011 et l'automne 2013. A : en incluant le site Sicié ; B : sans le site Sicié.....	76

Figure 31 : Évolution des densités moyennes des petits (<4 cm) et gros (>4 cm) et de la densité moyenne totale des individus de chaque site. Pour des raisons de facilité de lecture, les densités présentées pour le graphique de Podestat et Sicié ne sont pas à la même échelle que celle des autres graphiques.....	78
Figure 32 : Test post-hoc de Dunn de comparaison des sites basé sur les densités de <i>P. lividus</i> sur les transects préférentiels.	81
Figure 33 : densités moyennes (pour la période 2011 à 2013) de <i>Paracentrotus lividus</i> et d' <i>Arbacia lixula</i>	82
Figure 34 : Faciès à surpâturage provoqué par de fortes densités de <i>P. lividus</i> (Site Sicié) laissant les roches à nues ou recouvertes d'algues gazonnantes (photo : © S. Couvray).....	86
Figure 35 : Localisation de l'écloserie expérimentale de l'IOPR.....	92
Figure 36 : Schéma de l'organisation interne de l'écloserie expérimentale de L'IOPR (© P. Aublanc, 2012).....	93
Figure 37 : Système de traitement de l'eau de mer avant distribution dans l'écloserie et hall aquacole (© P. Aublanc).	94
Figure 38 : système de filtration et de distribution de l'eau de mer dans les salles d'élevage (© P. Aublanc).....	95
Figure 39 : Récupération des produits génitaux nécessaires avant fécondation.	97
Figure 40 : Conditionnement des larves dans des bacs cylindro-coniques de 80L (© D.Kirchhofer, 2013).....	98
Figure 41 : Salles de production de micro- algues de l'IOPR. (©M. Delville, 2009).....	100
Figure 42 : Evolution des différents stades larvaires, 4, 6 et 8 bras avant métamorphose (© A. Hanz, 2013).....	101
Figure 43 : Larve compétente à gauche et oursins métamorphosés (©T. Miard, 2012).....	102
Figure 44 : Opération de lâcher de juvéniles d'oursin. (© IOPR et D. Rebillard).	103
Figure 45 : Sites d'étude de génétique des populations avec et sans opérations de lâchers.	110
Figure 46 : Exemple de génotype parental après analyse sur séquenceur capillaire.	114
Figure 47 : Fréquences alléliques et fréquence des échecs d'amplification pour chacun des loci microsatellites (PI_28, PI_B, PI_C, PI_Hist , PI_T, PI_L) calculées à partir du génotypage de 631 individus.	116
Figure 48 : Localisation géographique des principaux sites ayant fait l'objet de suivis de densités d'oursins <i>Paracentrotus lividus</i>	125
Figure 49 : Evolution des densités moyennes d'oursins (ind./m ²) dénombrés selon deux classes de tailles (gros > 40 mm, petits < 40 mm) sur les 5 sites du secteur maritime de Martigues (d'après Bachet et al., 2014).....	126

Figure 50 : Évolution temporelle de la densité moyenne (Ind./10m² ± e.s.) de *Paracentrotus lividus* à trois profondeurs, autour de l'île de Port-Cros (d'après Hereu et al., 2005)..... 126

Figure 51 : Evolution des densités de *Paracentrotus lividus* à l'intérieur de la réserve des îles Mèdes (Espagne, Nord-Ouest Méditerranée) (symboles noir) et à l'extérieur de la réserve (symboles blanc), sur substrat rocheux (d'après Hereu et al., 2012)..... 127

Tableaux

Tableau 1 : Interprétation de la différenciation génétique entre population en fonction des valeurs de F_{ST}	27
Tableau 2 : Localisation et caractérisation des neuf sites et des transects échantillonnés.	71
Tableau 3 : PERMANOVA basée sur la dissimilarité de Bray-Curtis pour les données de densités de <i>P. lividus</i>	79
Tableau 4 : Corrélations des rangs de Spearman pour les deux espèces d'oursins, la profondeur et les différents types d'habitats.	80
Tableau 5 : Amorces microsatellites utilisées en PCR multiplex.....	112
Tableau 6 : Nombre d'individus utilisés pour l'analyse statistique de génétique des populations pour les huit stations et deux années (2011 et 2012) étudiées.	113
Tableau 7 : Amorces microsatellites utilisé en PCR multiplex.	116
Tableau 8 : Diversité génétique des peuplements d'oursins des sites de lâchers et de la population générale de la zone d'étude.	117
Tableau 9 : Comparaison de la structuration génétique entre échantillons de 2011 et 2012 pour chaque site de lâchers et sites sans lâchers.	118
Tableau 10 : Assignation parentale entre les échantillons des sites de lâchers et les géniteurs.	119
Tableau 11 : Comparaison de la structure génétique entre la population générale de 2011 (Pop2011Nat), de 2012 sans individus issus de lâchers (Pop2012Nat) et de 2012 avec des individus issus de lâchers (Pop 2012Tot).....	119

Résumé

L'érosion des stocks naturels de *Paracentrotus lividus*, oursins comestibles de Méditerranée, malgré les mesures actuelles réglementant les captures, soulève des inquiétudes sur la pérennité de son exploitation et sur l'équilibre des écosystèmes. En 2009, à la demande des pêcheurs professionnels, des gestionnaires de la ressource et de la communauté d'agglomération Toulon Provence Méditerranée (TPM), l'Institut Océanographique Paul Ricard et l'Équipe de Biologie Moléculaire Marine du laboratoire PROTEE (Université de Toulon), ont engagé un travail de recherche visant à mieux comprendre l'influence des processus naturels et anthropiques qui façonnent les populations naturelles, dans le but d'améliorer les stratégies de soutien aux populations, notamment par le réensemencement de juvéniles d'oursins.

L'objectif du travail de thèse a été de (i) caractériser l'état des stocks sauvages de l'aire toulonnaise et de leurs dynamiques par la mise en place du suivi démographique bisannuel à long terme de huit stations références, (ii) de développer les méthodes de production de juvéniles en éclosérie et (iii) d'évaluer l'efficacité du repeuplement et son impact sur les populations naturelles. Compte-tenu du cycle de vie benthopélagique de *P. lividus*, nous avons inscrit cette problématique dans une échelle régionale.

Les résultats obtenus permettent de dresser un premier état des lieux de la structuration et des fluctuations d'abondances des peuplements de *P. lividus* sur l'aire toulonnaise et démontrent la fragilité des stocks naturels vis à vis des captures. La maîtrise complète du cycle de vie en aquaculture a été obtenue, notamment en optimisant les conditions d'élevage au stade critique de la métamorphose. Enfin, les repeuplements expérimentaux, réalisés à l'échelle pilote, ont présenté un succès variable selon les sites mais potentiellement important, sans aucun effet sur la structuration et la diversité génétique des stocks naturels. Le travail engagé et les premiers résultats sont discutés dans le contexte de la conservation et de l'exploitation durable de cette ressource naturelle. Ils constituent en outre un préalable indispensable aux réflexions sur l'ajustement ou la mise en place de nouvelles actions de gestion des populations et de la ressource.

Abstract

Despite current measures regulating captures, the erosion of natural stocks of the edible *Paracentrotus lividus* sea urchin of Mediterranean Sea, raises concerns about the sustainability of its exploitation and the stability of the associated ecosystem. In 2009, upon request of professional fishermen, resource managers and the urban district of Toulon Provence Méditerranée, we have initiated a program of research to better understand the influence of natural and anthropogenic processes that shape natural populations.

The objectives of the thesis were (1) to monitor the demographic evolution of *P. lividus* communities on eight sites of the Toulon area between 2011 and 2013 before and after the legal harvesting period, (2) to develop a reliable method of production of *P. lividus* juveniles in hatchery and (3) to evaluate the effectiveness of restocking at a pilot scale and assess its potential impact over natural populations. Given the long larval phase in the benthic-pelagic cycle of this species, we monitored the genetic diversity of *P. lividus* populations at a regional scale.

The data and results acquired during this work first provide an initial evaluation of the structure, abundance and fluctuation of followed *P. lividus* populations along the Toulon coast and demonstrate the vulnerability of natural stocks towards harvesting. In addition, complete control over the whole life cycle in batch was achieved through optimization of cultural and food parameters, especially at the critical stage of settlement and metamorphosis. Finally, experimental restocking trials demonstrated varying success depending on the site, but potentially significant, without apparent effect on the genetic diversity of wild stocks. Results obtained in this thesis are discussed in the context of conservation and sustainable exploitation of this natural resource. They are also a prerequisite to discussion on the adjustment or implementation of new management guidelines.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

La pêche aux oursins sur les côtes méditerranéennes françaises n'a rien de comparable avec les grandes pêcheries des principaux pays producteurs. Toutefois, cette ressource revêt un intérêt à la fois économique et culturel. Le constat des pêcheurs professionnels porte depuis une dizaine d'années sur la raréfaction de la ressource oursinière en France, notamment dans le Var et les Bouches du Rhône, principaux départements concernés par la pêche aux oursins. Les mesures actuelles de gestion ne semblent pas suffisantes face à la raréfaction de la ressource. L'inquiétude des pêcheurs et des gestionnaires a conduit à de la présente étude. La voie du réapprovisionnement des stocks par des opérations de lâchers de juvéniles provenant d'écloserie a été suggérée par l'Institut Océanographique Paul Ricard à la suite de concertations avec L'équipe EB2M du laboratoire PROTEE (Université de Toulon), les pêcheurs professionnels (prud'homies) et les gestionnaires (les affaires maritimes, TPM et le Conseil Général du Var). Cette démarche a eu lieu après les premiers essais engagés dans la baie de La Ciotat, dans les Bouches du Rhône en 2006, sous l'égide de la prud'homie de la Ciotat et l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse.

Ce travail de thèse s'intègre dans un programme d'études scientifiques initié en 2009. Cette étude a pour but d'évaluer l'état des stocks d'oursins ainsi que la faisabilité, l'efficacité et les conséquences d'opérations de réensemencement de juvéniles de *Paracentrotus lividus*.

Les objectifs se déclinent en plusieurs volets :

- réaliser un état « zéro » des abondances et de la structuration des communautés d'oursins et de l'état des peuplements algaux sur les sites de lâchers et des sites témoins ;
- mettre en place des outils méthodologiques pour le suivi démographique des stocks d'oursins ;
- étudier la diversité et la différenciation génétique des populations de *P. lividus* ;
- mettre au point un protocole fiable de production en écloserie de juvéniles destinés aux lâchers ;
- déterminer des modalités optimales de lâchers et réaliser des opérations de lâchers ;

- évaluer de la survie des individus lâchés via un test de parentalité et évaluer leurs conséquences sur les abondances et la diversité génétique des populations sauvages.

Le présent manuscrit fait état des travaux réalisés au cours de ce travail de thèse scindé en trois chapitres portant sur :

Chapitre 1 : Généralités sur l'espèce *Paracentrotus lividus* et la ressource.

Chapitre 2 : Initiation d'un suivi démographique des stocks d'oursins dans l'aire toulonnaise. Etude de la structuration des populations en zone pêchées et anthropisées.

Chapitre 3 : Création d'une écloserie expérimentale comme outil polyvalent pour le développement de techniques aquacoles et d'expérimentations sur des organismes marins méditerranéens. La mise au point d'un protocole de production de juvéniles d'oursins pour les opérations de réensemencement. Mise au point de modalités pour les lâchers de juvéniles d'oursins provenant de l'écloserie.

Chapitre 4 : Développement d'outils de biologie moléculaires performantes à la fois pour l'étude de la génétique des populations d'oursins *Paracentrotus lividus* et l'assignation parentale pour cette espèce ; l'étude de la différenciation génétique des populations locales ainsi que l'évaluation de l'efficacité et de l'impact des lâchers de juvéniles d'oursins pour le réensemencement.

Les résultats sont discutés dans un contexte de gestion durable de la ressource oursinière et de la conservation de l'espèce et de l'écosystème associé.

Ce programme s'inscrit dans le cadre du Contrat de Baie n°1 de la rade Toulon. Les résultats de ce programme font l'objet de plusieurs publications scientifiques, présentations orales lors de congrès scientifiques ainsi que de rapports scientifiques (présentés en Annexe).

CHAPITRE 1. L'OURSIN COMESTIBLE DE MEDITERRANEE : *PARACENTROTUS LIVIDUS*. GENERALITES SUR L'ESPECE ET LA RESSOURCE

I. Présentation de l'espèce

1. Généralités

Les oursins appartiennent au phylum des Echinodermes qui comprend cinq classes : les Crinoidea, les Asteroidea, les Holothuroidea, les Echinoidea (dont les oursins font partie) et les Ophiuroidea (figure 1). Il en existe environ 1000 espèces réparties dans tous les océans et sous toutes les latitudes, de l'Arctique à l'Antarctique, et qui colonisent divers substrats entre la surface et plus de 6000 mètres de profondeur (Yokota 2002b).

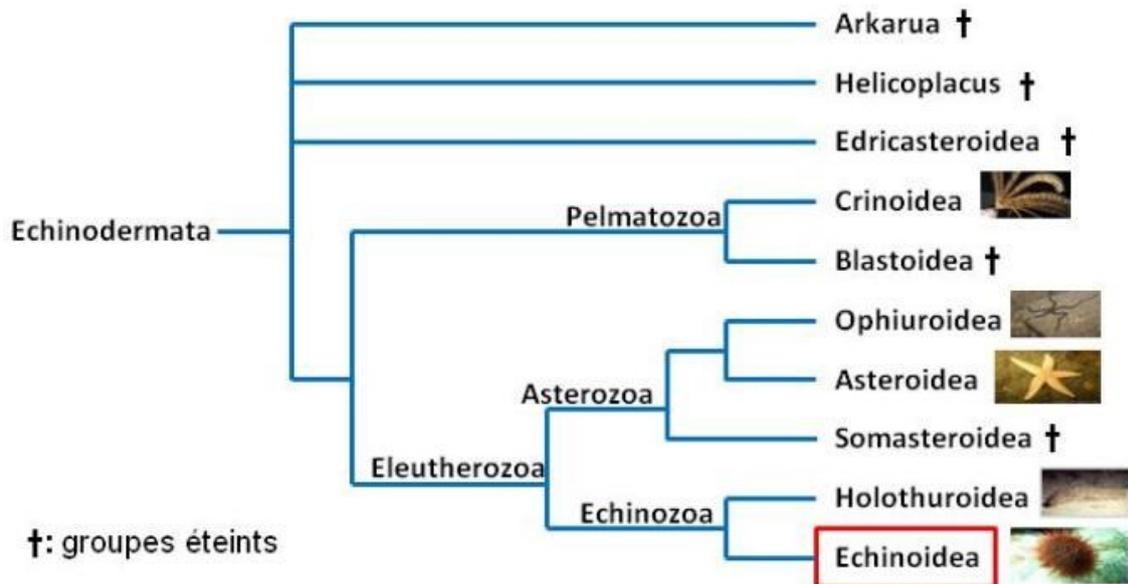


Figure 1 : Arbre phylogénétique des Echinodermata.

L'espèce *Paracentrotus lividus* est une des plus représentée sur le littoral méditerranéen (figure 2). Son aire de répartition s'étend de l'Ecosse jusqu'au sud du Maroc (Boudouresque & Verlaque 2007). Cette espèce vit dans des biotopes très hétérogènes comme les fonds rocheux, les herbiers de posidonies et parfois sur fonds sableux, mais toujours préférentiellement dans des faibles profondeurs où l'on trouve le maximum d'algues qui constituent sa principale nourriture. Cette espèce présente une forte plasticité phénotypique lui permettant de s'adapter à une large gamme de conditions

environnementales comme la température, l'hydrodynamisme, la qualité environnementale ainsi que la qualité et la quantité de nourriture disponible. *P. lividus* peut supporter des températures allant de 4°C à 30°C, et peut survivre en milieu lagunaire à des salinités comprises entre 15 et 40 (Fernandez & Boudouresque 1997; Boudouresque & Verlaque 2007). Cette espèce est surtout active la nuit et présente un comportement agrégatif. Elle comporte une phase de vie pélagique correspondant à la phase larvaire qui dure jusqu'à 30 jours, ce qui est relativement long. En fin de vie larvaire, lors de la métamorphose, les post-larves tombent sur le fond et se fixent au substrat sur lequel elles vont recruter et commencer leur vie benthique qui dure plusieurs années (figure 2).



Figure 2 : L'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Photo : © P. Lelong).

2. Cycle de vie

Les oursins sont des organismes ovipares gonochoriques. Le cycle commence lors des épisodes de reproduction avec l'émission des gamètes dans la colonne d'eau (figure 3), souvent synchrone au sein d'une population, probablement déterminée par des signaux chimiques propres aux oursins (Pennigton 1985). La reproduction peut aussi être induite par un bloom phytoplanctonique, une élévation de la température ou des contraintes hydrodynamiques (voir revue de McEdward & Miner 2007). Le long des côtes méditerranéennes, deux épisodes reproductifs ont lieu chaque année, le plus important au printemps, le second de moindre importance à l'automne (Fenaux 1994 ; Lopez et al. 1998 ; Tomas et al. 2004).

L'œuf fertilisé se développe rapidement en un échinopluteus, larve nageuse, environ 48 heures après la fertilisation (figure 3). Le développement se poursuit pendant environ 3 à 4 semaines en surface de la colonne d'eau, dans le plancton dont les larves se nourrissent. Vers la fin du développement larvaire, un groupe de cellules situé sur la partie gauche de la larve, se différencie rapidement pour donner le rudiment, qui constituera le futur petit oursin (figure 3).

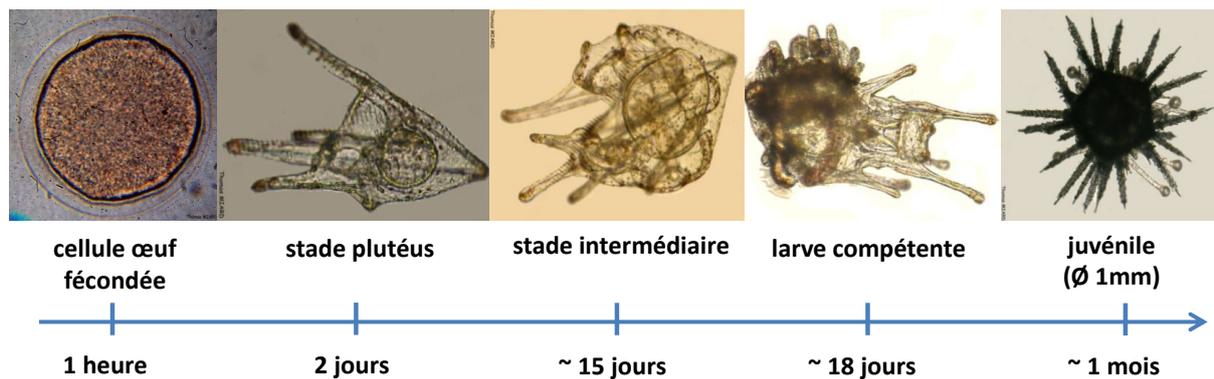


Figure 3 : Chronologie du cycle de vie de l'oursin *Paracentrotus lividus* (© T. Miard et S. Couvray).

A mesure que le rudiment se développe, les structures larvaires (bras, bouche, estomac) se résorbent et apparaissent des structures typiques des oursins adultes, que sont les pieds ambulacraires (Gosselin & Jangoux 1998). Cette métamorphose est initiée en surface de la colonne d'eau. A ce stade, les larves tombent vers le fond et terminent leur métamorphose si le substrat leur est propice (Gosselin & Jangoux 1998). Les larves métamorphosées sont alors des juvéniles d'une taille approximative de 1 millimètre piquants compris (figure 3). Les juvéniles devront croître pour atteindre la taille correspondant à leur maturité sexuelle et recommencer le cycle. Le taux de croissance des oursins est déterminé par la nourriture, l'hydrodynamisme, la température de l'eau, l'allocation énergétique vers le développement gonadique ainsi que la densité. Toutefois, la disponibilité en nourriture influence plus le taux de croissance que la densité des populations (Himmelman 1986 ; Turon et al. 1995 ; Fernandez 1996 ; Boudouresque & Verlaque 2007). L'oursin comestible *P. lividus* atteindra une taille commercialisable au bout de 4 à 5 ans, soit 5 cm de diamètre hors piquants (Grosjean et al. 2003 ; Ouréns et al. 2013).

3. Rôle écologique

En Méditerranée, l'oursin *P. lividus* est l'un des principaux invertébrés herbivores benthiques. Il s'agit d'une espèce clé dans la régulation des communautés algales, principalement dans les premiers mètres de profondeur (Ruitton et al. 2000 ; Boudouresque et Verlaque 2007). Parmi les espèces algales les plus sensibles, les cystoseires (Phaeophyceae), font partie du préférendum alimentaire de *P. lividus* (Thibaut et al. 2005 ; Boudouresque et Verlaques, 2007 ; Agnetta et al. 2015). Les cystoseires sont des ingénieurs dans de nombreux assemblages phytobenthiques et constituent l'un des plus importants habitats marins en formant des forêts marines dont les canopées ont rôle comparable aux forêts terrestres (Jones *et al.*, 1994; Ballesteros *et al.*, 1998). Ces algues se retrouvent de la zone intertidale jusqu'à la zone circalittorale supérieure (Ballesteros et al., 2009). Elles rendent de nombreux services écosystémiques en fournissant une forte production primaire, une source de nourriture, le cycle des nutriments. Le substrat généré par ces herbiers jouent un rôle important de nurserie pour de nombreuses espèces de poissons en fournissant une structure biogénique, de la nourriture et un abri (Jones et al. 1994 ; Ballesteros et al. 1998 ; Cheminée et al. 2013). Au cours du siècle dernier les forêts de cystoseires ont fortement régressées le long du littoral Méditerranéen avec même la disparition de certaines espèces. (Perkol-Finkel et Airoidi, 2010 ; Thibaut et al. 2015). La reconstitution de ces forêts d'algues est particulièrement longue voire inexistante. (Perkol-Finkel et Airoidi, 2010).

De par leur action de broutage, les oursins sont capables de faire basculer l'écosystème d'un état stable et complexe à communautés macrophytiques dressées (dont les cystoseires) vers un autre état stable plus simple de type barren, moins productif et moins diversifié, dominé par des algues incrustées (Barnes et al. 2002 ; Eklöf et al. 2008). Par conséquent, toute modification de densité ou de la structuration démographique des communautés d'oursins peut avoir des conséquences sur l'ensemble de l'écosystème infralittoral (Verlaque 1984 ; Azzolina et al. 1985 ; Palacin et al. 1998 ; Bonaviri et al. 2012 ; Giakoumi et al. 2012). A partir de densités d'environ 15 ind.m⁻², les oursins sont capables d'éliminer progressivement la totalité des peuplements algaux dressés et de maintenir un état semi désertique (figure 4 c, d). Cette relative désertification est entretenue même pour des densités plus faibles de *P. lividus* par l'action de broutage ainsi que par la présence d'algues corallines incrustées qui empêche l'instauration de nouvelles propagules (Verlaque

1984 ; Fanelli et al. 1998 ; Bulleri et al. 2002). Même avec des densités inférieures à 5 ind.m², le broutage exercé par *P. lividus* a un effet significatif sur la structure de l'habitat (Palacin et al. 1998).

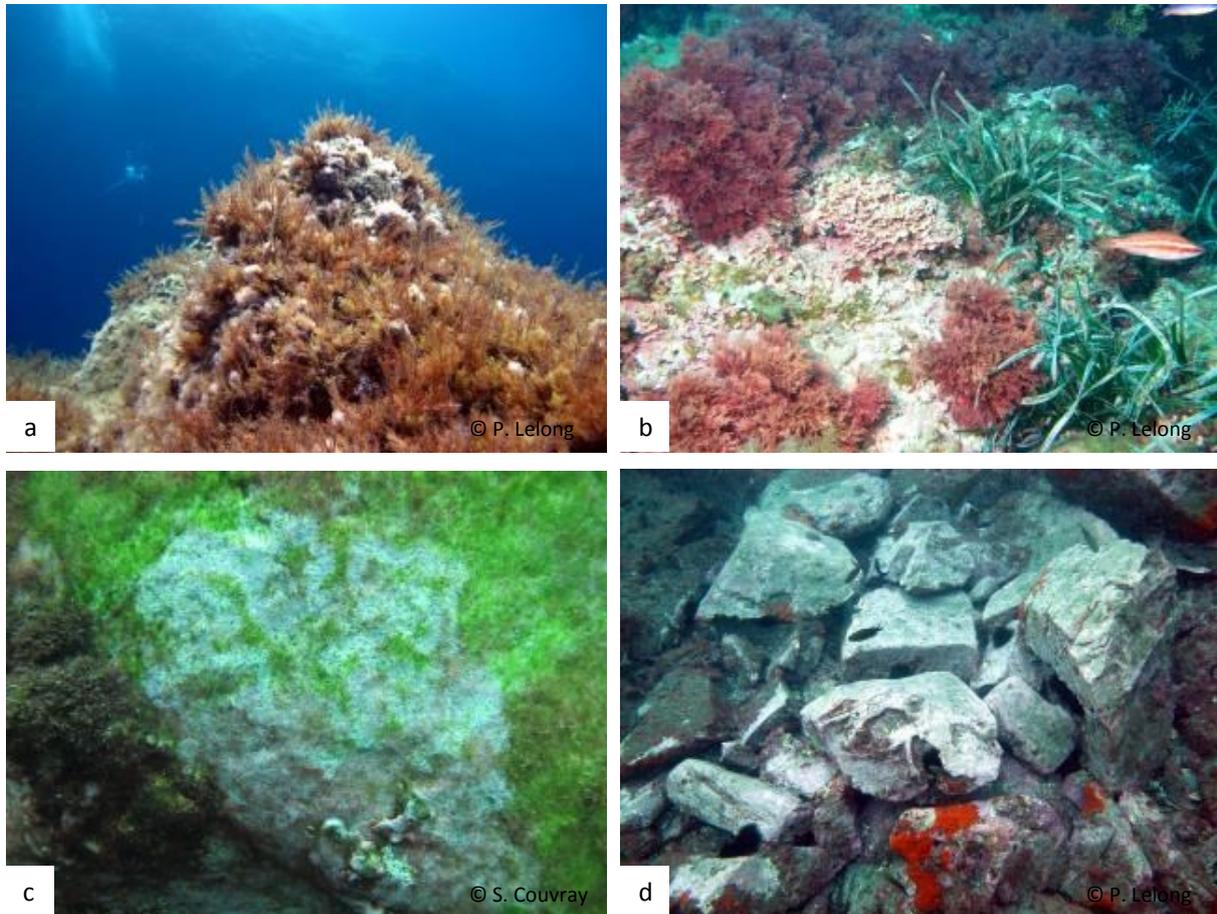


Figure 4 : impact des oursins sur les communautés algales. a et b : algues dressées et diversifiées sur site à faibles densités d'oursins. c et d : algues gazonnantes et roches à nues sur site à fortes densités d'oursins (Photo : © P. Lelong et S. Couvray).

II. Structuration des populations

1. Notion de population

Dans le cadre de la biologie de la conservation et de la gestion des ressources biologiques naturelles, la notion de « population » fait référence à des notions qui relèvent à la fois de la biologie et de la génétique des populations.

(Hartl 1994) définit une population par l'ensemble des individus de la même espèce au sein d'une aire géographique restreinte, susceptibles de se reproduire entre eux. Selon cette définition, la limite géographique des populations d'oursins *P. lividus* n'est pas facile à déterminer. En effet, les adultes benthiques ont un déplacement limité au sein de leur

habitat local (revue dans Boudouresque & Verlaque 2007). Il est alors improbable que deux individus adultes physiquement séparés par une grande distance ou par des barrières environnementales puissent par eux-mêmes s'agréger lors des événements de reproduction. La rencontre des gamètes émis dans le milieu extérieur par des adultes physiquement séparés est en revanche envisageable. Toutefois après émission des gamètes, les probabilités de fécondation décroissent très vite avec le temps et la dilution (Levitan et al. 1992), si bien que nous considérons ici que l'aire géographique d'une population d'oursins *P. lividus*, définie au sens de la biologie des populations, est déduite de la répartition des adultes benthiques sur des habitats partitionnés le long du trait de côte.

Au sens génétique, la population est considérée comme un ensemble de sous-populations, encore appelées « populations locales » ou « dèmes », génétiquement différenciées. Au sein d'une population, la distribution de diversité génétique n'est en effet généralement pas aléatoire (Irwin 2002 ; Hartl & Clark 2007) et la différenciation génétique résulte essentiellement des échanges génétiques réduits entre les populations locales du fait de barrières aux flux de gènes, limitant par exemple la migration des reproducteurs ou de nouveaux individus (Johansson et al. 2008 ; Puritz & Tooner 2011 ; Miller et al. 2013). Finalement, on parle plutôt de structure génétique des populations et on cherche à caractériser le nombre de sous-populations et leur localisation dans l'aire de répartition étudiée de l'organisme d'intérêt.

Les populations locales étant plus ou moins connectées les unes aux autres, la différenciation génétique provient essentiellement de l'effectif reproducteur de taille réduite à l'intérieur d'une population locale, au regard de la population générale. Ces conditions de reproduction locale aboutissent à une diminution du taux d'hétérozygotie observée localement (H_S) en comparaison de l'hétérozygotie attendue dans les conditions d'une population idéale panmictique (H_T).

Le déficit en hétérozygotes est exprimé par Wright (1965) par :

$$F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$$

Cet indice mesure la réduction relative des hétérozygotes lié aux différences alléliques entre population. Il permet de mesurer l'intensité de la différenciation génétique entre les populations locales et la population générale, et par conséquent le niveau de structuration génétique de la population (tableau 1).

Valeur de F_{ST}	Interprétation de différenciation génétique (structuration génétique)
0 à 0,05	Faible
>0,05 à 0,15	Modérée
>0,15 à 0,25	Forte
>0,25	Très forte

Tableau 1 : Interprétation de la différenciation génétique entre population en fonction des valeurs de F_{ST} .

Enfin, la détermination de la structuration génétique d'une population est complexe, peut varier dans l'espace, dans le temps, et même en fonction du type et du nombre de marqueurs moléculaires étudiés (Johnson et al. 2003 ; Kesäniemi et al. 2014).

Dans le cas de l'oursin *P. lividus*, les échanges d'individus entre populations au sens de la biologie des populations *via* la dispersion larvaire tendent à uniformiser la diversité génétique sur des aires géographiques étendues (Duran et al. 2004 ; Calderon et al. 2008). La dimension des populations locales est donc très grande et à l'échelle du bassin méditerranéen, un nombre limité de populations génétiquement différenciées ont été identifiées (Maltagliati et al. 2010 ; Penant et al. 2013). Cependant on connaît mal l'incidence à petite échelle des processus physico-chimiques et/ou biologiques sur la structuration des populations. Il est vraisemblable que l'utilisation de marqueurs moléculaires multiples permettra une meilleure résolution de la structuration génétique des populations à petite échelle (Penant et al. 2013).

Dans le présent manuscrit, nous appellerons « population » l'ensemble des « populations locales » de l'aire d'étude connectées entre elles par les échanges larvaires, sans *a priori* sur leur différenciation génétique.

2. Hétérogénéité environnementale, métapopulation et connectivité

L'hétérogénéité environnementale est un paramètre important dans la structuration et l'évolution des populations (Levins 1969). Pour l'oursins *P. lividus*, les populations vivent au sein d'habitats propices non uniformément répartis le long du littoral (figure 5) et dont la taille peut être variable, définissant des « patches » (Ouréns et al. 2015).

La population générale est par conséquent composée de populations locales (une population locale établie au sein de chaque patch) démographiquement connectées via l'échange de larves planctoniques (Grosberg & Cunningham 2001; Gaines 2007; Lipcius et al. 2008; Pinsky et al. 2012). La connectivité est réalisée lorsque des larves, produites à un site donné, ont pu recruter à distance de leur lieu de naissance, intégrer d'autres populations locales et survivre jusqu'à leur maturité sexuelle (Figure 9).

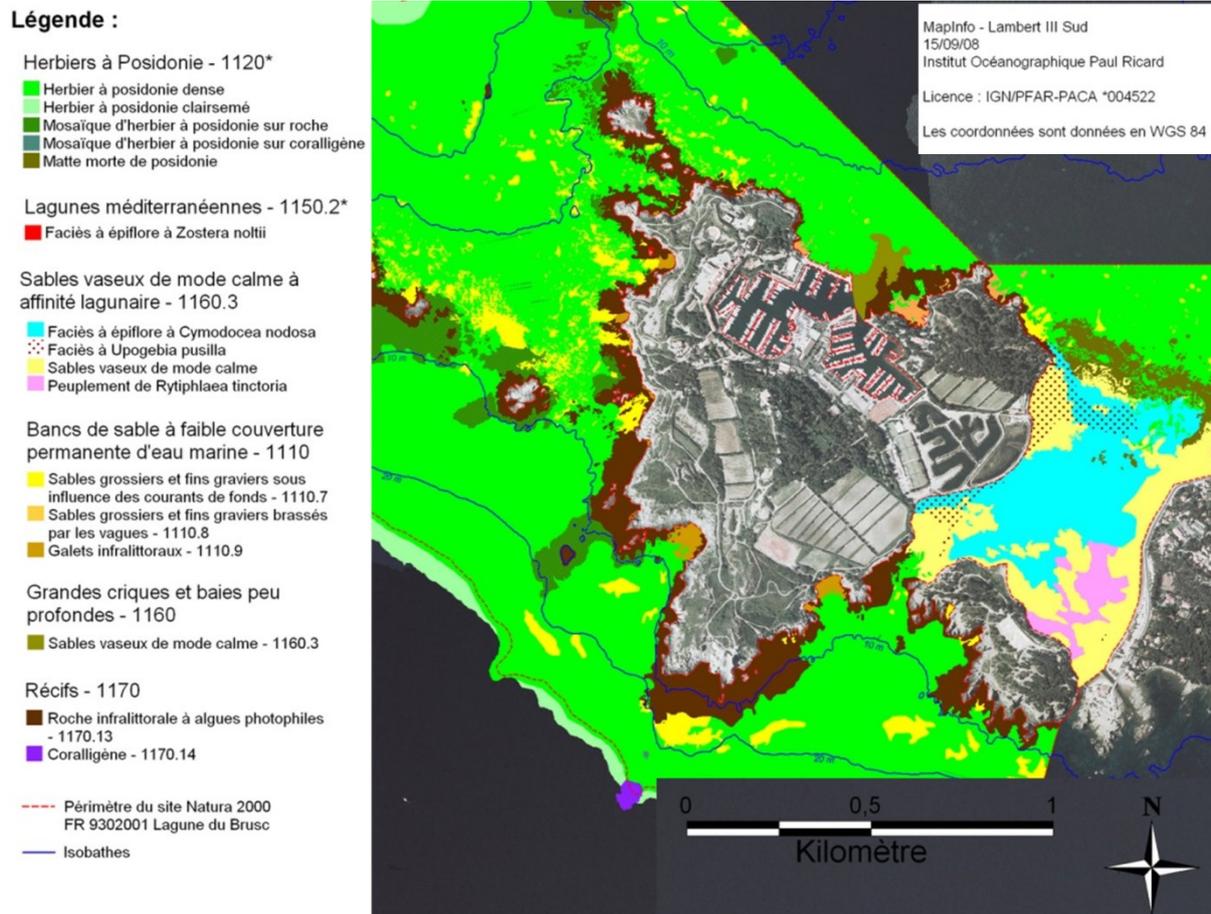


Figure 5 : Répartition hétérogène des biocénoses marine le long du littoral, exemple du pourtour de l'île des Embiez (source : Institut Océanographique Paul Ricard, 2008).

La population générale, aussi appelée métapopulation, peut présenter différentes configurations en fonction de la taille des patches, de leur isolement relatif et des capacités de dispersion des individus (figure 6) (MacArthur & Wilson 1963 ; MacArthur & Wilson 1967 ; Hanski & Gilpin 1991). L'entretien démographique, et même la persistance des populations locales dépend du rapport entre les taux de colonisation et d'extinction pour chaque patch. Ainsi, même si la métapopulation persiste dans le temps, des populations locales peuvent disparaître, alors que d'autres peuvent persister ou apparaître (figure 6).

Metapopulation structure

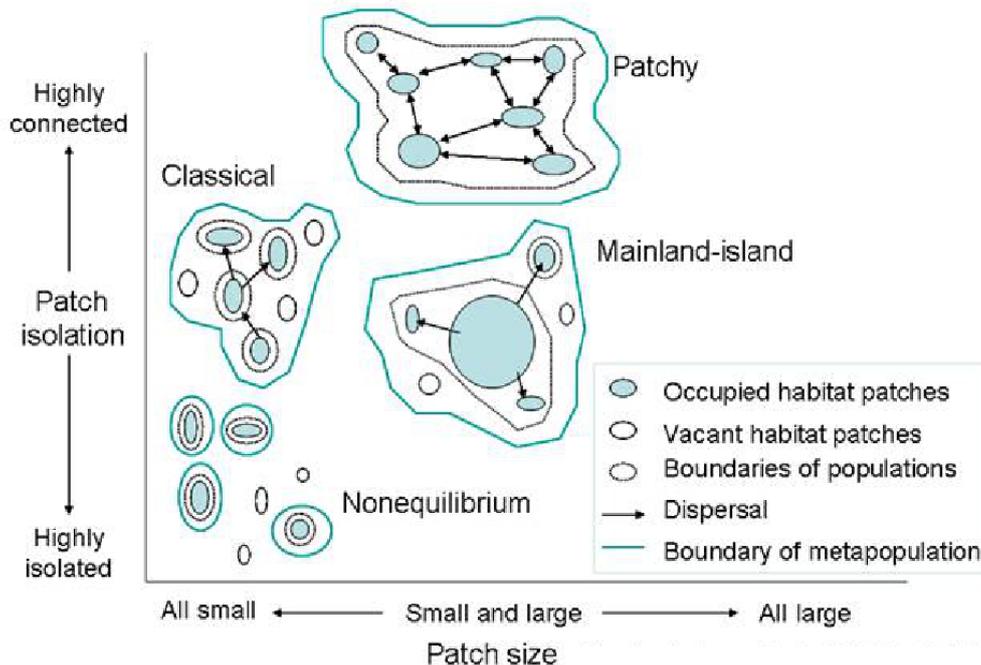


Figure 6 : Différents modes d'organisation de métapopulations (D'après Harrison et Taylor 1997 et Stith et al. 1996)

En théorie, le modèle de « patchy population » semble le mieux décrire l'organisation des populations de *P. lividus*. En effet, la capacité de dispersion larvaire est très grande en regard des distances entre les patches. Dans cette situation, les taux de migration sont très élevés, si bien que la population n'est finalement pas considérée comme une métapopulation.

En pratique, cette vision est nuancée car, à l'intérieur d'une métapopulation, la contribution des patches à l'entretien démographique n'est pas forcément homogène. Le modèle source-puits établit qu'une population « source » permet d'alimenter en nouveaux individus d'autres populations, généralement de faibles effectifs ou densités, définies comme « puits », qui ne persisteraient pas sans les sources, c'est l'effet « rescue », chaque population ayant une composante à la fois source et puits plus ou moins forte (figure 7).

L'identification des populations locales (ou des patches) sources est importante, car elles doivent en particulier concentrer les efforts de conservation (Lipcius et al. 2008).

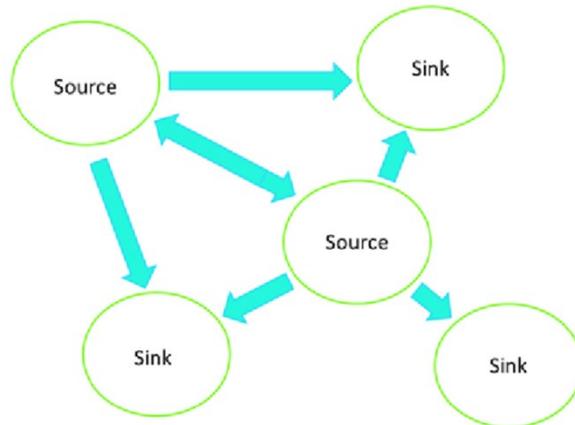


Figure 7 : Modèles source-puits des métapopulations.

3. Structuration génétique des populations à l'échelle de l'aire de répartition et locale : l'apport de la génétique des populations

Le niveau de structuration des populations de *P. lividus* à la fois dans l'espace et dans le temps, dépend des échanges migratoires entre les différents patches, assurés par la dispersion larvaire. Ces échanges peuvent se caractériser en sens et intensité, par la mesure de la différenciation génétique entre populations (ou patches), en ciblant un ou plusieurs marqueurs moléculaires, par exemple des gènes mitochondriaux et nucléaires, des séquences inter-géniques ou des séquences répétées en tandem types microsatellites.

Les modèles de dispersion de propagules dans les océans montrent que la dispersion est d'autant plus forte que le temps de vie planctonique est long (Pineda et al. 2007), ce qui en l'absence de barrières aux flux migratoires, tend à uniformiser la diversité génétique entre les différents peuplements d'une population (Bradbury et al. 2008) (figure 8). Pour *P. lividus*, dont la phase larvaire est longue (environ 3 semaines), plusieurs études réalisées à l'aide de marqueurs génétiques d'origines nucléaires et mitochondriales montrent une très forte diversité génétique au sein de la population générale et des peuplements étudiés, et un faible niveau de structuration (Duran et al. 2004; Calderon et al. 2008; Maltagliati et al. 2010).

Ainsi, dans le cas des espèces benthopélagiques à longue phase larvaire, la structuration résulte souvent de l'isolement par distance (IBD : isolation by distance), lorsque la distance entre les patches étudiés est grande et/ou que les populations sont de

petites tailles (Calderon et al. 2009 ; Puebla et al. 2009) Pourtant, la structuration génétique de populations d'espèces benthopélagiques sont de plus en plus souvent mises en évidence à petite échelle (Zhan et al. 2009 ; Hoffman et al. 2012).

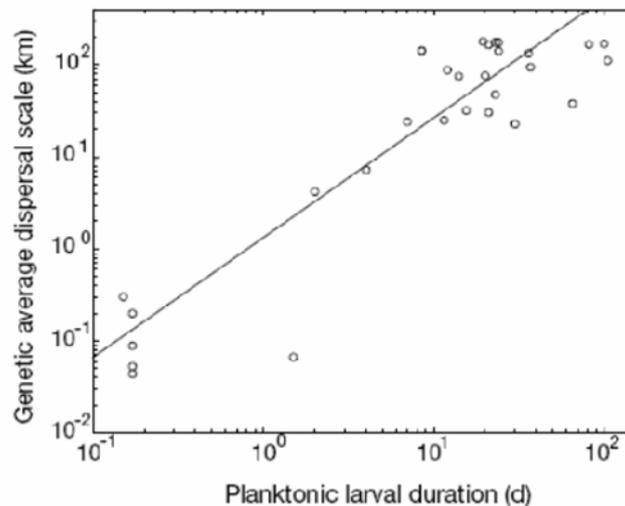


Figure 8 : Relation entre la durée de phase larvaire et la dispersion moyenne estimée sur la base des distances génétiques pour 32 espèces (d'après Siegel et al. 2003)

Au niveau spatial, à l'échelle de l'aire de répartition, les marqueurs mitochondriaux ont permis de révéler une différenciation claire entre les populations des bassins Atlantique et Méditerranéen au niveau ou à l'est du détroit de Gibraltar, et à l'intérieur du bassin Méditerranéen entre les populations de l'Adriatique et celles du reste de la Méditerranée (Duran et al. 2004 ; Calderon et al. 2008 ; Maltagliati et al. 2010).

A une échelle régionale, les études n'ont pas permis de détecter de structuration, y compris en utilisant des marqueurs génétiques d'origines nucléaires (Iuri et al. 2007 ; Calderon et al. 2008 ; Calderon et al. 2009a,b ; Calderon & Turon 2010). Ryman et Palm (2006) ont avancé que l'absence de structuration détectable à cette échelle résulte probablement du faible échantillonnage pris en compte dans ces études. Cette hypothèse a été confirmée par une récente étude qui montre qu'en augmentant l'effectif analysé et en réalisant une analyse multi-marqueurs, il est possible d'observer une structuration génétique à petite échelle, intéressant potentiellement des populations distantes de l'ordre de 40 à 60 km seulement (Penant et al. 2013).

Les marqueurs microsatellites hyper-variables sont largement utilisés pour caractériser les fluctuations de diversité génétique des populations terrestres et marines. Les marqueurs microsatellites développés pour *P. lividus* par Calderon et al. (2009a) ont permis de mettre en évidence une faible structuration entre populations géographiquement distantes, mais pas entre cohortes temporelles sur une même aire géographique Calderon et al. (2009 a, b). Cependant, ils ont pu montrer une différenciation entre les populations d'adultes et les populations de juvéniles, suggérant que ces marqueurs peuvent être informatifs avec un échantillonnage suffisant.

III. Dynamique des populations

1. Généralité

La dynamique des populations s'intéresse aux variations au cours du temps des densités d'individus au sein d'une population. Chez les organismes benthopélagiques, l'entretien démographique d'une population est assuré essentiellement par l'apport de nouveaux individus via la dispersion larvaire (figure 9 et 10).

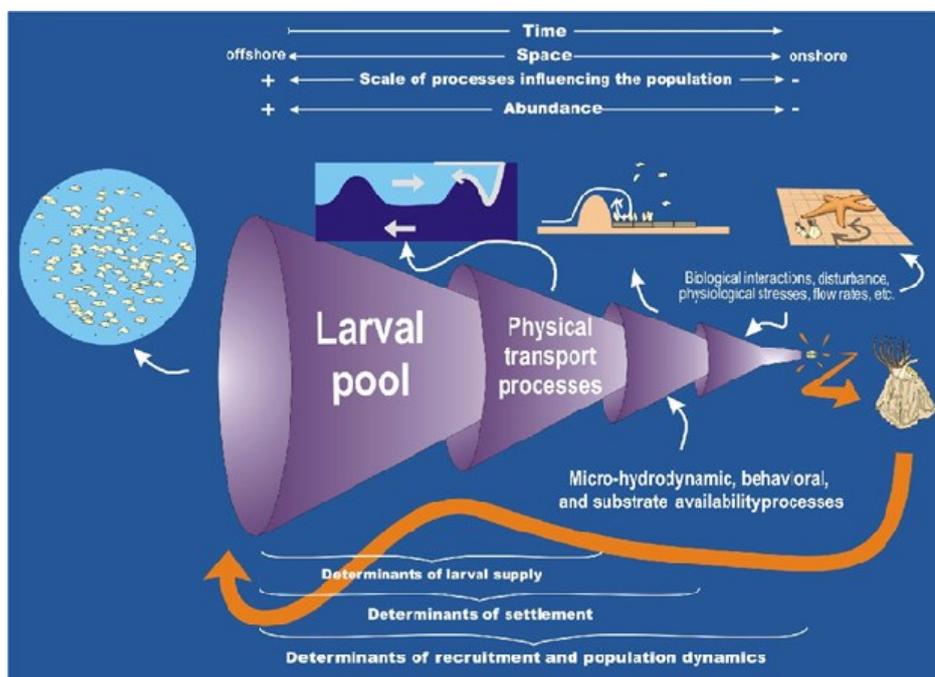


Figure 9 : Influence des processus impactant la survie des individus au court des différentes phases de vie des organismes benthopélagiques (d'après Pineda 2000).

Les modèles de dispersion de propagules dans les océans sont construits sur la base des processus physiques réalisés à moyenne échelle et ne permettent pas encore de prendre en compte complètement les processus hydrodynamiques côtiers à petite échelle, processus qui peuvent limiter la dispersion des propagules (Pineda et al. 2007). Or, il existe une relation non linéaire entre la distance à la côte et la dispersion (Pedrotti & Fenaux 1992).

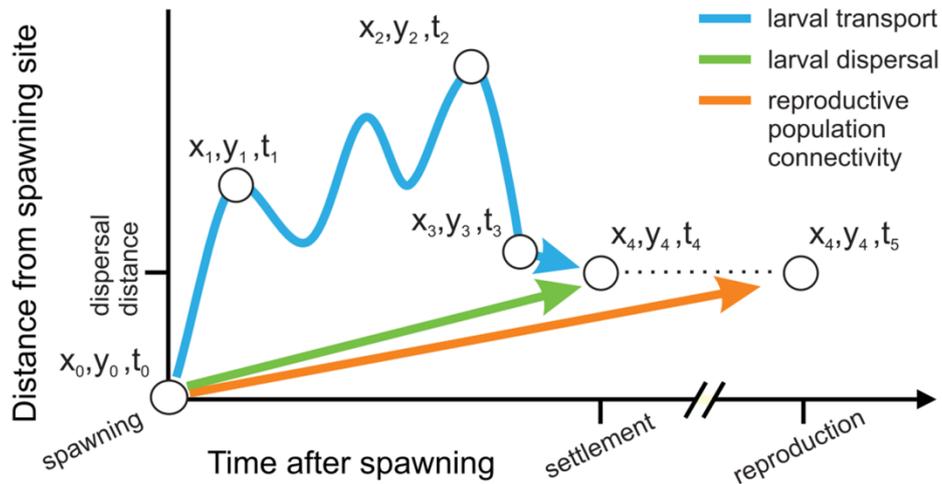


Figure 10 : Distance de dispersion des organismes benthopélagique au cours des différentes phases de vie (d'après Pineda et al. 2007).

Si les conditions de vie sont adéquates, des larves retenues dans des gires, ou présentes dans des masses d'eau soumises à de faibles courants de surface, peuvent recruter à proximité de leur lieu de naissance (recrutement local), et dans des cas extrêmes, au sein de leur population d'origine (autorecrutement). De même, alors que les larves peuvent parcourir une grande distance au cours de leur vie planctonique, l'étendue du déplacement peut au final être limitée (Jones et al. 2007). Depuis quelques années, des études sur de nombreuses espèces ont mis en évidence des cas d'autorecrutement ou de dispersion larvaire limitée, induisant une structuration des populations à travers l'espace et le temps malgré la longue durée de vie larvaire des espèces considérées (Swearer et al. 2002 ; Benham et al. 2012).

2. Vie pélagique

a. Reproduction

Chez les oursins, la fécondation est externe. Pour l'espèce *Paracentrotus lividus* les individus reproducteurs se rassemblent en agrégats reproductifs pour émettre les œufs et le sperme dont la rencontre est aléatoire. Une femelle *P. lividus* peut pondre plus d'un million d'œufs féconds par acte de ponte (Luis et al. 2005). Le nombre de zygotes produits est bien moindre car le succès de fertilisation est très variable et soumis à plusieurs paramètres individuels, populationnels et environnementaux (Levitan et al. 1992 ; Palumbi 1994 ; Palumbi 2009). En effet, le succès de reproduction dépend des performances reproductrice individuelle, de la densité des populations pour permettre la création d'agglomérats reproductifs, ainsi que des courants (Levitan 2004). L'agrégation des individus permet d'améliorer le succès reproductif et de fournir ainsi un apport larvaire conséquent (Juinio-Meñez et al. 2008). Les gamètes ayant une durée de vie limitée après la ponte, la dilution du sperme limite drastiquement le succès de fertilisation, surtout dans des courants rapides ou avec un fort hydrodynamisme.

b. Développement larvaire

Les larves produites ont une longue phase planctonique, de trois à quatre semaines, au cours de laquelle la mortalité est très élevée (Pedrotti & Fenaux 1992 ; Fenaux 1994 ; Luis et al. 2005 ; Prado et al. 2012). La mortalité larvaire est positivement corrélée à la durée de la phase planctonique, mais varie aussi avec la taille des larves et leur âge (Rumrill 1990) (figures 9 et 10). De nombreux paramètres écologiques tel que l'accès à la nourriture, la prédation, les paramètres physico-chimique de l'eau ou la courantologie influencent la mortalité larvaire au cours du développement. Quelle que soit la période, la croissance des larves d'oursins en milieu naturel est limitée par la quantité de nourriture disponible (Fenaux 1994). Ainsi, bien qu'elle soit difficile à estimer, on admet que la mortalité peut atteindre 20% du pool larvaire restant par jour (Rumrill 1990). Le bon déroulement de la phase larvaire conditionne la capacité de survie aux périodes délicates du développement comme la métamorphose et la survie à la première année de phase benthique. La limitation en nourriture impose un allongement de la période entre la première alimentation et la phase de compétence pour la métamorphose, ce qui induit une augmentation du transport et de la

mortalité larvaire (Fenaux 1994). La prédation est probablement la cause majeure de mortalité des larves d'échinoides (voir revue de McEdward & Miner 2007). Les échinoplutés sont des proies pour les larves de nombreuses espèces de poissons et de crustacés (Luis et al. 2005). Les températures extrêmes, la salinité et les forts niveaux de radiation d'ultraviolets peuvent aussi avoir des effets létaux ou sub-létaux sur les larves (voir la revue de McEdward & Miner 2007).

3. Vie benthique

a. Métamorphose

L'induction de l'implantation et de la métamorphose se produit en réponse à des facteurs environnementaux qui signalent la présence d'habitats benthiques adaptés. (voir revue de McEdward & Miner 2007). Des expériences en aquaculture expérimentale ont montré que si les larves ne rencontrent pas les stimuli nécessaires, elles peuvent résorber leurs podias, replacer leurs bras en position initiale et se remettre à nager en direction de la surface en attendant un stimulus approprié pour engendrer le processus de métamorphose (Gosselin & Jangoux 1998). La métamorphose ne dure que quelques heures mais constitue une phase critique avec des taux de mortalité élevés (Gosselin & Jangoux 1998 ; Boudouresque & Verlaque 2007).

b. Recrutement et survie des juvéniles

Le recrutement des oursins peut présenter de très grandes variations interannuelles avec certaines années exceptionnellement favorables entrecoupées de périodes sans recrutement apparent (Turon et al. 1995 ; Lopez et al. 1998 ; Balch & Scheibling 2001 ; Tomas et al. 2004 ; Hereu et al. 2012). Les bons événements de recrutement ont lieu les années de forte abondance larvaire qui sont elles-mêmes liées aux années de forte production en phytoplancton (Lopez et al. 1998).

Le succès du recrutement dépend des caractéristiques du biotope comme la nature des fonds, de la disponibilité en nourriture, de l'hydrodynamisme, de la prédation (Bonaviri et al. 2012). La profondeur et la densité des populations jouent un rôle important dans le recrutement de *P. lividus* (Ouréns et al. 2014). Il est aussi soumis aux aléas climatiques

comme les tempêtes ou les périodes de canicule. Les évènements de recrutement présentent donc une forte hétérogénéité spatiale et temporelle.

Après le recrutement, les deux premières années sont celles pour lesquelles le taux de mortalité va être le plus élevé. Pour le recrutement dans la matte morte et dans l'herbier de posidonie, le taux de mortalité des juvéniles semble très élevé. Pour les individus de plus de 3 mm de diamètre, le taux de mortalité est estimé à 90% (Azzolina 1987 ; Turon et al. 1995). Turon et al. (1995) ont quant à eux calculé des taux de mortalité dans des populations d'oursins sur substrat rocheux de Tossa de Mar en Espagne avoisinant 60% pour les deux premières années de vie et de 25% pour chaque année suivante pour un biotope comportant des communautés stables. Pour un autre site à communautés instables, ils ont supposé que le taux de mortalité des juvéniles était nettement supérieur. Le taux de survie des recrues est donc très variable mais globalement faible.

4. Facteurs biotiques et abiotiques influençant les populations d'adultes

La littérature portant sur la dynamique des populations de *P. lividus* à l'état benthique est relativement riche. Boudouresque & Verlaque (2007) référencent dans leur revue une trentaine d'études décrivant des densités de *P. lividus* sur divers substrats et profondeurs allant de 0,1 ind.m⁻² à 300 ind.m⁻². Un certain nombre d'études menées dans la partie Nord-Ouest de la Méditerranée portent sur les peuplements, la biologie et l'écologie de *P. lividus*. Elles ont été réalisées dans des zones plus ou moins pêchées, parfois dans des réserves et à différentes périodes. La réflexion porte souvent sur les variations dans le temps des effectifs et des classes de taille et sur la répartition des individus en fonction des divers facteurs influençant ces populations. Il en résulte que les populations d'oursins sont soumises à de nombreuses variables naturelles et anthropiques qui rendent leur dynamique extrêmement variable dans l'espace et le temps (Boudouresque & Verlaque 2007 ; Hereu et al. 2012).

a. Prédation

L'abondance et la composition spécifiques des communautés d'oursins peuvent être déterminées par la prédation (McClanahan & Shafir 1990 ; Sala & Zabala 1996). Une liste de

37 espèces de crustacés, mollusques, étoiles de mer, poissons et même oiseaux prédateurs de *P. lividus* est présentée dans la revue de Boudouresque et Verlaque 2007. En Méditerranée, les principaux prédateurs de *P. lividus* sont les poissons, et particulièrement les Sparidae *Diplodus sargus* et *Diplodus vulgaris*, capables de consommer des oursins de plus de 5 cm de diamètre, ainsi que le Labridae *Coris julis* qui est le principal prédateur des juvéniles d'oursins (Sala 1997). Il a récemment été montré le rôle des crustacés comme micro-prédateurs de jeunes recrues d'oursins, particulièrement dans les zones à peuplement algaux dressés (Bonaviri et al. 2012). En plus des prédateurs directs (ceux qui arrivent à ouvrir les oursins), plus d'une dizaine d'espèces de poissons charognards, particulièrement des labridés, consomment les restes d'oursins laissés par les prédateurs directs (Sala 1997).

En Méditerranée, les prédateurs peuvent dans certains cas contrôler les communautés d'oursins, particulièrement dans les réserves naturelles où les poissons sont plus nombreux et de plus grande taille (Sala & Zabala 1996 ; Sala et al. 1998a ; Hereu et al. 2005). En effet, l'augmentation de la prédation des oursins dans les aires marines protégées peut avoir des conséquences importantes à l'échelle des communautés. En contrôlant les abondances de *P. lividus*, les prédateurs jouent indirectement un rôle par effet cascade top-down sur les assemblages benthiques dominés par des organismes photosynthétiques (Sala et Zabala 1996 ; Pinnegar et al. 2000 ; Hereu 2004 ; Hereu et al. 2008) (figure 11).

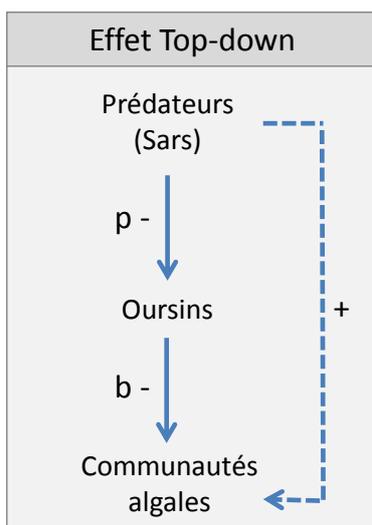


Figure 11 : Schéma d'un effet cascade impliquant des poissons prédateurs avec un contrôle direct négatif par prédation (p-), les oursins herbivores avec un effet direct négatif par broutage (b-), contrôlant les communautés algales à la base du réseau trophique. Les prédateurs ont une conséquence indirecte positive (+) sur les communautés algales. (D'après Menge 1995 ; Pinnegar et al. 2000).

Cet effet est particulièrement marqué dans les eaux peu profondes (0 à 5 m), où les oursins sont couramment plus abondants et où les interactions prédateurs-oursins sont importantes (Vergés et al. 2012).

b. Maladies

Dans les années 1980, Jangoux a publié une série de revues sur les maladies des échinodermes (Jangoux 1984 ; Jangoux 1987a ; Jangoux 1987b ; Jangoux 1987c ; Jangoux 1987d). La plupart des maladies induites par des agents biotiques ne sont pas mortelles. Toutefois, certaines maladies peuvent provoquer des évènements de mortalités massives chez certaines espèces d'échinodermes (Jangoux 1987d). Les épizooties peuvent avoir un rôle important dans la régulation des communautés d'oursins et peuvent avoir des répercussions indirectes sur les communautés benthiques de l'écosystème associé (Jangoux 1984 ; Jangoux 1987d ; Tajima et al. 2007).

Pour l'espèce *P. lividus*, l'épisode de maladie dit de « l'oursin chauve » qui a eu lieu en Méditerranée nord-occidentale (Espagne, France, Italie, Croatie), entre la fin des années 1970 et le début des années 1980 a provoquée des mortalités massives en certains endroits où les densités d'oursins étaient très importantes (Azzolina 1987 ; Boudouresque et al. 1980). Cette maladie transmissible non-spécifique a touché plusieurs autres espèces d'oursins réguliers (Maes & Jangoux 1984). Dans le Parc National de Port-Cros, où la pêche est interdite, après cet épisode de mortalité massive, les densités de populations d'oursins n'ont pas récupéré leurs valeurs initiales (Hereu 2005). Cette maladie s'est développée dans les eaux chaudes et peu profondes. Les communautés microbiennes impliquées dans cette maladie sont opportunistes et non-spécifiques (Jangoux & Maes 1987 ; Becker et al. 2008). Cette maladie réapparaît ponctuellement sur les côtes provençales et corses en 2009 et 2010, sans provoquer de mortalités massives.

c. Habitat

L'oursin *P. lividus* est principalement rencontré sur des substrats rocheux, les blocs, les herbiers à *Posidonia oceanica* et *Zostera marina*.

La complexité de la structure de l'habitat joue un rôle important sur les communautés d'oursins. En particulier, les micro-habitats favorisent le recrutement et la survie des juvéniles (Tegner & Dayton 1977). Les oursins *P. lividus* peuvent vivre dans une large gamme de biotopes pour lesquels les paramètres environnementaux peuvent être plus ou moins stables et la nourriture plus ou moins disponible.

Dans des sites « stables », les densités sont moins fluctuantes dans le temps, moins fortes et avec plus d'individus de grande taille, une longévité plus grande et une plus faible mortalité que dans des sites « instables » (Turon et al. 1995). En sites instables, le taux de croissance maximal est atteint à un âge plus précoce, de même que l'âge de maturité sexuelle. La fonction de reproduction est plus importante malgré une disponibilité en nourriture plus faible et une plus grande densité de population. Cela peut être la cause du taux de croissance plus faible. Par conséquent cette espèce peut adopter différentes stratégies d'allocation énergétique en réponse aux paramètres environnementaux.

d. Qualité et disponibilité de l'habitat

Les populations de *P. lividus* sont aussi régulées par la qualité et la disponibilité de l'habitat (eutrophisation, fragmentation d'habitat, etc.) de plus en plus dégradé par les activités anthropiques (Prado et al. 2012).

Concernant la perte d'habitat, uniquement dans le Golfe de Marseille au cours du dernier siècle, plus des deux tiers des biotopes favorables à *P. lividus* ont été dégradés, modifiés et morcelés (Régis 1987). La fragmentation de l'habitat par l'impact des activités humaines peut être une barrière à la connectivité (disparition de zones de nurseries, perturbation de la fonction reproductrice par des agents polluants).

De récentes études mettent en évidence les effets des changements climatiques sur la physiologie de l'oursin, notamment ceux dus à l'acidification des océans sur le développement embryonnaire et la calcification du test (Martin et al. 2011 ; Stumpp et al. 2011 ; Asnaghi et al. 2013 ; Asnaghi et al. 2014). Les expériences in vitro ont mis en évidence que la diminution de pH de l'eau de mer peut entraîner des retards de croissance chez la larve et un défi de calcification du test à l'état benthique. Dans les deux cas, cela a pour conséquence d'augmenter le taux de mortalité par prédation (Rumrill 1990 ; Asnaghi et al. 2013).

e. Densité dépendance

Effet Allee

L'effet Allee (ou *depensatory effect*) se traduit dans une population par l'existence d'une densité dépendance entre le taux de croissance et la taille de la population lorsque la population comporte relativement peu d'individus (Allee 1931) (figure 12). Ce principe s'oppose à l'idée qu'il existe toujours une corrélation négative entre la densité d'une population et son taux de croissance, liée essentiellement aux phénomènes de compétition.

Comme de nombreux autres invertébrés marins, les populations d'oursins sont soumises à l'effet Allee (Levitan 1989 ; Bostford et al. 2004 ; Kramer et al. 2009). Lorsque les densités sont trop faibles, la croissance de la population devient négative et la population s'effondre. Cela provoque une barrière à la régénération des stocks des espèces exploitées (Petersen & Levitan 2001)

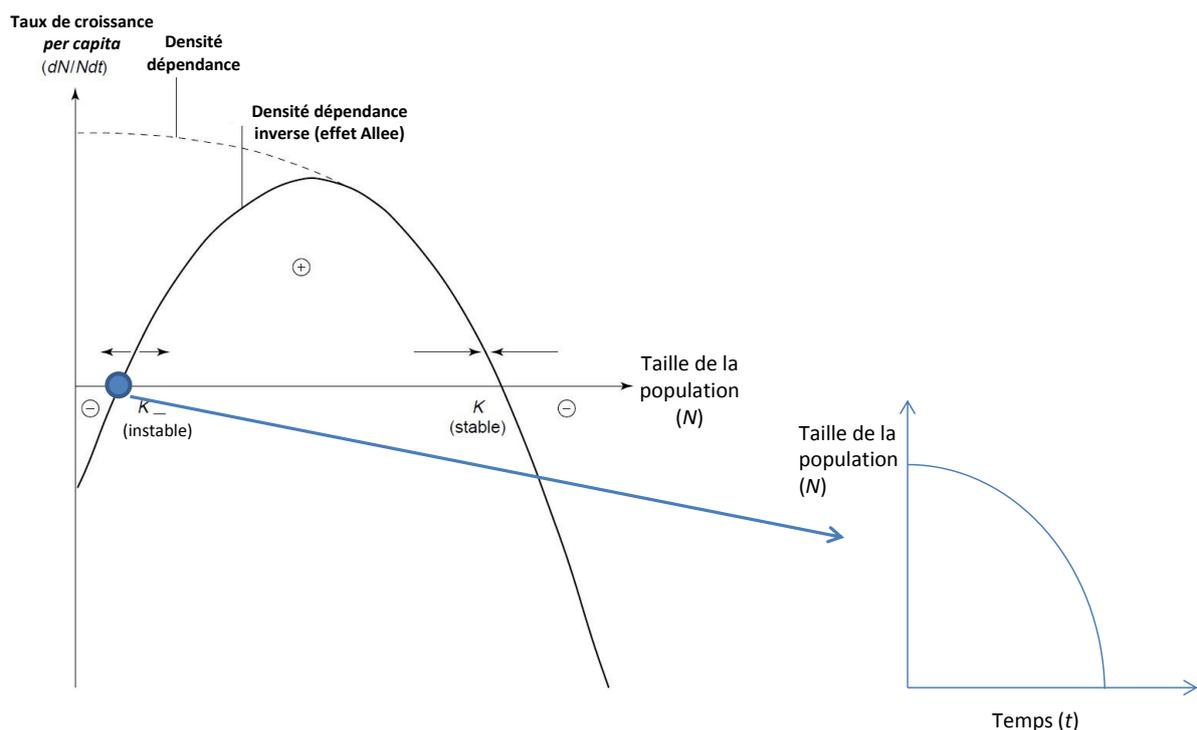


Figure 12 : évolution du taux de croissance et de la taille d'une population soumise à l'effet Allee.

Effet de la densité sur la reproduction

Les oursins ont un comportement agrégatif et par conséquent, leur distribution n'est pas homogène. Sur des aires restreintes, les oursins peuvent former des patches de fortes densités au milieu de zones à plus faible densité (Ouréns et al. 2014). La fécondation des oursins étant externe, la formation d'agrégats d'individus favorise la reproduction notamment en augmentant les chances de rencontre entre les gamètes (Ouréns et al. 2013a ; Ouréns et al. 2013b). Si les densités sont insuffisantes pour que les individus puissent créer des agrégats reproductifs efficaces, cela diminue drastiquement le succès de reproduction et par conséquent la production de larve (Pennigton 1985 ; Levitan et al. 1992).

Effet de la densité sur la survie : du recrutement à l'adulte.

Le succès du recrutement peut aussi être soumis à un effet de densité-dépendant avec la présence des individus adultes dans le milieu (Tegner & Dayton 1977 ; Nishizaki & Ackerman 2007a). La densité dépendance entre les recrues et les adultes a été observé chez plusieurs espèces d'oursins (Sloan et al. 1987; Palleiro-Nayar et al. 2011). Les juvéniles peuvent se réfugier dans la canopée d'épines des adultes formant des micro-habitats offrant une protection contre les prédateurs et les vagues (Tegner & Dayton 1981; Hunte & Younglao 1988; Nishizaki & Ackerman 2007a; Ouréns et al. 2014). Ainsi, le succès du recrutement et la survie des juvéniles sont favorisés par les fortes densités d'adultes (Morgan & Shepherd 2006).

Les agrégats denses d'oursins peuvent aussi constituer une défense contre les vagues et les prédateurs pour les individus adultes, favorisant ainsi leur survie (Ouréns et al. 2014).

Implication pour la gestion de la ressource

En plus de provoquer une diminution directe des stocks, la pêche affecte de façon plus complexe et indirecte tous les stades clés de leur dynamique de par leur sensibilité à l'effet Allee. En effet, La fécondité des oursins augmente en fonction de leur âge et donc de la taille. La pêche cible les plus gros individus car ils contiennent les plus grosses gonades (partie consommée de l'animal). Ainsi, ce sont les individus les plus féconds qui sont impactés par cette activité, provoquant une diminution de la fécondité moyenne de la

population. Le recrutement et la survie des juvéniles étant densité dépendant des adultes, la diminution des densités par l'activité de pêche impacte aussi indirectement le renouvellement des populations. Cela maintient les densités à des niveaux bas, entraînant un risque d'effondrement des stocks tel qu'il s'est déjà produit en Bretagne et en Irlande, malgré l'arrêt de l'activité de pêche (Allain 1975 ; Andrew et al. 2002 ; Williams 2002 ; FAO 2012).

*f. Fluctuation démographique de *Paracentrotus lividus* en Méditerranée*

Les densités de *P. lividus* ont tendances à fluctuer sur des pas de temps plus ou moins courts (journalier, saisonnier, annuel ou pluriannuel). Les suivis sur transects permanent dans la baie du parc national de Port-Cros montrent à la fois des fluctuations saisonnières et pluriannuelles (Azzolina et al. 1985).

Il existe peu d'études portant sur les fluctuations d'abondance d'oursins *P. lividus* à long terme malgré leur intérêt pour la compréhension des mécanismes qui influent sur la dynamique des population ainsi que leur capacité de résilience (Hereu et al. 2012). En effet, les études menées sur de courts laps de temps peuvent engendrer une mauvaise interprétation des fluctuations sur les tendances à long terme (Boudouresque & Verlaque 2007).

Les plus longues séries temporelles permettant d'apprécier l'évolution des populations de *P. lividus* en Méditerranée sont celles réalisées en Espagne aux Iles Medes (de 1991 à 2010) (Hereu et al. 2012) ; en France dans le parc national de Port-Cros (de 1982 à 2003) (Harmelin et al. 1995 ; Hereu et al. 2005) et dans les Bouches du Rhône (de 1994 à 2014) (Bachet et al. 2014).

IV. La ressource oursinière

1. Contexte économique

L'oursin comestible *Paracentrotus lividus* est très prisé par les français et pêché pour son corail ou roque. Ce produit de la mer a une haute valeur gustative, économique et traditionnelle.

La France est le deuxième consommateur mondial d'oursins, loin derrière le Japon. La production annuelle française d'oursins, essentiellement méditerranéenne et artisanale, est difficilement quantifiable, les débarquements n'étant pas systématiquement déclarés. La tendance générale est à une diminution forte des débarquements, et à titre indicatif, seulement 28 tonnes ont été débarquées en 2012 contre près de 470 tonnes en 1975 (donnée de débarquement FAO 2012). Par conséquent, la quasi-totalité des oursins consommés en France (*Paracentrotus lividus*, *Psammechinus miliaris*, *Sphaerechinus granularis*, *Strongylocentrotus sp*) est importée, essentiellement d'Espagne, d'Italie, de Grèce et du Chili (Guidetti et al. 2004 ; Boudouresque & Verlaque 2007).

De façon similaire, le Japon, premier consommateur d'oursins au monde avec environ 60 000 tonnes d'oursins consommés par an (frais ou transformés), est devenu le premier importateur mondial après l'effondrement de sa production à partir des années 70 (Andrew et al. 2002; Yokota 2002a). Depuis, de nombreux pays se sont lancés dans l'exploitation de leurs ressources oursinières.

2. États des lieux des stocks naturels mondiaux

Il est important de souligner que la provenance des oursins est essentiellement issue de la capture dans le milieu naturel, les méthodes d'aquaculture en milieux clos restant aujourd'hui marginales et balbutiantes.

Les principales pêcheries se trouvent au Chili, Japon, Maine, Colombie Britannique, Californie, Sud Corée, New Brunswich, Russie, Mexique, Alaska, Nouvelle Ecosse (Andrew et al. 2002) (Figure 13). Le pic de production mondiale a été atteint en 1995 avec environ 120 000 tonnes débarquée (Andrew et al. 2002 ; Williams 2002). Le Chili dominait alors la production mondiale en comptabilisant plus de la moitié des débarquements mondiaux. Au cours des années suivantes, la plupart des grandes pêcheries se sont effondrées mais la diminution de la production mondiale a été tempérée par l'augmentation de l'effort de pêche du Chili. Actuellement, le Chili connaît aussi un effondrement progressif de ses stocks.

L'analyse des données de débarquements disponibles (FAO 2012) met en évidence un effondrement global des stocks naturels d'oursins, et montre que ce phénomène touche toutes les aires de répartition, toutes les espèces exploitées et tous les pays producteurs, à l'exception des nouveaux pays producteurs qui commencent seulement à exploiter leurs

ressources (*i.e.* Russie et Mexique) et ceux qui engagent une exploitation durable de leurs ressources comme le Canada (Andrew et al. 2002 ; Bostford et al. 2004 ; FAO 2012).

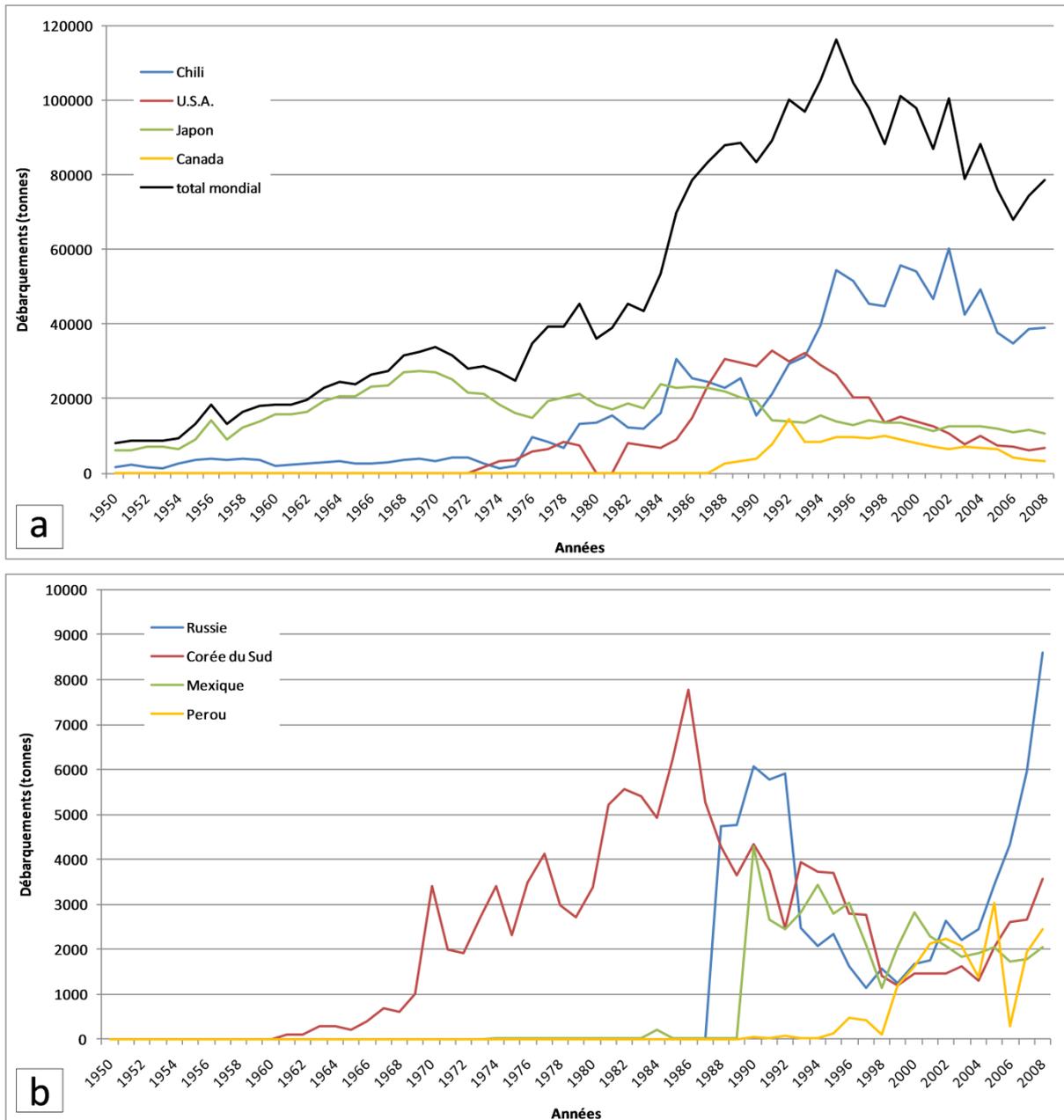


Figure 13 : Evolution des débarquements en oursins des principales pêcheries mondiales entre 1950 et 2008. a : débarquement des 4 plus grands pays producteurs (Chili, U.S.A., Japon et Canada) et total mondial des débarquements ; b : débarquement des autres principaux pays producteurs (Russie Corée du Sud, Mexique et Pérou). Remarque : l'axe des abscisses n'est pas à la même échelle entre les 2 graphiques (Données FAO, 2012).

Au niveau européen, la production déclarée correspond pour la quasi-totalité à la production espagnole depuis que les deux principaux producteurs historiques, La France et l'Irlande, ont vu leurs stocks s'effondrer.

3. Gestion de la ressource

Il ressort de l'historique des débarquements de tous les grands pays producteurs d'oursins que pendant la période d'expansion de l'activité de pêche, si cette activité n'est pas gérée, elle conduit inévitablement à un effondrement des débarquements par épuisement des stocks après seulement 5 à 10 ans d'exploitation de la ressource (Bostford et al. 2004). Bien souvent des mesures de gestion sont mises en place lorsque les stocks sont déjà affaiblis et elles s'avèrent insuffisantes pour endiguer l'effet Allee qui affecte la dynamique des populations ciblées (Andrew et al. 2002 ; Bostford et al. 2004).

a. Les principaux outils de gestion

Taille limite minimale légale de capture

La limite de taille minimum réglementaire de capture est un des outils de gestion les plus appliqués pour la ressource oursinière. Pourtant, de par la biologie de l'oursin (la fécondité est principalement dépendante de l'âge et la taille) et l'effet de densité dépendance au niveau du succès de reproduction, du recrutement et de la survie larvaire, cet outil semble inefficace voire contre-productif lorsqu'il n'est pas couplé à des quotas de pêche. D'ailleurs, des tailles « limite supérieure » existent mais ne sont pas souvent appliquées.

Période légale de capture

Avec la taille minimale, la période légale de capture est une des réglementations de pêche aux oursins la plus courante, mais elle ne limite pas les quantités d'oursins prélevées.

Accès limité à la pêche

Une façon de réguler le prélèvement est de contrôler et ajuster le nombre de licences de pêche. C'est le cas par exemple au New Brunswick, en Californie ou en Colombie Britannique. Un des systèmes de gestion des licences le plus élaboré est celui de Nova

Scotia. L'agence de gestion de la ressource délivre des licences de pêche dont certaines (TURFs : Territorial Use Rights Fisheries) sont exclusives à des zones. Le détenteur de la licence est le seul à avoir le droit de pêcher sur cette zone et en contrepartie il doit en connaître et gérer le stock d'oursins et rendre des comptes à une agence de gestion de la ressource (Bostford et al. 2004). D'autres pays comme le Chili utilisent le système des TURFs.

Les quotas

Les quotas ou TAC (Total Allowable Capture) peuvent être un moyen efficace pour ne pas dépasser les points de références limites au-delà desquels les populations risquent de s'effondrer. Les quotas doivent être calculés à une échelle spatiale pertinente grâce à des modèles de gestion des ressources halieutiques tenant compte de la biologie et de la dynamique des populations de l'espèce cible ainsi que des connaissances actualisées de l'état des stocks. L'estimation de l'état des stocks se fait le plus souvent par estimation de la biomasse en plongées sous-marine. Cette méthode de gestion est actuellement appliquée au Canada dans les provinces du New Brunswick et de Nova Scotia pour l'oursin vert, en Colombie Britannique pour l'oursin rouge ou en Alaska pour les deux espèces (Andrew et al. 2002 ; Williams 2002).

Aires marines protégées

Les aires protégées (AP) sont définies en tant qu' « espaces géographiques clairement définis, reconnus, consacrés à une activité précise et gérés par le biais de moyens légaux ou autres, pour assurer la conservation de la nature à long-terme ainsi que les valeurs écosystémiques et culturelles qui lui sont associées » (Dudley 2008). Il a été montré que les aires marines protégées (AMP) peuvent avoir un rôle dans la gestion de la ressource oursinière. En zone non pêchée, les densités d'oursins ne sont pas forcément très élevées car elles peuvent être limitées par leur prédateurs qui bénéficiant eux aussi du statut de protection se retrouvent en plus grande abondance et de plus grande taille (Ceccherelli et al. 2011). Par contre, on retrouve dans les réserves ou zones non pêchées une structuration démographique des populations différente des zones pêchées avec des fréquences d'individus de grande taille plus élevées et par conséquent plus féconds. Certaines AMP pourraient jouer un rôle de maintien de populations sources approvisionnant d'autres sites comme cela a déjà été montré pour de nombreuses espèces de poissons.

Rotation spatiale de prélèvement (cantonnement)

L'état de Washington possède la seule pêcherie d'oursin à avoir établi une rotation spatiale de prélèvement. En complément, la pêche est réglementée sur la base de taille limite et de quotas annuels. Ce système de rotation spatiale de prélèvement a permis d'améliorer légèrement les prélèvements moyens annuels.

b. Gestion des grandes pêcheries, notion d'échelle

Il est délicat de comparer les politiques de gestion des grand pays producteurs d'oursins car chaque pêcherie, localité, espèces ciblées, ont des caractéristiques propres. Lorsqu'on étudie l'évolution des débarquements d'un pays, il peut y avoir de fortes disparités entre les régions. Une région peut être en cours d'épuisement alors qu'une autre commence à être exploitée. C'est le cas des pêcheries de Californie dont les captures ont rapidement augmentées à la fin des années 1980 avec la demande du marché japonais. Le pic d'exploitation est survenu peu de temps après, en 1988, et les stocks ont rapidement été surexploités. Si l'on regarde les courbes de données de débarquements globaux de l'Etat, celles-ci ne révèlent pas à première vue un effondrement des stocks. Or localement, lorsqu'un stock décline, l'activité de pêche se déplace vers un stock inexploité (Andrew et al. 2002) Le même phénomène s'opère pour les pêcheries du Chili, du Mexique ou du Japon. Des données de débarquements stables peuvent en réalité masquer un épuisement successif des stocks (Williams 2002).

La Californie où la pêche n'est pas gérée au niveau local mais de façon globale est un exemple d'échec de gestion. La législation est établie par des institutions composées de représentants de l'industrie de la pêche, et appliquée à l'échelle de l'état. Dans les années 1970 la politique des pêches incitait à la diminution des densités d'oursins pour augmenter l'abondance des forêts de kelps et améliorer la qualité des gonades d'oursins. A la fin des années 1980, beaucoup de licences de pêche ont été délivrées. Au début des années 1990, les captures ont décliné malgré l'augmentation du nombre de pêcheurs, et donc de l'effort de pêche. Les mesures de gestion mises en place pour contrecarrer cette tendance ont été insuffisantes. Il est impossible de prédire la résilience des stocks qui ont été fortement pêchés, surtout en l'absence de contrôle effectif des captures.

Au Chili, le pic de production a été atteint en 1995 et aujourd'hui les stocks sont en déclin. Les mesures de gestions prises au niveau national, telles que les tailles minimales de capture ou les registres des pêches n'ont eu aucun effet sur la régulation des captures. De plus, aucune évaluation des conséquences écologique du prélèvement massif des oursins n'est effectuée (Andrew et al. 2002). Compte tenu des spécificités locales, les moyens de gestions ne sont pas toujours généralisables à l'ensemble d'un pays. La notion d'échelle spatiale de gestion revêt donc une importance toute particulière et les moyens mis en place doivent être en adéquation avec le contexte local. Malgré l'échec de la politique de gestion nationale, certaines régions chiliennes gèrent localement et efficacement leurs pêcheries par un système de « Caleta » (semblable aux systèmes prud'homaux français) dans lesquelles les pêcheurs sont associés aux systèmes de gestion. Les pêcheurs estiment leur stock de pêche pour les 6 mois à venir, puis les autorités locales fixent un quota à respecter.

De même, en Nouvelle Ecosse (Canada), un système de gestion à très petite échelle a été instauré. Des licences uniques par parcelle côtière donnent à leur possesseur l'exclusivité de pêche. Le pêcheur est aussi associé au système de gestion qui doit évaluer le stock ainsi que les forêts de kelps qui y sont associé pour conserver un rendement optimal.

Un système de gestion similaire est appliqué dans certaines préfectures au Japon et semble efficace. Pendant de nombreuses années, le Japon a jonglé avec l'exploitation des stocks des différentes espèces et régions de pêche mais la surexploitation a conduit à une tendance générale de diminution des stocks de chacune d'entre elles depuis 1970. Pour contrer cette tendance, le Japon s'est doté du système de gestion des pêcheries d'oursins le plus élaboré du monde. Le système de gestion comprend plusieurs niveaux hiérarchiques. Au niveau local, les pêcheurs sont regroupés en coopératives (Fisheries Co-operative Association) semblables au système des prud'homies de pêche. Il s'agit d'un mode de gestion traditionnel. Les coopératives décident des droits de pêche individuels, des territoires de pêche, des limites de capture journalières, du temps de pêche et des heures d'autorisation de pêcher. Au niveau supérieur, les préfectures ont en charge la police de la pêche, l'élaboration des plans de gestion de la ressource, déterminent les tailles de capture, les zones de cantonnements, les saisons de pêche. Les préfectures sont chargées d'adapter et d'adopter ces mesures dans chaque coopérative. En complément, le gouvernement est doté d'une commission gouvernementale, la « Sea Area Fisheries Adjustment Commission »

(SAFAC), qui a pour responsabilité la coordination de gestion entre les coopératives. Le gouvernement japonais a modernisé son système de gestion de la pêche tout en conservant le système traditionnel.

Depuis 1974, le Japon pratique le réensemencement pour la conservation et la reconstitution des stocks. Il a investi dans le développement des infrastructures, notamment dans des écloseries. (Andrew et al. 2002). Même si le système de gestion actuel ne permet pas d'endiguer le déclin de tous les stocks ou leur exploitation durable, le déclin de la ressource au Japon est toutefois plus lent que dans la plupart des autres pays producteurs.

Sur la côte Atlantique espagnole la pêche aux oursins commerciale s'est développée dans les années 1960. En Galice, cette pêche fait l'objet d'un système de management complexe. A partir de 1986, les mesures de régulation de pêche incluent une taille minimale de capture (55mm), une période de fermeture de la pêche (mai à septembre), une limite de capture journalière, des horaires journaliers d'autorisation de capture, et une profondeur limite (12m), et des licences de pêche. Depuis 1993, des mesures de gestion complémentaires ont été instaurées avec un co-management entre les autorités de pêche et les confrarías (similaires aux prud'homies des côtes méditerranéennes françaises). Chaque année et pour chaque confrarías, un plan de gestion et d'exploitation est présenté par les confrarías et validé par des biologistes des autorités des pêches. Les stocks ont connu une période de régression due à la surexploitation avant la mise en place des mesures de gestion en 1986 (Fernández-Boán et al. 2012). La pêche est autorisée seulement dans des zones limitées et la FA (fishing authority) refuse les extensions de zones de pêche réclamées par les pêcheurs. Les pêcheurs pratiquent la transplantation d'oursins pour optimiser la qualité des gonades et repeupler des sites surexploités. Le système de quota journalier est une mesure de gestion essentielle dans ce contexte, car il permet d'établir la capture par unité d'effort (CPUE) efficace, bien que cette mesure à elle seule ne limite pas l'effort de pêche. Il importe de mettre en évidence la nécessité d'adapter l'effort de pêche à la disponibilité de la ressource dans un contexte de variabilité spatio-temporelle des abondances d'oursins. Les auteurs (Catoira 2004 ; Fernández-Boán et al. 2012). préconisent une gestion à très petite échelle spatiale pour prendre en compte la spécificité de la dynamique des populations dans des unités de stocks fonctionnels à des échelles de 10 à 100 m. Cet outil spécifique de gestion spatiale de la ressource est le mécanisme de régulation de l'effort de pêche qui a le

meilleur potentiel de bénéfices (Andrew et al. 2002). Il est nécessaire que les pêcheurs jouent un rôle actif dans la gestion de la ressource qu'ils exploitent. La coopération entre les pêcheurs et les autorités de pêche est importante dans la mise en place de plans de gestion localisés de la ressource (Fernández-Boán et al. 2012).

4. Bilan

Il ressort de cette analyse que la plupart des pêcheries est surexploitée et en déclin. De nombreux pays (Canada, Etats-Unis, Chili) ont développés rapidement leurs pêcheries à une échelle industrielle en réponse à la forte demande de la part du Japon. Un schéma assez général d'exploitation de la ressource se dessine dans la plupart des cas : au cours des premières années d'exploitation, pas ou peu de mesures de gestion sont mises en place pour prévenir une surexploitation. Il en découle après quelques années une diminution des captures résultant de la diminution des stocks. Les mesures de gestion sont toujours prises une fois que les dégâts sur la ressource sont déjà avérés et important. Ces mesures sont mises en place pour tenter d'endiguer un déclin de la ressource tout en maintenant une activité de pêche (Andrew et al. 2002). Globalement, pendant de nombreuses années, les débarquements ont augmenté malgré les lacunes sur la biologie des populations et le manque d'une gestion rigoureuse des pêcheries, entraînant une baisse globale des populations (Micael et al. 2009). Actuellement, les débarquements mondiaux sont toujours à la baisse, mais en partie dû au mesures de gestions appliquées dans certaines grandes pêcheries pour limiter le déclin des stocks (Williams 2002).

Il est avéré que la surpêche est un facteur impactant les populations d'oursins à travers le monde ; c'est le cas Méditerranée pour l'espèce *P. lividus* (Régis 1987 ; Régis 1989 ; Andrew et al. 2002 ; Guidetti et al. 2004 ; Gianguzza et al. 2006 ; Pais et al. 2007 ; Ceccherelli et al. 2011). En effet, la ressource en oursin *Paracentrotus lividus* des côtes méditerranéennes françaises connaît un scénario similaire aux autres grands pays producteurs, avec un fort développement de l'activité de pêche entre les années 1950 et 1970, suivi d'un déclin des stocks. Les mesures de gestion de la ressource n'ont été prises que tardivement et la stratégie de gestion n'a pas permis d'endiguer l'effondrement des stocks (Williams 2002).

V. Le réensemencement

1. Historique

Le réapprovisionnement de stocks marins n'est pas un concept nouveau. Des techniques ont été développées depuis le milieu du 19^{ème} siècle et couramment pratiquées au cours du 20^{ème} siècle. Au début, il s'agissait principalement de lâcher des œufs ou des larves de poissons et de crustacés (surtout de homards). Ces programmes se sont avérés inefficaces et ont été abandonnés au milieu du 20^{ème} siècle. Avec le développement des techniques aquacoles, la production de juvéniles pour des lâchers en milieu marin s'est développée dans les années 1970, principalement au Japon. A partir des années 1990, ces techniques se sont développées dans de nombreux autres pays (Bell et al. 2008). Malgré les contrôles de l'effort de pêche, les mesures de protection et de restauration des habitats, les programmes d'enrichissement des stocks naturels par des lâchers de juvéniles provenant d'écloseries reste à ce jour un sujet d'intérêt pour les chercheurs et les gestionnaires. Il s'agit actuellement de l'un des trois principaux outils utilisé pour maintenir ou améliorer les stocks de pêche (Lorenzen et al. 2013).

Deux points de blocage majeurs ont limité le développement d'opérations de réensemencements du milieu marin : d'une part l'incapacité d'évaluer le succès des lâchers et d'autre part des verrous zootechniques pour la production de juvéniles (Blankenship & Leber 1995).

Les premières expérimentations de production de juvéniles d'oursins pour l'ensemencement de zones de pêche furent menées au Japon dans la préfecture de Iwate en 1983 pour les espèces *Strongylocentrotus nudus* et *Strongylocentrotus intermedius*. Des opérations d'implantation de juvéniles d'oursins de (10-15 mm de diamètre) sont périodiquement effectuées dans des zones limitées de pêche. Les individus lâchés sont ensuite récoltés deux à trois ans plus tard. La densité d'oursins lâchés est calculée en fonction de la productivité des fermes aquacoles, des peuplements algaux, et du contrôle des populations de prédateurs (Yokota 2002).

2. Objectifs et prérequis pour le développement d'opérations de lâchers de juvéniles

Les lâchers d'individus provenant de l'aquaculture peuvent être réalisés pour des objectifs de conservation d'espèces en danger ou comme outil de gestion de ressources halieutiques (Bell et al. 2008). Il est important de bien définir les objectifs de ces programmes pour adopter des méthodes de gestions adaptées et efficaces. Les trois principaux objectifs sont le repeuplement, l'entretien démographique des stocks et l'élevage en mer.

Le repeuplement consiste à lâcher des juvéniles d'élevage dans une population sauvage dans le but de restaurer le stock des individus reproducteurs lorsqu'il a été gravement appauvri, pour le ramener à un niveau où il peut à nouveau offrir un rendement substantiel et régulier. Ce type d'action peut être engagé dans le cadre de la gestion des pêches ou de programmes de restauration écologique pour rétablir une espèce en danger, menacée ou localement éteinte en raison de la surpêche (Bell et al. 2008).

L'entretien démographique des stocks : Il s'agit de lâcher des juvéniles d'élevage dans la population sauvage afin de compléter le recrutement naturel lorsque celui-ci est limité et inférieur à la capacité de charge du milieu (Bell et al. 2008). L'objectif est d'améliorer localement le rendement d'exploitation d'une ressource.

Elevage en mer : il s'agit de lâcher des juvéniles issus d'écloserie en milieu marin ouvert et de les prélever lorsqu'ils ont atteint une taille commercialisable. Ces pratiques se rapprochent plus de l'élevage que de méthodes de gestion et conservation des ressources.

Les investissements dans le repeuplement et l'amélioration des stocks ne doivent être entrepris que s'ils sont susceptibles d'ajouter de la valeur à d'autres formes de gestion, à la fois sur les plans biologique, économique et social (Bartley & Bell 2008; Bell et al. 2008). Le retour d'expérience des nombreux programmes de lâchers réalisés dans différents pays a permis d'identifier des étapes clés de planification de telles opérations pour déterminer *a priori* la faisabilité et les bénéfices. Il s'agit principalement d'engager les parties prenantes (pêcheurs, gestionnaires et autres usagers) et d'identifier la nature de leurs interactions, comprendre le système de pêche en place et définir des objectifs de développement de l'activité de pêche. Il faut ensuite initier des études de suivi de la ressource. Il est recommandé d'utiliser une méthode quantitative pour évaluer l'efficacité des lâchers ainsi que leur impact éventuel sur la dynamique de la population naturelle, afin de pouvoir

comparer les avantages et inconvénients par rapport à d'autres méthodes de gestion alternatives (Bell et al. 2008).

3. Risques et préconisations

Les opérations de réensemencement ou de réapprovisionnement des stocks naturels sont des méthodes très controversées dans la communauté scientifique. Ces méthodes comportent un certain nombre de risques à prendre en considération et de précautions à respecter. L'un des principaux risques est d'engendrer des perturbations de la diversité génétique des populations sauvages (Hara et al. 2008). Cela s'est déjà produit au Japon pour des programmes de lâchers de juvéniles d'oursins de l'espèce *Strongylocentrotus intermedius*. Un nombre insuffisant de géniteurs avait été utilisé, ce qui a provoqué une diminution de la diversité génétique à la fois des populations issus de cultures mais aussi des populations sauvages (Yokota 2002). Depuis, des recommandations pour la production d'organismes marins pour les lâchers ont été publiées (Blankenship & Leber 1995 ; Lorenzen et al. 2010). Elles concernent notamment le nombre de géniteurs à utiliser ainsi que leur provenance en fonction du lieu du lâcher. Il est aussi important d'identifier les zones de nurserie et d'évaluer leur capacité de charge pour ne pas créer de surcharge en juvéniles, ce qui limiterait leur survie, ainsi que d'évaluer l'impact de la prédation.

Beaucoup de programmes d'ensemencements se sont focalisés sur le développement d'outils technologiques pour la production de juvéniles, mais peu ont permis d'en évaluer quantitativement les résultats. Il est maintenant nécessaire de développer des approches multidisciplinaires comprenant des études de la dynamique des populations des stocks sauvages, les interactions entre le stock et son environnement, la disponibilité de l'habitat, des études génétiques des populations sauvages et lâchées et de l'intégration de ces programmes dans des plans de gestion des pêches appropriés (Le Vay et al. 2007).

CHAPITRE 2. CARACTERISATION DE L'ETAT ET DE L'EVOLUTION DES STOCKS D'OURSINS DE L'AIRE TOULONNAISE

Article :

Couvray S. et al. 2014. Monitoring of population densities of the exploited edible sea urchin *Paracentrotus lividus* in the area of Toulon agglomeration (Mediterranean French coast): implications for resource management. PLOSOne (soumis: PONE-D-14-44826).

Rapports :

COUVRAY S. et al. (2013). Suivi des populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* dans l'aire toulonnaise – Campagnes de 2013. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 22 pp.

COUVRAY S., ROUANET E., COUPÉ S., BONNEFONT J.-L., GRILLASCA J.-P., MARTIN Y. (2011). Mise en place d'un suivi des populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* dans l'aire toulonnaise – Campagne d'Avril 2011. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 22 pp.

I. Introduction

Nous avons montré en introduction la tendance mondiale au déclin démographique des stocks d'oursins exploités. Dans ce chapitre nous présentons l'évolution historique des débarquements d'oursins *P. lividus* sur les façades maritimes françaises, qui met en perspective la nécessité de suivre l'évolution des stocks de pêche sur notre territoire.

1. Etats des lieux des stocks naturels français

Les deux principales zones de production sont les côtes atlantiques bretonnes et les côtes méditerranéennes (figure 14). Sur le littoral atlantique breton, la ressource a été épuisée au début des années 1970 et les niveaux enregistrés de débarquements depuis cette date montrent que malgré l'arrêt de la pêche sur cette zone, les stocks naturels ne se reconstituent plus.

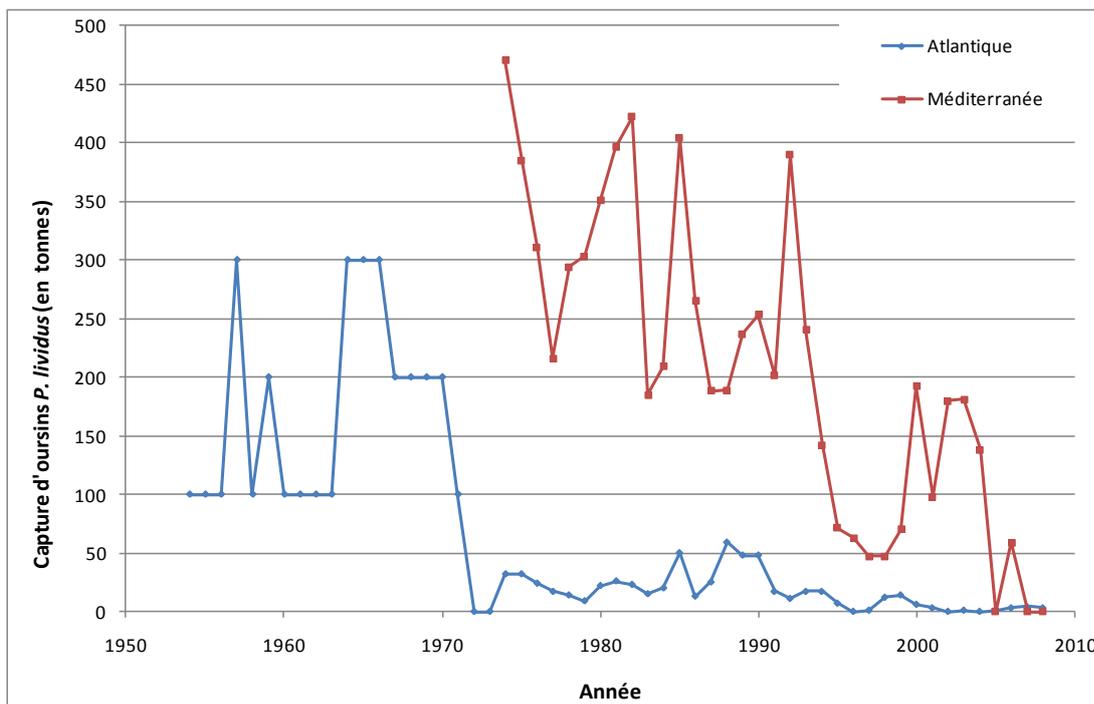


Figure 14 : Evolution des débarquements déclarés de *P. lividus* sur les côtes françaises atlantiques et méditerranéennes.

Sur les côtes méditerranéennes, malgré les mesures réglementant la pêche aux oursins mises en place dans les années 1980, l'effondrement des débarquements suit la

même tendance que celle observée sur les côtes atlantiques et s'accélère (Andrew et al. 2002; Williams 2002; FAO 2014).

2. Effet de la pêche sur les populations de *P. lividus*

L'impact négatif de la pêche sur les populations est largement décrit depuis le début des années 1970 en observant que les quantités débarquées par les pêcheurs professionnels étaient en constante diminution malgré la forte demande des consommateurs (Allain 1975; Régis et al. 1985; Régis 1989).

De nombreuses études montrent que les captures par les pêches professionnelles et récréatives ainsi que par le braconnage, jouent un rôle primordial dans la diminution démographique observée (Guidetti et al. 2004 ; Gianguzza et al. 2006). Ainsi, en Italie, Pais et al. (2007) réclament la nécessité de réguler les prélèvements de *P. lividus* dans le Nord-ouest de la Sardaigne. Plus récemment, Ceccherelli et al. (2011) montrent que la pêche affecte significativement la structuration des communautés, en diminuant la proportion d'individus supérieurs à 50 mm, taille commercialisable. Globalement, dans les zones pêchées, les tailles moyennes ainsi que les biomasses de *P. lividus* sont significativement plus faibles qu'en zones non-pêchées (Guidetti et al. 2004).

Le long des côtes méditerranéennes françaises, les mêmes observations ont été faites dans les Bouches-du-Rhône dans les années 70 à 80 (Régis et al. 1985 ; Régis 1989). Plus récemment, les études réalisées sur les communautés d'oursins de la Côte Bleue ont mis en évidence la raréfaction de la ressource et les problèmes d'exploitation qui en découlent (Bachet et al. 2014).

La pêche a donc un effet indéniable sur les communautés d'oursins qui s'ajoute aux fluctuations naturelles induites principalement par des épisodes de mortalité des adultes à large échelle ainsi que des échecs de recrutement dans les cohortes (Barnes & Crook 2001). Enfin, la surpêche a aussi des répercussions indirectes par effet cascade sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble (Micael et al. 2009).

3. Mesure de gestion et réglementation actuelle.

Après l'effondrement des stocks de pêche sur la côte Atlantique, et plus particulièrement en Bretagne dans les années 1960, plusieurs mesures de gestion ont été

prises pour limiter l'effet de la pêche telles que l'interdiction de pêche au faubert, l'instauration d'une taille minimale de capture (Andrew et al. 2002 ; Williams 2002). Ces mesures n'ont pas empêché l'effondrement et la perte de rentabilité des stocks et la diminution consécutive du nombre de pêcheurs (Allain 1975).

Dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur, la réglementation actuelle (arrêté 1112 du 27 octobre 2008) fixe les dates de pêche des oursins et les quotas dans les départements des Bouches du Rhône, du Var et Alpes Maritimes. Pour ces trois départements, l'interdiction de pêche aux oursins du 16 avril au 31 octobre concerne les pêcheurs professionnels et la pêche récréative. Les pêcheurs de loisirs sont soumis à des quotas de pêche. En pêche sous-marine (apnée seulement) ou en pêche à pied, les captures sont limitées à 4 douzaines d'oursins par pêcheur et par jour. Pour la pêche à partir d'un navire de plaisance, les captures sont limitées à 4 douzaines d'oursins par pêcheur et par jour, avec un maximum de 10 douzaines d'oursins par navire et par jour au-delà de deux personnes embarquées. L'activité de pêche professionnelle est pratiquée exclusivement en apnée, sauf dans le département des Bouches du Rhône où une dérogation permet aux pêcheurs professionnels de pratiquer cette activité en scaphandre autonome.

4. Caractérisation des populations d'oursins comestibles *P. lividus* de l'agglomération de Toulon et mise en place d'un suivi des stocks à long terme.

Aujourd'hui, les seuls suivis scientifiques des communautés d'oursins dans la région PACA sont ceux réalisés au sein des quartiers maritimes de Marseille et de Martigues (zone exploitée) par le Parc Marin de la Côte Bleue qui réalise un suivi semestriel des densités d'oursins depuis 1994 (Bachet et al. 2014), et au sein du parc national de Port-Cros de 1982 jusqu'en 2003 (Harmelin et al. 1995; Hereu et al. 2005).

Dans la région toulonnaise, il n'y a pas de suivi alors que la ressource oursinière est fortement exploitée. Ce sont les pêcheurs eux-mêmes qui de manière empirique observent la diminution démographique importante de la ressource et alertent régulièrement les autorités. Leurs observations, très cohérentes et en phase avec celles de Bachet *et al.* depuis 1994, soulèvent des inquiétudes légitimes, d'autant plus qu'il existe déjà des mesures de gestion.

Dans le cadre du projet de thèse, nous avons mis en place un suivi démographique de huit peuplements d'oursins le long du littoral de l'aire Toulonnaise (Toulon Provence Méditerranée – TPM), répartis sur 218 km de trait de côte. L'objectif initial était d'évaluer la densité des peuplements et leur sensibilité aux prélèvements liés à la pêche professionnelle ou récréative. A plus long terme, le suivi permettra de mieux évaluer les parts relatives des phénomènes naturels et ceux d'origines anthropiques qui influencent la démographie des populations, et permettra de vérifier le bénéfice des actions de gestion et de conservation de la ressource.

La mise en place du suivi est le premier dans le Var qui s'intéresse à une zone pêchée et anthropisée. Il a été conçu en tenant compte du comportement particulier de *P. lividus* dont le comportement agrégatif rend l'évaluation des stocks complexe. En effet, les densités fluctuent fortement dans l'espace et dans le temps (Turon et al. 1995). Il est donc difficile de statuer sur l'état d'un stock d'une aire géographique définie à un instant donné. Seuls des suivis à long terme, répétés tous les ans à la même saison, permettront d'apprécier l'évolution de ces populations en des sites précis (Boudouresque et al. 1989; Hereu 2005).

Nous avons choisi de mettre en place un protocole standardisé permettant de réaliser des comptages rapides et suffisamment précis pour faciliter le suivi bisannuel des peuplements d'oursins et obtenir des résultats statistiquement comparables à ceux des suivis réalisés par Bachet *et al.* afin d'apprécier l'évolution de ces peuplements à une plus grande échelle. Ce protocole permet en outre d'évaluer la variabilité saisonnière des densités grâce à des comptages réalisés au printemps à la fin de la période légale de pêche et à l'automne au début de la période de pêche.

Au cours de cette étude, nous avons aussi mesuré les densités de l'oursin noir *Arbacia Lixula*, espèce d'échinoderme thermophile commune des petits fonds rocheux méditerranéens. La survie larvaire ainsi que le recrutement pour cette espèce est favorisée par l'élévation de la température de l'eau (Privitera et al. 2011). Cette espèce a connu dans les années 1960 et 1990 des augmentations d'abondances, attribuées à des épisodes chauds ou au réchauffement climatique (Francour et al. 1994; Boudouresque & Verlaque 2007), et est actuellement en expansion le long des côtes méditerranéennes française à des endroits où elle n'était pas ou peu présente à la fin du 19^{ème} siècle (Boudouresque et al. 1989). Contrairement à *P. lividus*, *A. lixula* n'a pas de valeur marchande et n'est donc pas prélevé.

L'interaction et notamment la compétition interspécifique entre ces deux espèces n'est pas clairement définie dans la littérature (Guidetti et al. 2004; Vielmini et al. 2005; Gianguzza et al. 2006). Dans les petits fonds rocheux, *A. lixula* peut renforcer l'action du broutage de *P. lividus* sur les communautés macrophytiques et contribuer au maintien de stade barren (Ruitton et al. 2000).

Ce chapitre présente les huit sites suivis de l'aire toulonnaise, dont cinq d'entre eux ont fait l'objet d'opérations de lâchers en 2010 et 2011 (cf. chapitre 3), ainsi qu'un site complémentaire (Podestat) localisé dans le Parc National des Calanques de Marseille. La méthodologie mise en place est détaillée ainsi que les résultats de trois années de comptages (2011 à 2013) représentant six saisons d'échantillonnages.

III. Matériels et méthodes

1. Zone et sites d'étude

L'étude a été conduite sur les côtes méditerranéennes françaises, sur huit sites de l'agglomération de Toulon, entre Six-Fours-les-Plages et Carqueiranne (Figure 15). Rayolet, Petit Rousseau, Rix et Bomasse sont situés sur la commune de Six-Fours-les-Plages, Sicié sur la commune de la Seyne-sur-mer, Coudoulière sur la commune de Saint-Mandrier, Oursinières sur la commune du Pradet, et Baux Rouges sur la commune de Carqueiranne.

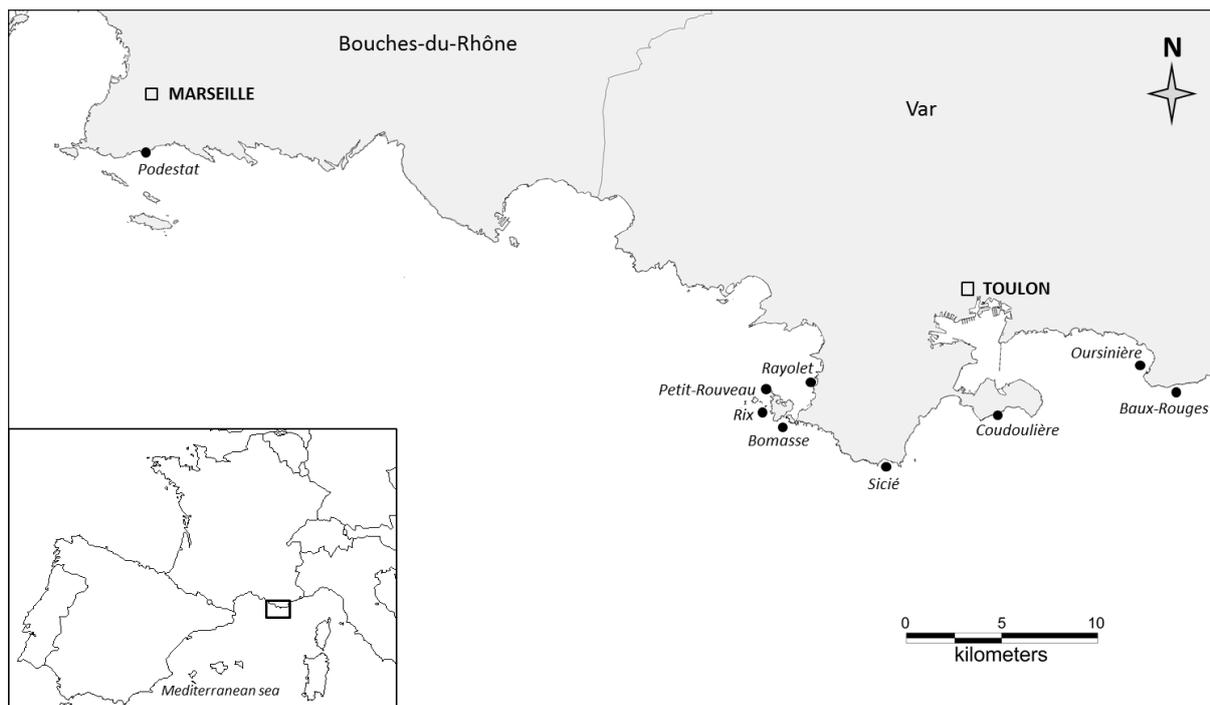


Figure 15 : Sites d'études pour l'ensemencement de juvéniles et le suivi des densités de *Paracentrotus lividus* (© D. Kirchhofer).

a. Choix des sites

Les sites du Rayolet, des Oursinières et des Baux-Rouges ont été choisis d'après les indications des pêcheurs professionnels qui ont constaté un dépeuplement au cours de ces dernières années. Les sites Petit Rouveau, Rix, Bomasse et Coudoulière sont plus ou moins sujets à la pêche professionnelle et récréative. Le site Sicié est situé au droit de l'émissaire de la station d'épuration d'AMPHITRIA dont la capacité de charge est de 550 000 équivalent habitants. Ce site a été choisi car il est soumis à un stress environnemental induit par la pollution d'origine urbaine (principalement un enrichissement en matière organique) et où la pêche sous-marine est interdite à cause des risques sanitaires (Arrêté n°0412 du 28 avril 2008, portant réglementation particulière de la pêche sous-marine sur le littoral de Méditerranée continentale). Un site complémentaire, Podestat, comportant des similitudes avec le site Sicié, a aussi fait l'objet de ce suivi à partir du printemps 2012. Podestat est une petite calanque situé au cœur du parc national des Calanques de Marseille, proche de l'émissaire de Cortiou, rejetant les eaux usées traitées par la station d'épuration de Marseille d'une capacité de charge de 1800000 équivalents habitants. Sur ce site, les communautés

d'oursins et l'écosystème associé ont régulièrement été étudié au cours des 50 dernières années (Harmelin et al. 1981; Delmas & Régis 1984; Delmas 1992)

Pour chaque site, les recensements d'oursins ont été conduits sur trois transects.

b. Caractérisation des sites

Rayolet : Ce site est très hétérogène, caractérisé par des herbiers de posidonie, des roches, des dalles rocheuses recouvertes d'algues photophiles, quelques zones de graviers et des taches de sable. Dans les criques, entre 0,5 m et 2 m de profondeur, les fonds sont majoritairement constitués de blocs rocheux de petite taille recouverts d'algues photophiles. Leurs tailles et leurs formes sont propices pour servir de cachettes aux petits oursins. La zone rocheuse ainsi que l'herbier de posidonie forment une bande assez étroite entre le rivage un fond sableux qui apparaît à partir de 4 m de profondeur. Ce site est principalement exposé au Mistral (figure 16).

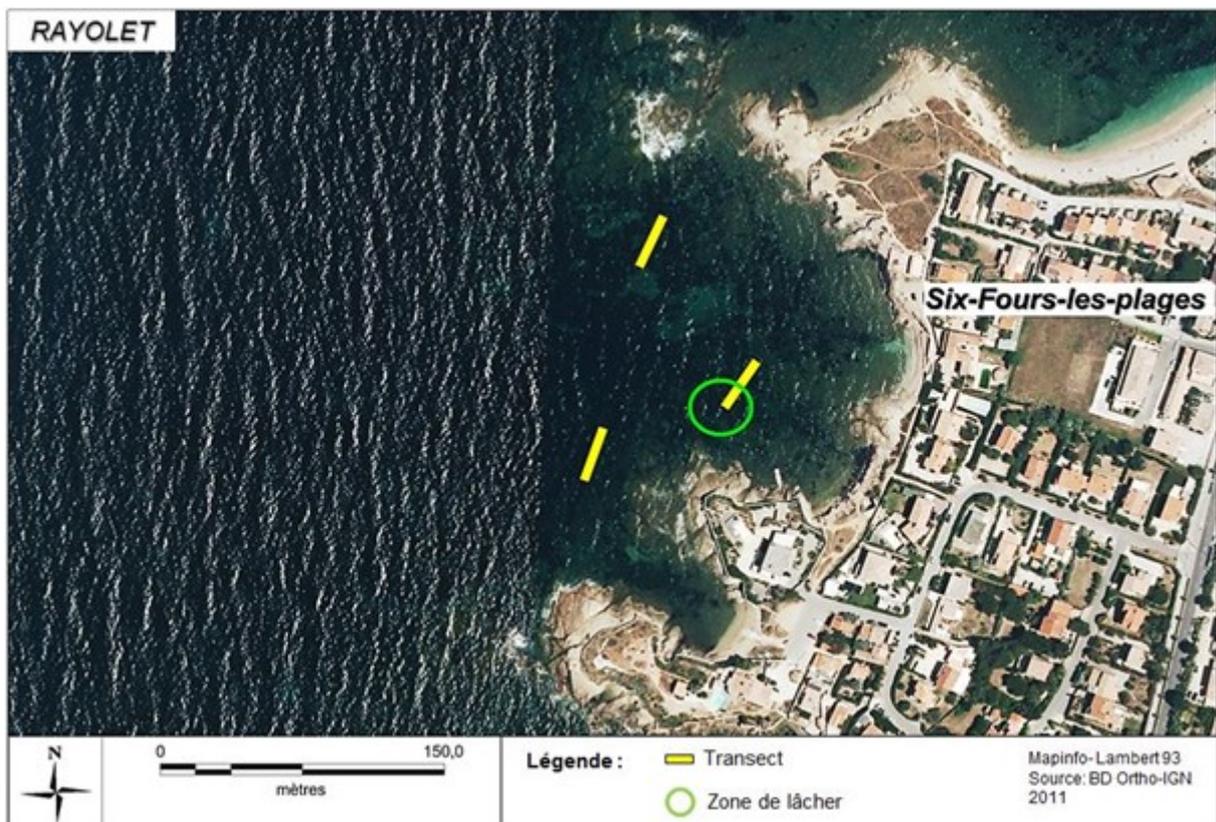


Figure 16 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de Rayolet.

Petit Rouveau : Le site est composé de plusieurs zones distinctes. Une zone peu profonde (0,5 m à 1,5 m) constituée majoritairement de blocs rocheux et de taches d'herbier de posidonie formant une passe entre l'île du Petit Rouveau et l'île des Embiez. De part et d'autre s'étend une large zone en pente douce majoritairement recouverte d'herbiers denses de posidonie et quelques tâches de sable. Ce site est principalement exposé au Mistral (figure 17).

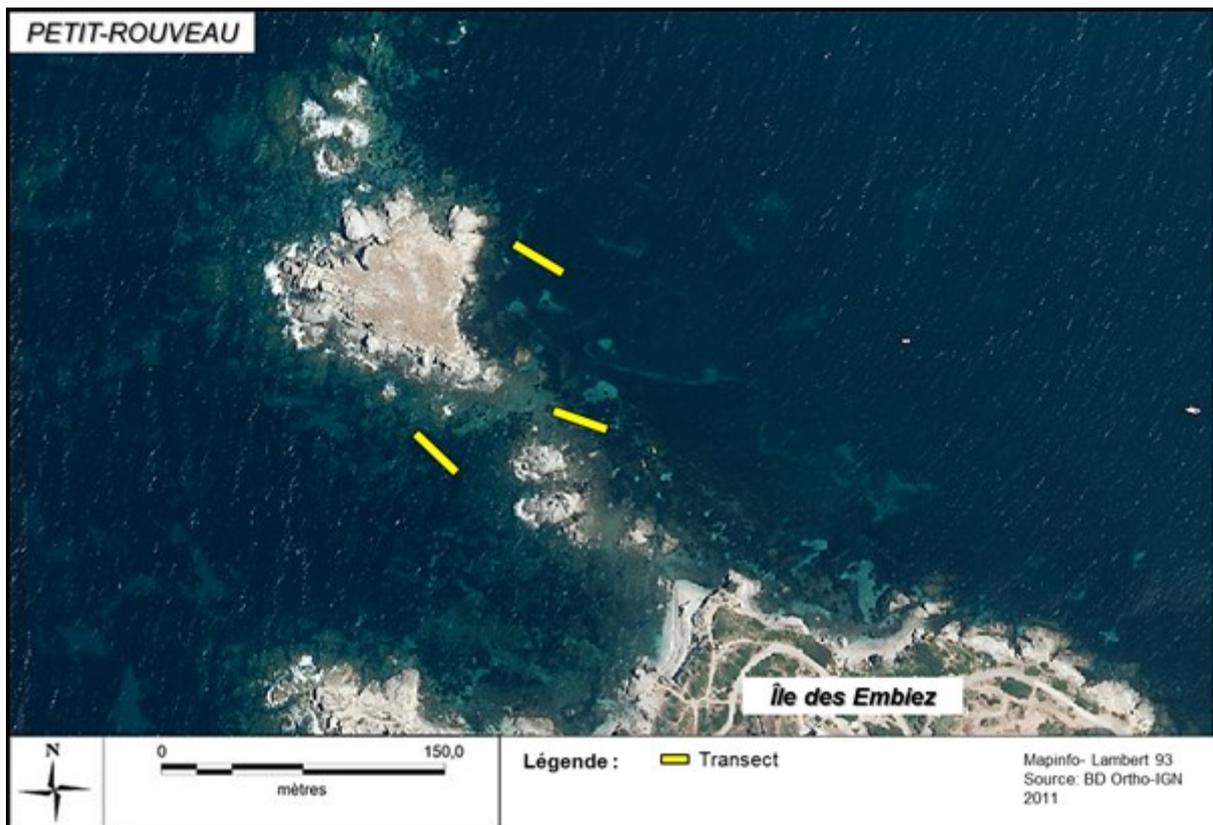


Figure 17 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site du Petit Rouveau.

Rix : Le site très hétérogène est caractérisé principalement par un faciès de roches à algues photophiles (gros blocs, gros galets, présence de tombants, dalles et éboulis rocheux), mais aussi de petites zones de graviers, et d'herbiers de posidonie clairsemés. A partir de 6 m de profondeur, les zones rocheuses sont remplacées par un herbier de posidonie dense avec quelques tâches de sable. Le site est principalement exposé au Mistral (figure 18).

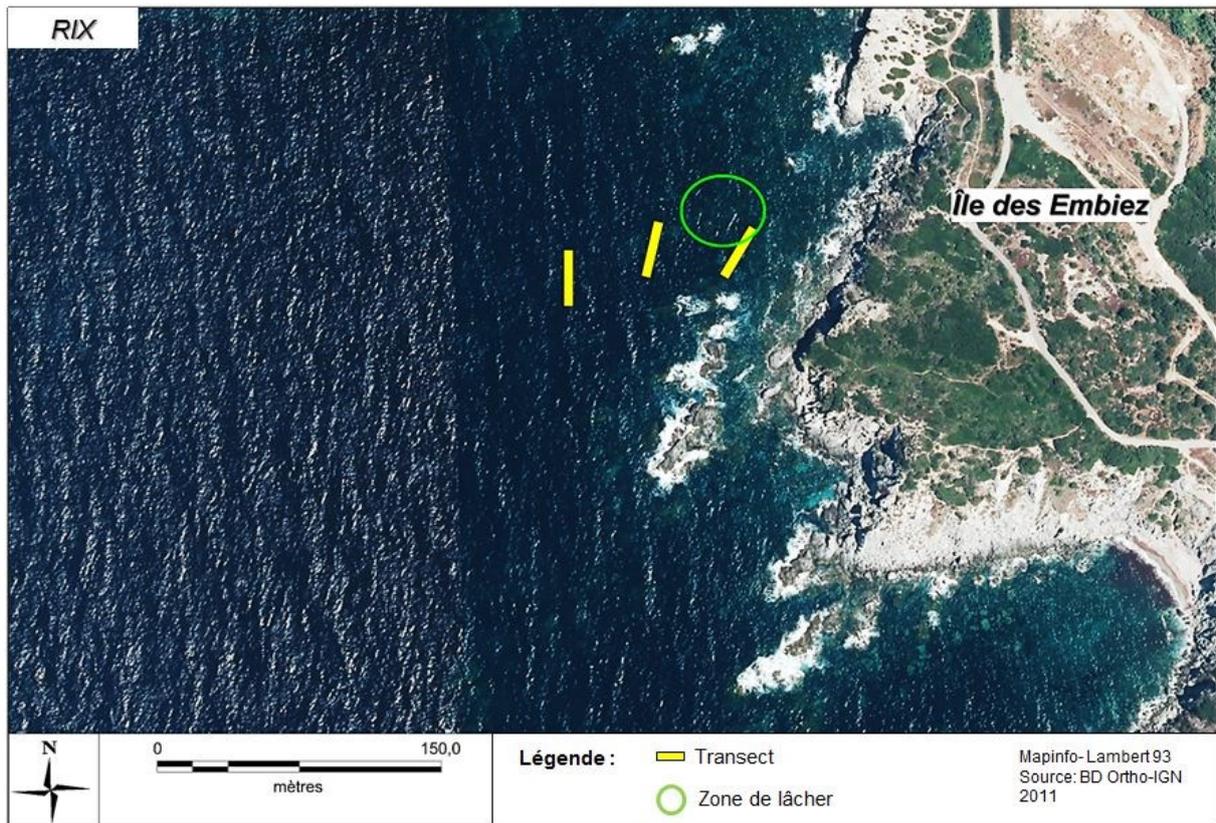


Figure 18 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site du Rix.

Bomasse : Ce site est caractérisé principalement par des blocs et tombants rocheux, quelques zones de graviers, et d'herbiers de posidonie clairsemés. Il s'agit majoritairement d'un faciès de roches à algues photophiles, progressivement remplacé (entre 4 et 6 m de profondeur) par un herbier de posidonie assez dense avec quelques taches de sable et quelques blocs rocheux. Le site est exposé aux phénomènes de largade (forte houle de sud) provoquant occasionnellement le retournement des blocs rocheux en fond de baie à faible profondeur (figure 19).

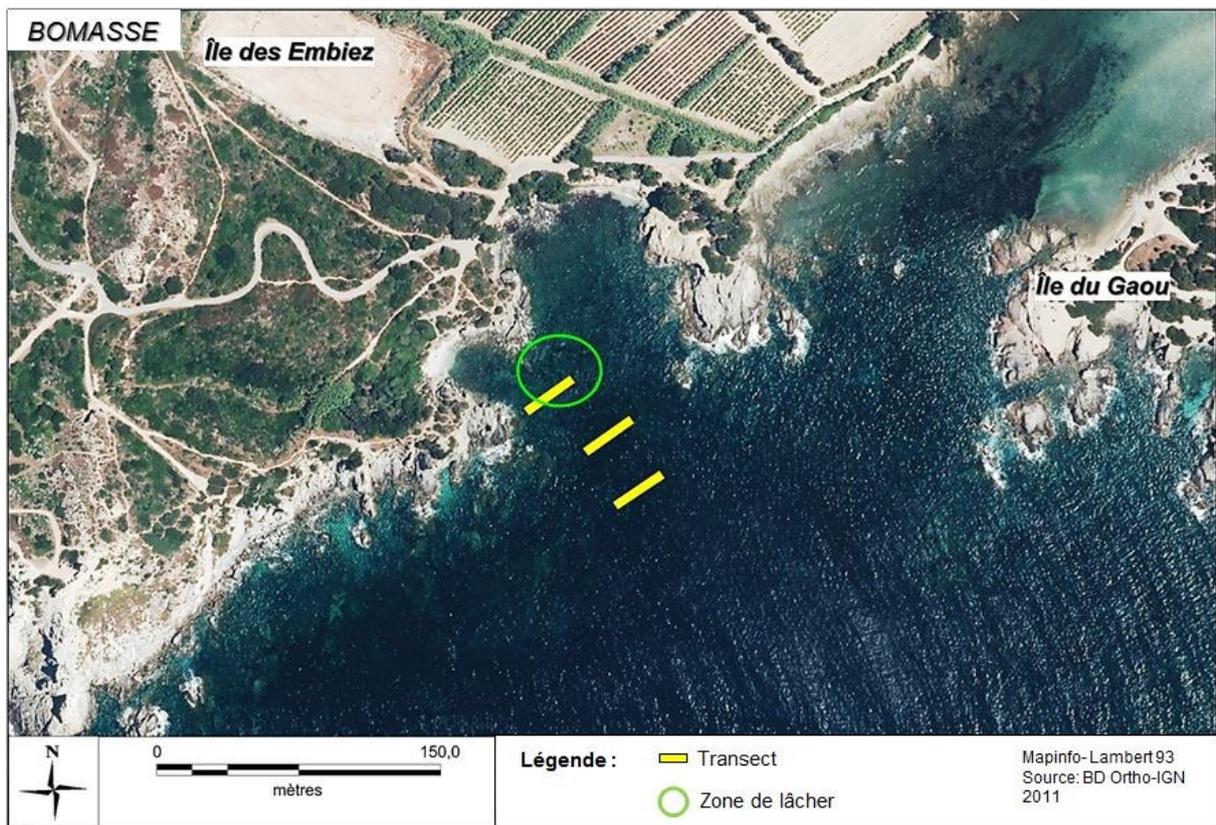


Figure 19 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de la Bomasse.

Sicié : Contrairement aux autres sites, le biotope de celui-ci est assez homogène. Il est caractérisé par des éboulis rocheux, des gros blocs et quelques dalles rocheuses. La pente est assez forte jusqu'à environ 6 m de profondeur, où un banc de sable succède sans transition au faciès de roches à algues photophiles. On remarque que dans cette zone à proximité de l'émissaire de la station d'épuration Amphitria, aucune trace d'herbier de posidonie n'est observée. L'eau est par endroit floutée en raison des différences de salinité entre l'eau de mer et l'effluent. Ce site est exposé à tous les vents (Mistral, Sud et Est), l'hydrodynamisme y est particulièrement fort. Cette zone est rarement calme (figure 20).

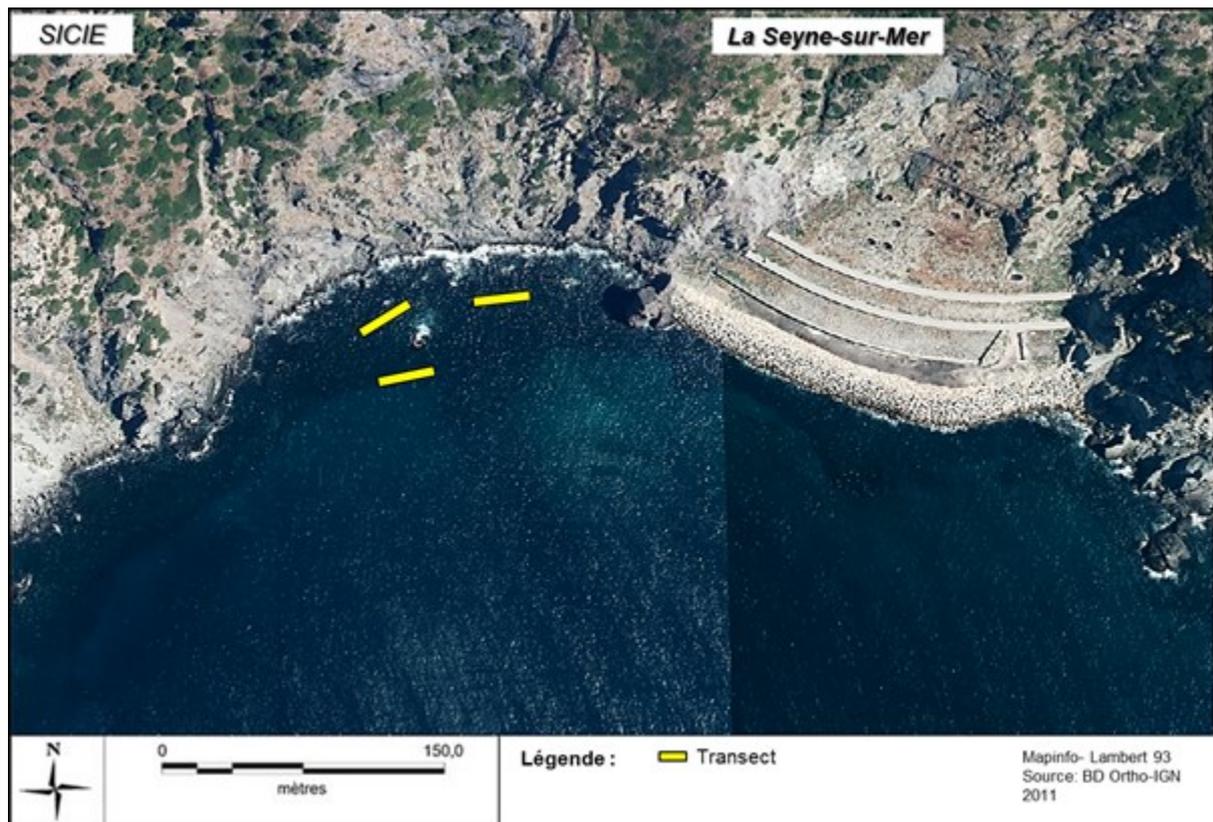


Figure 20 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de la Sicié.

Coudoulière : Cette zone est principalement constituée d'éboulis rocheux à algues photophiles. La pente est forte. Sur les deux premiers mètres de profondeur le développement algal est faible, les roches (blocs, galets et dalles) sont plutôt nues. Cela est dû à un fort hydrodynamisme qui peut retourner les roches lors des tempêtes (surtout les phénomènes de largade). Cette zone est très exposée aux vagues et à la houle. Au-delà de deux mètres de profondeur on trouve un éboulis rocheux à algues photophiles comportant de très nombreuses anfractuosités et quelques taches d'herbiers de posidonie (figure 21).

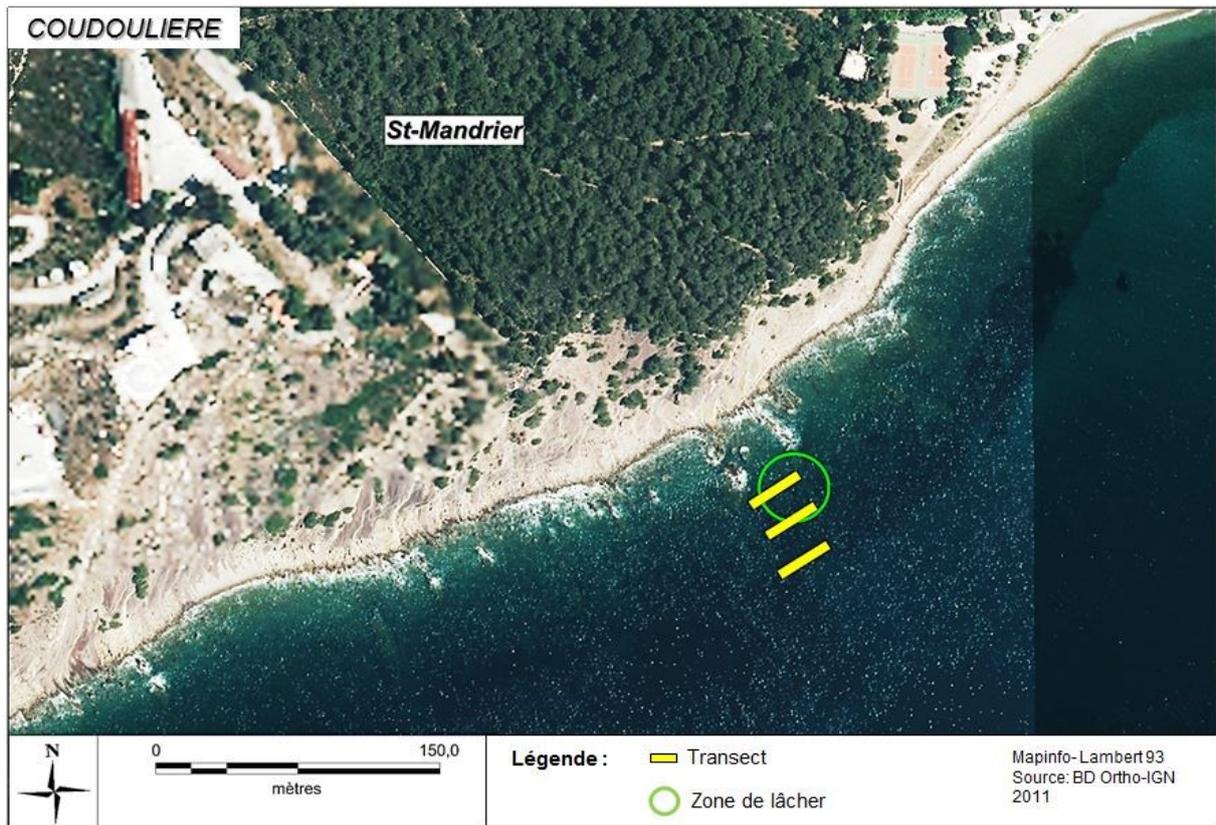


Figure 21 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de la Coudoulière.

Oursinières : Dans les premiers mètres de profondeur, cette zone est constituée de dalles rocheuses et de roches à algues photophiles parsemées de taches d'herbiers de posidonie. La pente est faible mais à partir de 3 à 4 mètres de profondeur, les roches sont rapidement remplacées par de l'herbier de posidonie assez dense parsemé de quelques dalles, puis par un herbier de posidonie parsemé de taches de sable. Le site est assez abrité du vent d'est, néanmoins soumis à la houle du large et au Mistral (figure 22).

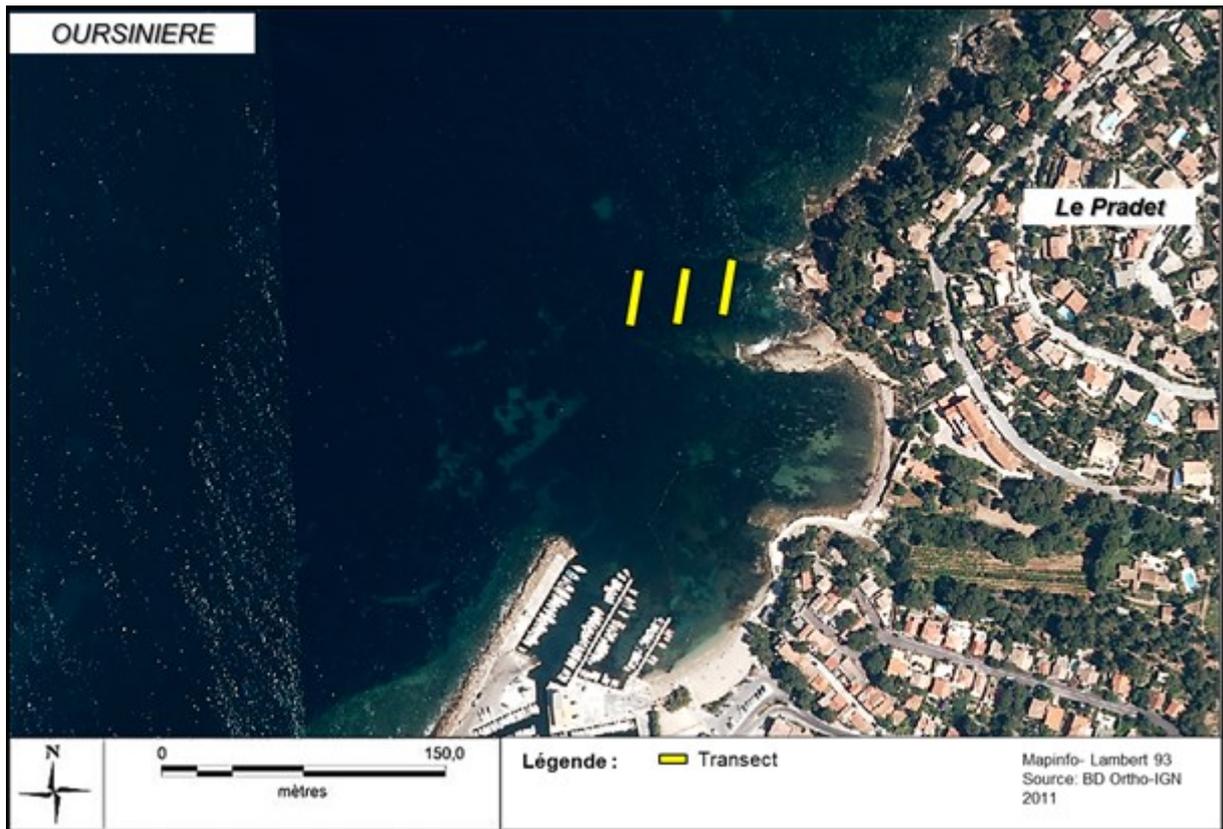


Figure 22 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site des Oursinière.

Baux rouges : Cette zone comporte une forte pente. Les trois premiers mètres de profondeur sont principalement constitués de dalles rocheuses à faible développement algal. Au-delà de 3 m, un herbier de posidonie recouvre majoritairement les dalles et les blocs rocheux. Une zone sableuse apparaît à partir de 11 à 12 m de profondeur. Cette zone est très exposée aux vagues et à la houle d'est et de sud (figure 23).

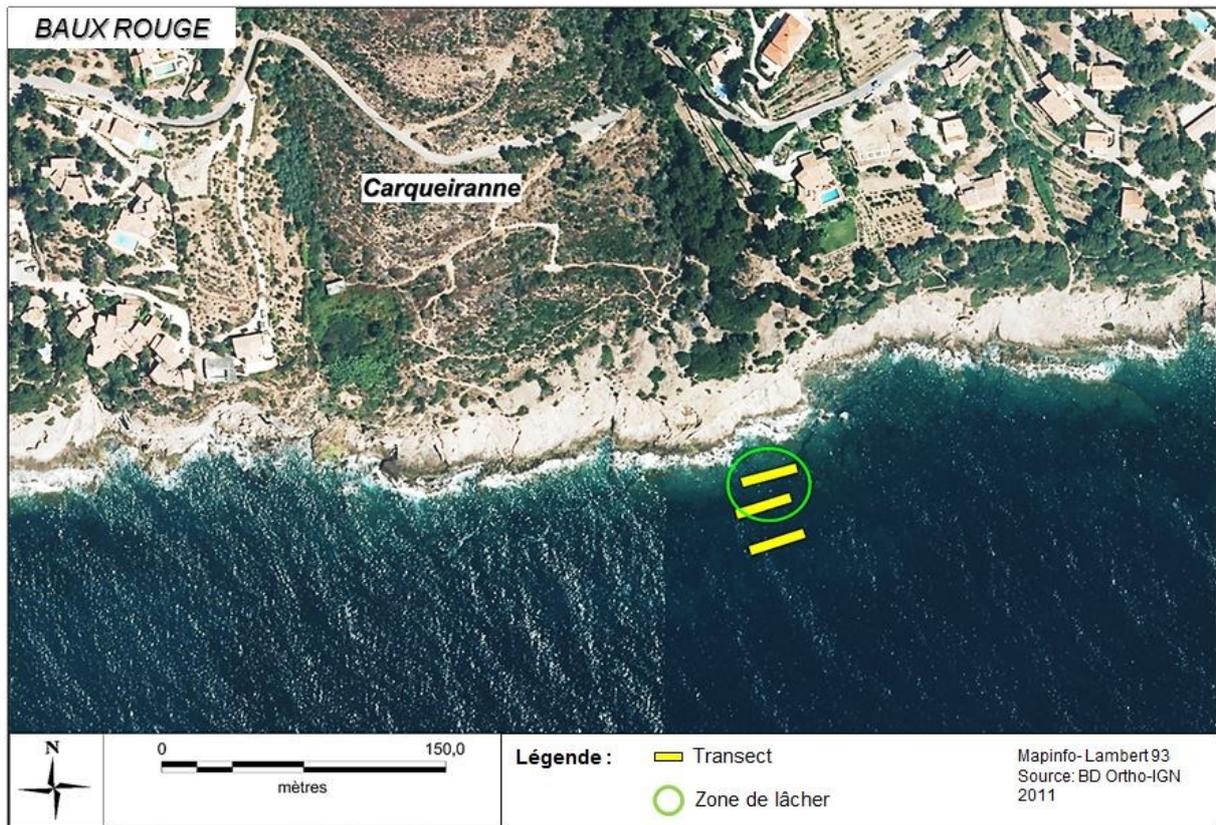


Figure 23 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site des Baux Rouge.

Podestat : Comme pour Sicié, ce site est caractérisé par des éboulis rocheux, des gros blocs et quelques dalles rocheuses. La pente est assez forte voire abrupte sur les deux côtés de la calanque. Au milieu, un banc de sable succède progressivement aux roches et petits blocs à algues photophiles. Cette calanque sous influence des rejets de l'émissaire de Cortiou ne comporte pas d'herbier de Posidonie. L'eau est par endroit floutée en raison de différences de salinité entre l'eau de mer et de l'eau douce provenant de résurgences naturelles (figure 24).

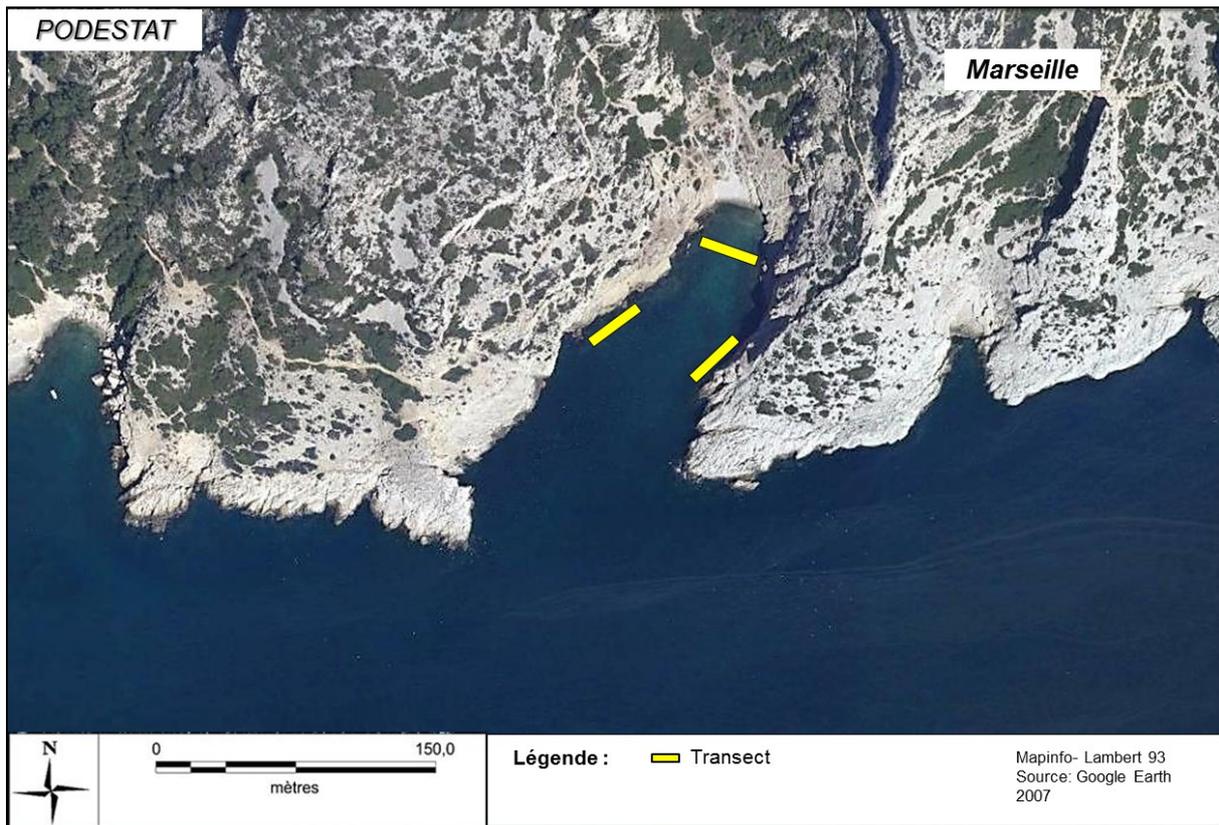


Figure 24 : Localisation des transects de suivi des densités d'oursins et zone de lâcher de juvéniles sur le site de Podestat.

2. Recensement des populations de *Paracentrotus lividus*

Les suivis sont réalisés grâce à une méthode de comptage visuel sur des transects permanents. Les transects sont géoréférencés et matérialisés grâce à des balises de géomètre de type "Feno" afin de faciliter les retours pour des suivis postérieurs (figures 25 et tableau 2). Sur chaque site, trois transects de 60 m² (30 m x 2 m) sont matérialisés à différentes profondeurs (à 3 ; 6 et 9 m, lorsque la topographie des lieux le permet) pour estimer la variabilité spatiale de la répartition des oursins en fonction de la profondeur.

Site	N° transect	position GPS (WGS84)	Direction	Profondeur (m)	
				départ	arrivée
Rayolet	1	43°05'29.7"N/05°48'27.2"E	160°	3.4	2.3
	2*	43°05'27.8"N/05°48'28.3"E	200°	3.0	2.0
	3	43°05'27.6"N/05°48'25.4"E	210°	3.3	2.5
Petit Rouveau	1*	43°05'02.6"N/05°48'45.9"E	300°	0.8	0.8
	2	43°04'59.4"N/05°46'42.5"E	300°	3.4	3.9
	3	43°05'04.5"N/05°48'45.8"E	270°	6.0	6.5
Rix	1*	43°04'32.2"N/05°46'39.4"E	340°	3.4	2.5
	2	43°04'31,1"N/05°46'37.3"E	320°	6.0	5.5
	3	43°04'32.6"N/05°46'35.5"E	180°	9.3	9.3
Bomasse	1*	43°04'15.4"N/05°47'03.9"E	230°	3.4	3.0
	2	43°04'16.2"N/05°47'03.1"E	230°	6.0	6.5
	3	43°04'17.5"N/05°47'02.4"E	230°	9.8	9.0
Sicié	1	43°02'59.0"N/05°50'52.6"E	200°	3.5	4.8
	2*	43°02'58.9"N/05°50'52.5"E	210°	4.9	4.8
	3	43°02'58.7"N/05°50'52.3"E	230°	6.0	7.3
Coudoulière	1*	43°04'12.1"N/05°55'35.2"E	60°	4.1	3.5
	2	43°04'11.7"N/05°55'35.9"E	60°	6.5	6.5
	3	43°04'11.4"N/05°55'37.2"E	70°	9.3	8.8
Oursinnières	1*	43°05'14.9"N/06°01'15.3"E	210°	3.8	3.8
	2	43°05'15,1"N/06°01'14.5"E	230°	6.0	5.3
	3	43°05'15.4"N/06°01'14.0"E	220°	7.6	8.0
Baux Rouges	1*	43°04'43.8"N/06°02'37.8"E	260°	3.5	3.7
	2	43°04'43.7"N/06°02'38.2"E	280°	6.0	5.5
	3	43°04'43.7"N/06°02'38.6"E	290°	10.4	9.0
Podestat	1*	43°12'37.7"N/05°22'60.0"E	50°	5.5	4.5
	2	43°12'39.4"N/05°23'0.9"E	100°	2.0	2.5
	3	43°12'37.0"N/05°23'02.0"E	45°	6.0	4.5

*: transects sélectionnés comme étant les plus propices à *P. lividus* en terme de substrat et profondeur.

Tableau 2 : Localisation et caractérisation des neuf sites et des transects échantillonnés.

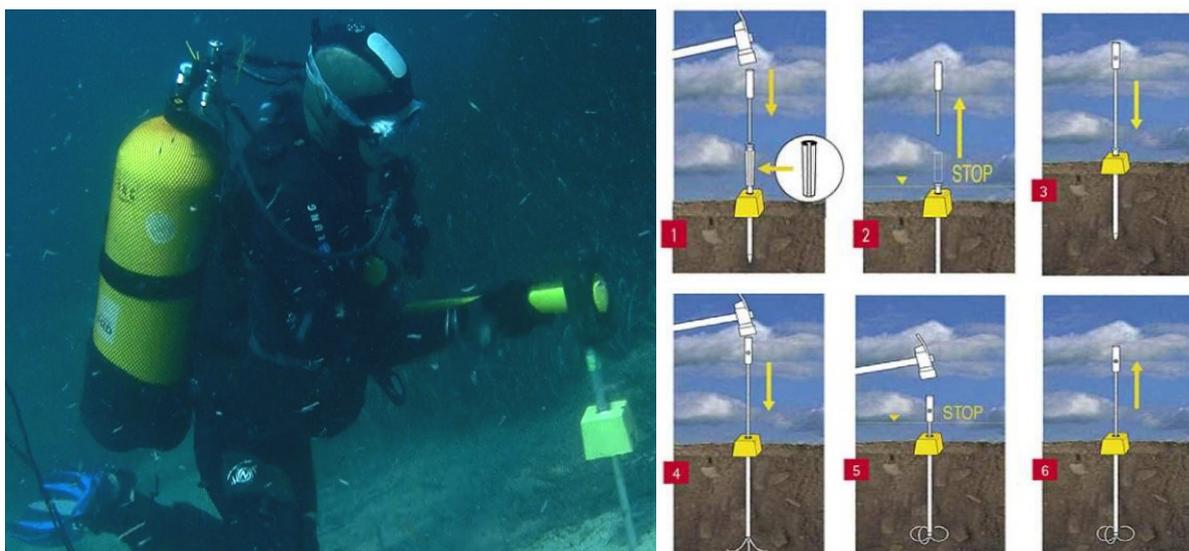


Figure 25 : Mise en place des balises (petites bornes de géomètre "Feno") utilisées pour matérialiser les transects permanents. D'après www.bornes-feno.com (photo : © D. Rebillard).

Afin de disposer de données indépendantes, nécessaires pour des tests statistiques ultérieurs, chaque transect est découpé en 6 secteurs de 5 m de long et de 2 m de large (figures 26 et 27). Cette stratégie méthodologique a été motivée par le comportement agrégatif des oursins qui pourra ainsi être apprécié.

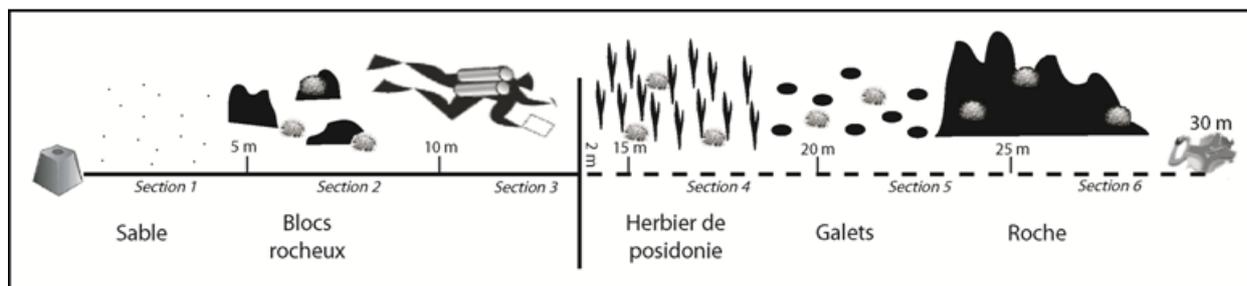


Figure 26 : Schéma de la méthodologie utilisée pour le comptage d'oursins *Paracentrotus lividus* le long d'un transect permanent (© E. Rouanet).

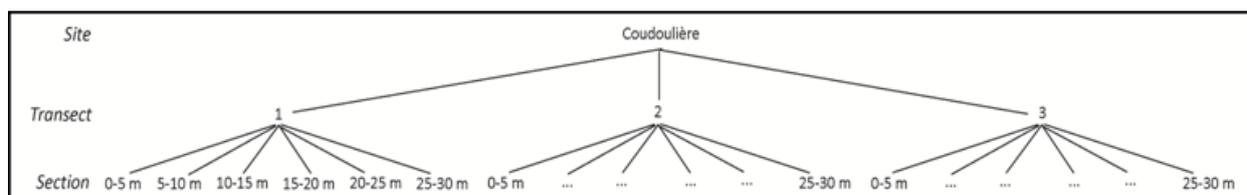


Figure 27 : Schéma de l'arborescence adoptée pour le comptage d'oursins *Paracentrotus lividus*. Exemple du site de la Coudoulière.

Le long des transects et au sein de chaque secteur, tous les individus rencontrés sont comptés et classés selon deux classes de taille : (i) les petits individus de taille inférieure à 4 cm qui représentent le stock de renouvellement et (ii) les gros individus de taille supérieure à 4 cm qui représentent le stock de pêche. La taille des oursins est mesurée à l'ambitus, c'est-à-dire le diamètre du test sans les piquants. Bien que la taille règlementaire de capture soit de 5 cm, nous avons considéré que le stock de pêche était constitué d'oursins de 4 cm et plus car lors des prélèvements, l'estimation de la taille est peu précise. (Bachet et al. 2014). Lors de ces comptages visuels, seuls les oursins visibles ont été comptabilisés. Nous n'avons pas cherché activement les petits individus souvent cachés sous les pierres.

En parallèle, la nature du substrat est décrite afin de pouvoir analyser la structuration des populations au sein de chaque section de transect (figure 28). Cinq types de substrat ont été définis : sable, galets, blocs rocheux, roches (correspondant aux tombants et aux dalles) et herbiers de posidonie.

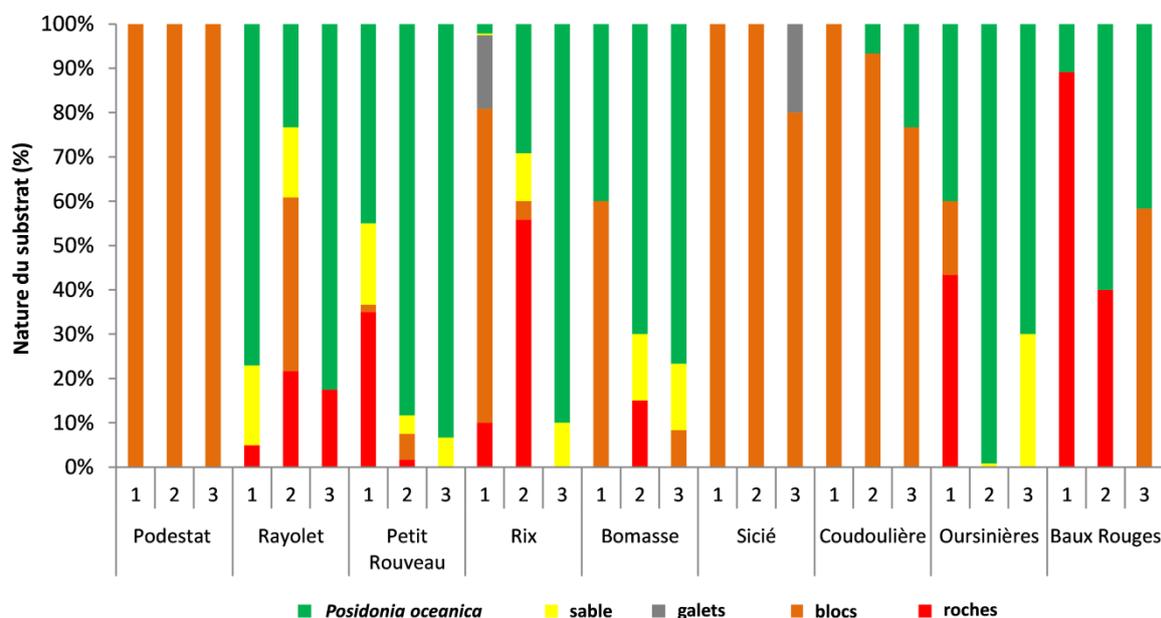


Figure 28 : Nature du substrat (pourcentage de recouvrement) sur chaque transect des neuf sites échantillonnés.

Les densités de l'oursin *Arbacia lixula* ont été mesurées selon le même protocole mais sans distinction de classe de taille.

3. Traitement des données

Les données de densité sont exprimées en nombre d'individus par mètre carré et sont présentées sous la forme moyenne \pm erreur standard.

L'hypothèse de normalité des données a été testée par le test de Shapiro-Wilks (XLSTAT®). Les données ne suivant pas une loi normale même après transformation, des outils statistiques non-paramétriques ont été utilisés pour l'analyse de données. Les analyses de variances ont été réalisées par une méthode non-paramétrique d'analyse de variance (PERMANOVA) basée sur la distance de Bray-Curtis (PERMANOVA V.6.1, (Anderson 2001). Comme l'ANOVA, l'analyse de variance par PERMANOVA est puissante pour l'analyse de

données univariées (Anderson 2001; Bonaviri et al. 2012). La variabilité spatiale a été testée avec un design hiérarchique à deux facteurs : le facteur site, comme facteur aléatoire et le facteur transect comme facteur aléatoire imbriqué dans le facteur site. Pour tester la variabilité temporelle, un design similaire a été appliqué avec le facteur année comme facteur fixe et le facteur saison (printemps et automne) comme facteur fixe imbriqué dans le facteur année. Une analyse complémentaire (two-way PERMANOVA) a été réalisée pour tester l'interaction spatiale et temporelle en prenant le facteur année comme fixe et le facteur site comme aléatoire. Pour tester l'effet de la pêche sur les densités d'oursins de taille exploitable (variation entre le début et la fin de la période légale de capture), une analyse two-way PERMANOVA a été effectuée avec les campagnes de comptage comme facteur fixe et les sites comme facteur aléatoire. Les *P*-values ont été calculées avec 9999 permutations.

Les corrélations entre les densités d'oursins (pour les deux espèces considérées et pour les deux classes de taille pour *P. lividus*), la profondeur et la nature du biotope (pourcentage de chaque type de substrat) ont été testées par l'analyse des rangs de Spearman (XLSTAT®). Les résultats de cette analyse ont permis de révéler à l'intérieur de chaque site (Podestat inclus) le transect présentant le biotope le plus favorable aux oursins *P. lividus*. La comparaison des densités d'oursins entre sites a été réalisée à partir de ce transect préférentiel, ce qui a permis de lisser l'influence du biotope. Cette comparaison a été réalisée par un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis pour les années 2012 et 2013 (XLSTAT®). Les données de 2011 n'ont pas été incluses dans cette analyse car l'étude des peuplements d'oursins à Podestat n'a débuté qu'au printemps 2012. Un test *post-hoc* non-paramétrique de comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn a été utilisé en complément du test de Kruskal-Wallis (Dunn 1964). Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

IV. Résultats

1. État des peuplements de *P. lividus* de l'aire toulonnaise

La densité moyenne des oursins *P. lividus* au cours de la période 2011 à 2013 des sites de l'aire toulonnaise est de $1,67 \pm 0,14$ ind/m². La densité moyenne des petits individus (<4cm) est de $0,54 \pm 0,04$ ind/m² et celle des gros individus (>4cm) est de $1,13 \pm 0,11$ ind/m².

Les plus fortes densités d'oursins ont toujours été observées à Sicié où la densité moyenne est de $9,43 \pm 0,71$ ind/m², petits et gros individus confondus, ce qui représente 72,95 % des individus observés pour l'ensemble des sites (figures 29 et 30). Les plus faibles densités sont toujours rencontrées sur le site des Oursinières où les densités sont quasiment nulles ($0,06 \pm 0,01$ ind/m²) et ne représentent que 0,30 % des individus rencontrés sur l'ensemble des sites.

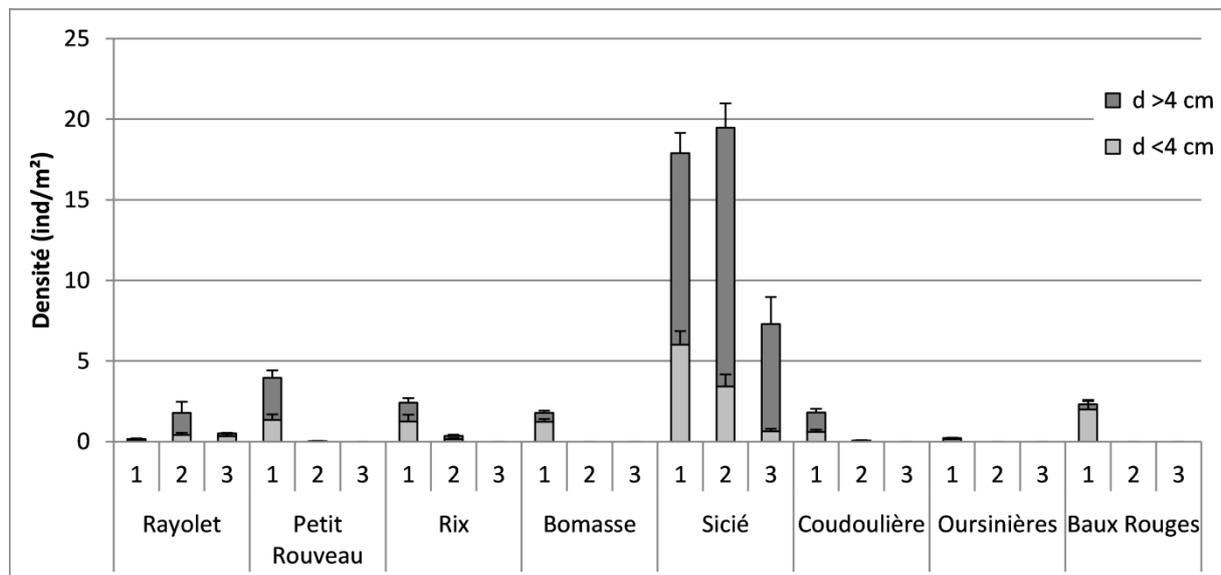


Figure 29 : Densités moyennes des petits (< 4 cm) et gros (> 4 cm) individus sur chaque transect de chaque site de l'aire toulonnaise pour la période 2011 à 2013.

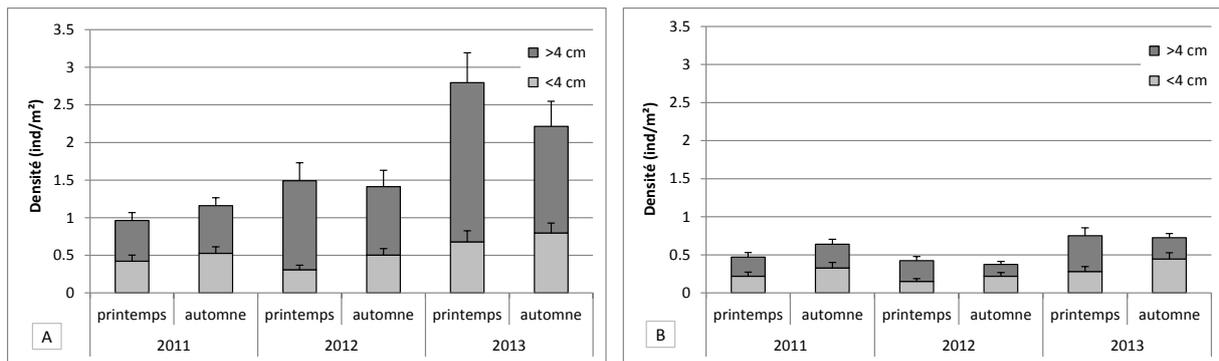


Figure 30 : Évolution des densités moyennes des petits (<4 cm) et gros (>4 cm) individus de l'ensemble des sites de l'aire toulonnaise entre le printemps 2011 et l'automne 2013. A : en incluant le site Sicié ; B : sans le site Sicié.

Rayolet : La densité moyenne est de $0,63 \pm 0,13 \text{ ind.m}^{-2}$ et n'a pas significativement évolué au cours des trois années d'étude. Les densités de petits et de gros individus sont similaires (respectivement $0,32 \pm 0,07 \text{ ind.m}^{-2}$ et $0,32 \pm 0,09 \text{ ind.m}^{-2}$) (figure 31).

Petit Rouveau : La densité moyenne est de $0,78 \pm 0,15 \text{ ind.m}^{-2}$. Les densités n'ont pas significativement évolué au cours des trois années d'étude, petits et gros individus confondus. Aucun individu n'a été observé sur le transect n°3 essentiellement recouvert d'herbier de posidonies.

Rix : Les densités moyennes de *P. lividus* de ce site sont restées particulièrement constantes au cours des trois années de suivi. La densité moyenne est de $0,86 \pm 0,16 \text{ ind.m}^{-2}$. De même que pour la station Petit Rouveau, aucun oursin n'a été observé sur le transect n°3 essentiellement recouvert d'herbier de posidonies.

Bomasse : La densité moyenne sur ce site est de $0,56 \pm 0,10 \text{ ind.m}^{-2}$ et n'a pas significativement évolué durant les trois années d'étude. La quasi-totalité des individus a été rencontrée sur le transect le moins profond (le n°1) majoritairement constitué de fonds rocheux. Seuls 2 individus de taille > 4 cm ont été observés sur le transect n°3 et aucun sur le transect n°2. Ces deux transects sont majoritairement constitués d'herbier de posidonies.

Sicié : La densité moyenne de ce site est de $9,43 \pm 0,71 \text{ ind.m}^{-2}$. La densité des petits individus n'a pas significativement évolué entre 2011 et 2013 avec une moyenne de $2,40 \pm 0,22 \text{ ind.m}^{-2}$. Par contre, la densité des individus de taille > 4 cm a significativement augmenté ($P < 0,0001$) d'une année sur l'autre, passant de $2,73 \pm 0,34 \text{ ind.m}^{-2}$ en 2011 à $11,52 \pm 1,06 \text{ ind.m}^{-2}$ en 2013. La densité moyenne sur ce site reste significativement plus

élevée que celle des autres sites. Ces fortes densités ont été observées sur chacun des trois transects dont la nature des fonds est principalement constituée d'éboulis rocheux.

Coudoulière : La densité moyenne est de $0,53 \pm 0,08 \text{ ind.m}^{-2}$ et n'a pas significativement évolué quelle que soit la classe de taille au cours de l'étude. Aucun oursin n'a été observé sur le transect n°3, au-delà de 8 m de profondeur.

Oursinières : Les densités en *P. lividus* de ce site sont quasiment nulles avec une moyenne de $0,06 \pm 0,01 \text{ ind/m}^2$. Les densités n'ont pas significativement évolué au cours de la période d'étude, quelle que soit la classe taille. Quasiment aucun oursin n'a été observé dans l'herbier de posidonie qui est l'habitat dominant de ce site.

Baux Rouges : La densité moyenne est de $0,50 \pm 0,12 \text{ ind.m}^{-2}$. Aucune variation significative des densités n'a été observée entre 2011 et 2013. Presque tous les individus ont été observés sur le transect n°1, à 3,5 m de profondeur.

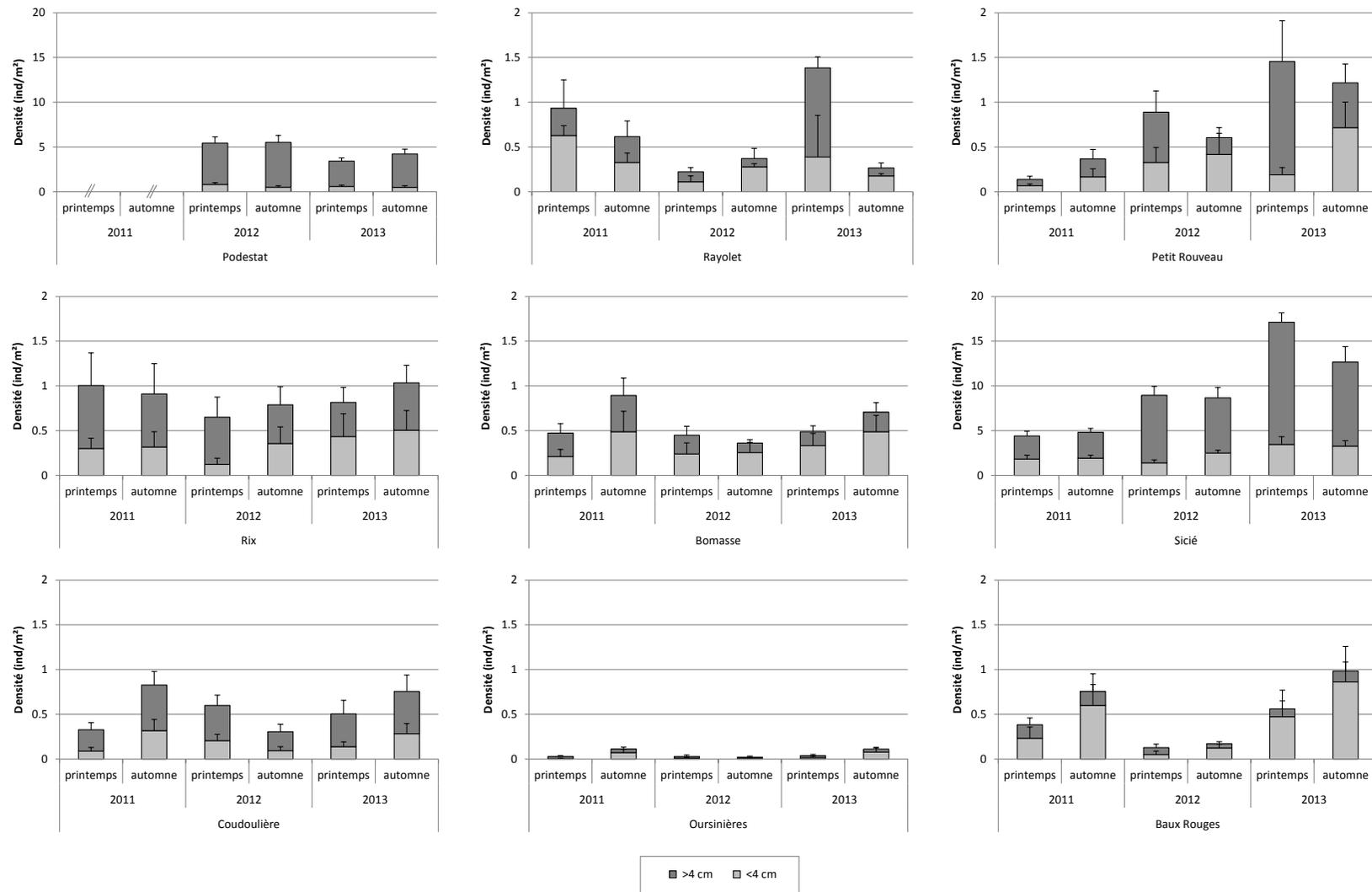


Figure 31 : Évolution des densités moyennes des petits (<4 cm) et gros (>4 cm) et de la densité moyenne totale des individus de chaque site. Pour des raisons de facilité de lecture, les densités présentées pour le graphique de Podestat et Sicié ne sont pas à la même échelle que celle des autres graphiques.

2. Structuration spatiale des peuplements

L'analyse de la structuration des densités a été réalisée au sein de chaque site, en fonction de la profondeur et du substrat, avec les données récoltées pour les 3 transects de chaque site. Une analyse portant sur la structuration entre sites de la zone d'étude, a été réalisée à partir des données obtenues sur les transects préférentiels.

La two-way PERMANOVA montre une variabilité spatiale significative des densités de *P. lividus* à la fois au sein des sites mais aussi entre les sites (tableau 3).

a. Structuration au sein des sites

La two-way PERMANOVA montre une variabilité significative des densités de *P. lividus* entre les transects de chaque site (tableau 3).

Source	df	MS	Pseudo-F	P (perm)
Site	7	77651.36	55.53	0.0001
Transect (site)	16	55878.81	39.96	0.0001
Residu	840	1398.49		
Total	863			
Année	2	5409.96	1.89	0.1062
Saison (année)	3	1530.64	0.53	0.7885
Residu	858	2865.30		
Total	863			
Année	3	2453.03	0.58	0.6972
Site	7	77651.37	32.53	0.0001
Année*Site	14	4200.76	1.76	0.0076
Residu	840	2387.00		
Total	863			
Campagne de comptage	5	3082.37	0.97	0.4564
Site	7	78773.11	35.79	0.0001
Campagne de comptage*Site	35	3166.98	1.44	0.0134
Residu	816	2201.19		
Total	863			

Tableau 3 : PERMANOVA basée sur la dissimilarité de Bray-Curtis pour les données de densités de *P. lividus*.

L'analyse de corrélation des rangs de Spearman révèle une structuration des communautés de *P. lividus* en fonction de la profondeur et du substrat pour l'ensemble des sites indépendamment des cohortes annuelles. En effet, les densités de *P. lividus* sont

négativement corrélées à la profondeur, au substrat sableux et aux herbiers de *Posidonia oceanica* ($P < 0,01$) (tableau 4). A l'inverse, elles sont positivement corrélées aux blocs et aux galets (substrats rocheux) ($P < 0,01$). Or, sur les sites étudiés, la nature du substrat est corrélée avec la profondeur : le recouvrement en blocs est négativement corrélé à la profondeur alors que le recouvrement en sable et en herbier de Posidonies est significativement positivement corrélé à la profondeur ($P < 0,01$). Les plus fortes densités d'oursins, quelle que soit la classe de taille, se trouvent donc dans les premiers mètres de profondeurs sur substrats rocheux.

L'analyse de la structuration démographique des peuplements de *P. lividus* révèle que les densités de petits individus sont positivement corrélées ($P < 0,01$) aux densités de gros individus (tableau 4). Tout comme les gros individus, les petits se retrouvent préférentiellement dans les premiers mètres de profondeurs sur les substrats rocheux. Quel que soit le site, les petits individus sont souvent observés à proximité des plus gros, et dans les anfractuosités rocheuses. Les plus fortes densités de petits individus sont rencontrées à Sicié ($2,40 \pm 0,22 \text{ ind.m}^{-2}$) et à Podestat ($0,60 \pm 0,09 \text{ ind.m}^{-2}$). Ce sont aussi ces deux sites qui possèdent les plus fortes proportions de gros individus (respectivement 74,60 % et 87,07 %).

	densité de <i>P. lividus</i>	densité < 4 cm	densité > 4 cm	densité de <i>A. lixula</i>	profondeur	roches	blocs	galets	sable	<i>Posidonia oceanica</i>
densité de <i>P. lividus</i>										
densité < 4 cm	0.882***									
densité > 4 cm	0.908***	0.834***								
densité de <i>A. lixula</i>	0.620***	0.545***	0.659***							
profondeur	-0.444***	-0.414***	-0.36***	-0.128***						
roches	-0.047	0.004	-0.086**	-0.106**	-0.272***					
blocs	0.531***	0.442***	0.539***	0.488***	-0.182***	-0.499***				
galets	0.245***	0.197***	0.267***	0.332***	-0.009	-0.075*	0.122***			
sable	-0.364***	-0.287***	-0.319***	-0.291***	0.189***	0.055	-0.497***	-0.141***		
<i>Posidonia oceanica</i>	-0.597***	-0.517***	-0.573***	-0.504***	0.307***	0.003	-0.770***	-0.258***	0.348***	

*: valeurs significatives au seuil $\alpha=0.05$ (bilatéral), **: valeurs significatives au seuil $\alpha=0.01$ (bilatéral) et ***: valeurs significatives au seuil $\alpha<0.001$ (bilatéral)

Tableau 4 : Corrélations des rangs de Spearman pour les deux espèces d'oursins, la profondeur et les différents types d'habitats.

b. Structuration entre les sites

Compte tenu de la structuration des peuplements d'oursins en fonction du biotope et de la profondeur, une analyse des densités de *P. lividus* a été réalisée pour les données du transect de chaque site correspondant au biotope le plus propice à cette espèce. Cette analyse inclut les données récoltées sur le site de Podestat (Parc National des Calanques de Marseille) dont l'étude a débuté au printemps 2012. Cette analyse a donc été réalisée avec les données de 2012 et 2013.

L'analyse statistique a révélé une structuration de la population sur la zone d'étude avec des différences de densité entre 4 groupes de sites ($p= 0,0001$) (figure 32). Le groupe A contient les sites avec les plus faibles densités et ne chevauche aucun autre groupe. Les groupes B et C partagent 3 sites sur les 5 qu'ils contiennent. Le groupe D concerne les 2 sites situés au droit des émissaires de STEP et au niveau desquels les prélèvements sont interdits. Il contient aussi le site Petit Rouveau, qui appartient également au groupe C.

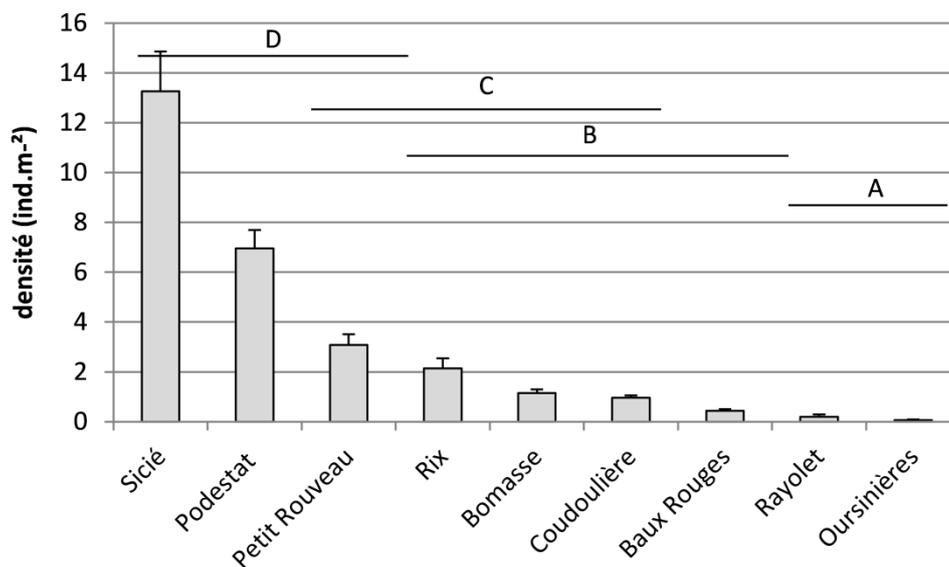


Figure 32 : Test post-hoc de Dunn de comparaison des sites basé sur les densités de *P. lividus* sur les transects préférentiels.

3. Fluctuation temporelle des peuplements de *P. lividus*

L'analyse two-way PERMANOVA ne révèle aucune variation annuelle ou saisonnière significative des densités d'oursins *P. lividus*. Le test de comparaisons par paires sur l'interaction entre le facteur année et le facteur saison a révélé que seules les densités du site Sicié ont significativement augmenté d'une année sur l'autre ($P < 0,0001$).

Pour l'ensemble des campagnes de comptage, il n'y a pas d'effet saisonnier observé sur les abondances d'oursins. De même, aucune fluctuation de densité de *P. lividus* de taille exploitable n'a été détectée entre le début et la fin des périodes légales de pêche quel que soit le site (saisons de pêche 2011-2012 et 2012-2013) (tableau 3).

4. Interaction entre *Arbacia lixula* et *Paracentrotus lividus*

La structuration spatiale d'*Arbacia lixula*, au sein des sites (fonction de la profondeur et de la nature du substrat) est similaire à celle de *P. lividus* (tableau 3). Pour les deux espèces, les plus fortes densités se rencontrent dans les premiers mètres de profondeur sur substrat rocheux. De plus, les densités de ces deux espèces sont positivement corrélées ($P < 0,01$) ce qui montre qu'elles ne semblent pas être en compétition dans cette zone. Selon nos observations de terrain concernant les caractéristiques du substrat, *A. lixula* ne semble pas avoir la même distribution spatiale que *P. lividus* sur les substrats rocheux, en occupant préférentiellement les parois verticales des roches. Quel que soit le site, les densités d'*A. lixula* sont inférieures ou du même ordre de grandeur que celles de *P. lividus* (figure 33).

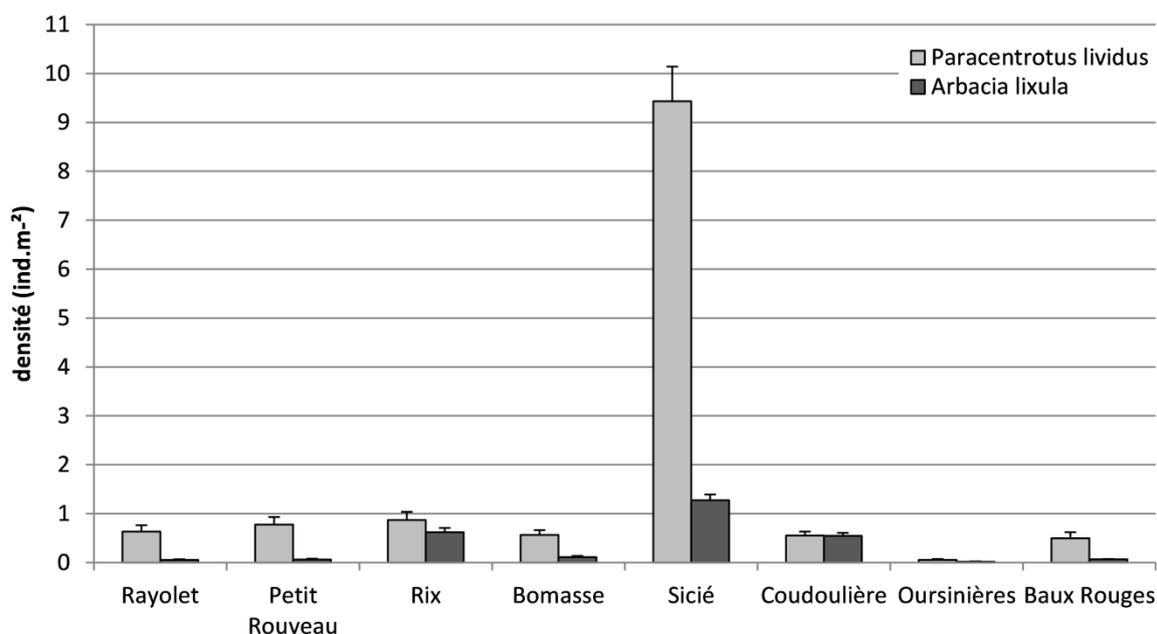


Figure 33 : densités moyennes (pour la période 2011 à 2013) de *Paracentrotus lividus* et d'*Arbacia lixula*.

V. Discussion

La mise en place du suivi démographique a permis de caractériser pour la première fois l'état des stocks d'oursins *P. lividus* de la communauté d'agglomération de Toulon (Var, France). La méthodologie adoptée est similaire dans sa conception à celle de Bachet et al. (2014) et va permettre de comparer et discuter nos résultats de suivis à une échelle régionale. Le choix du nombre de transects et de leur positionnement s'est avéré pertinent.

Nous avons pu mettre en évidence une structuration spatiale au sein d'un site et entre sites, montrant des préférences de substrats et profondeurs.

Faible densité en sites pêchés et sensibilité au prélèvement.

Pour l'ensemble des sites, même si l'on observe une légère augmentation des densités entre les années 2012 et 2013, cette variation d'abondance n'est pas statistiquement significative. Les données sont en effet fortement influencées par les densités élevées des gros individus du site Sicié qui est le seul site dont les densités ont significativement augmenté au cours de la période d'étude. Si l'on exclut ce dernier site, la densité moyenne d'oursins *P. lividus* observée dans l'aire toulonnaise entre 2011 et 2013 pour les sept sites restants n'est plus que de $0,56 \pm 0,08 \text{ ind.m}^{-2}$ et n'excède pas 1 ind.m^{-2} lorsque l'on considère les trois transects (3, 6 et 9 m de profondeur) pour chaque site.

Cependant, ces valeurs résultent de la distribution non-homogène des oursins. Les faibles densités moyennes sont influencées par la diminution progressive des densités d'oursins avec la profondeur. En effet, comme démontré dans d'autres études (Hereu et al. 2005; Hereu et al. 2006; Ouréns et al. 2014), nous avons mis en évidence que, dans notre zone d'étude, les oursins *P. lividus* sont préférentiellement localisés dans de faibles profondeurs, principalement dans les 3 premiers mètres.

L'effet de site qui a été montré dans cette étude sur les densités de populations de *P. lividus* met en évidence deux principaux groupes de populations exploitées dans l'aire Toulonnaise. Si on tient compte seulement des densités des transects préférentiels (donc dans les 3 à 4 premiers mètres de profondeur), on distingue un premier groupe comprenant les sites de Petit Rousseau, Rix et Bomasse, comportant des densités similaires à celles des populations des îles de Port-Cros et Porquerolles. Un deuxième groupe avec des densités inférieures à $0,5 \text{ ind.m}^{-2}$ comprend les sites côtiers les plus accessibles tels que Baux Rouges, Rayolet et Oursinières. Les dernières données disponibles de densités d'oursins dans le Parc National de Port-Cros révèlent des densités avoisinant $1,5 \text{ ind.m}^{-2}$ à 3 mètres de profondeur en zone de réserve intégrale (Hereu et al. 2005). Des densités du même ordre sont aussi rencontrées à la même période et dans les mêmes profondeurs autour de Porquerolles (Hereu et al. 2006). Port-Cros et Porquerolles sont deux îles distantes d'environ 10 kilomètres, et tout comme les Embiez, proche de la côte. La pêche aux oursins n'est pas

interdite sur l'île de Porquerolles. Ces données suggèrent que le niveau de protection concernant cette espèce semble peu influencer les densités. Bien que nous n'ayons pas évalué directement l'influence de l'accessibilité des sites sur les densités de population d'oursins, nous supposons que les populations insulaires sont moins sensibles aux captures de loisirs. Au contraire, il semble que les populations côtières soient plus affectées par l'effet combiné des deux types de captures : professionnelles et récréatives. Cela met aussi en évidence l'effet non négligeable de l'activité de pêche récréative.

Au cours de la période d'étude, les densités moyennes annuelles dans les sites pêchés ne montrent pas de variation significative, et étonnamment, la comparaison des données obtenues à partir des six campagnes de comptage avant et après les périodes légales de pêche n'a révélé aucune fluctuation importante de la densité des individus de taille commercialisable. A une échelle de temps courte, et compte tenu du caractère agrégatif des oursins et de la taille de l'échantillonnage considéré, les données récoltées ne mettent pas en évidence un impact direct de l'activité d'exploitation sur les stocks.

Historiquement, les débarquements déclarés de *P. lividus* dans le sud de la France révèlent une diminution constante des captures depuis 1970, ce qui indique indirectement un effondrement des stocks (Andrew et al. 2002; FAO 2014). Dans les années 80, les populations de *P. lividus* dans le département voisin des Bouches-du-Rhône affichaient des densités plus élevées mais déjà considérées comme critiques (Régis et al. 1985; Régis 1989). De nos jours, les densités que nous observons dans le département du Var sont équivalentes aux densités actuelles des populations de *P. lividus* suivies dans le département des Bouches-du-Rhône, considérées comme appauvries et causant une inquiétude concernant la durabilité de l'activité de pêche professionnelle aux oursins (Bachet et al. 2014).

Pour les sites étudiés de l'aire toulonnaise, nous avons montré que les individus se regroupent quelle que soit leur taille, principalement dans les zones rocheuses et dans les premiers mètres de profondeur. Par conséquent, les stocks sont particulièrement exposés à l'activité de pêche, et sensibles puisque la proportion du stock non accessible pour la pêche semble très faible. De plus, compte tenu des faibles densités des populations étudiées et de la sensibilité des oursins face aux événements rares tels que les tempêtes, les fortes précipitations ou les maladies, le maintien des populations à des niveaux démographiques bas augmente le risque d'effondrement des populations, comme cela s'est déjà produit en

Bretagne et en Irlande, malgré la cessation de l'exploitation de la ressource (Allain 1975; Andrew et al. 2002; FAO 2014). Le risque d'effondrement pourrait également être aggravé par la sensibilité des communautés d'oursins à l'effet Allee (Allee 1931) induisant que le taux de croissance de la population est positivement corrélé avec la proportion d'individus de grande taille qui peuvent entre autre offrir une protection aux recrues grâce à leur canopée d'épines (Tegner & Dayton 1981; Bostford et al. 2004; Kramer et al. 2009). Par conséquent, cette activité peut indirectement provoquer un effondrement démographique sur le long terme (Régis et al. 1985; Régis 1989; Guidetti et al. 2004; Ceccherelli et al. 2011).

Bien que les données de cette étude ne montrent pas de variations significatives des densités d'oursins entre le début et la fin de la période de pêche, l'ensemble des résultats met en évidence la fragilité des communautés d'oursins et leur sensibilité aux prélèvements, confirmant les observations empiriques des pêcheurs locaux.

Le cas des populations de *P. lividus* non pêchées et soumises aux rejets de stations d'épurations.

Les mesures faites dans le site Sicié montrent des similitudes avec celles réalisées à la calanque de Podestat (Marseille) à proximité de l'émissaire de Cortiou à la fois dans l'abondance et dans la structuration des peuplements d'oursins. Ces deux sites sont exposés aux effluents de stations d'épuration et sont soumis à une interdiction de pêche. Ils présentent aussi des biotopes similaires constitués d'éboulis rocheux comprenant de nombreuses anfractuosités et des peuplements macrophytiques de type gazonant avec des patches de type barren révélant localement un surpâturage des oursins (figure 34). Ils présentent aussi des densités de populations de *P. lividus* significativement plus élevées que les autres sites étudiés, à la fois pour les individus de grande et de petite taille, avec une forte proportion de gros individus.



Figure 34 : Faciès à surpâturage provoqué par de fortes densités de *P. lividus* (Site Sicié) laissant les roches à nues ou recouvertes d'algues gazonnantes (photo : © S. Couvray).

Les observations entre les populations exposées et non exposées aux effluents des stations d'épuration ont été bien documentées depuis le milieu des années 70 (Boudouresque & Verlaque 2007 ; Harmelin et al. 1981 ; Delmas & Régis 1984 ; Delmas 1992 ; Allain 1975) où il a été démontré que *P. lividus* est peu sensible à l'enrichissement en matière organique par rapport à d'autres espèces et que ce paramètre favoriserait même son développement (Harmelin et al. 1981). A titre d'exemple, dans le début des années 80, il a été observé à Podestat des densités atteignant 40 ind.m^{-2} à des profondeurs comprises entre 2 et 15 mètres de profondeur (Harmelin et al. 1995), tandis que les densités à Port-Cros atteignaient à peine 10 ind.m^{-2} (Hereu et al. 2005). La mise en place de la première station d'épuration de Marseille en 1987 a considérablement réduit l'impact de ces rejets et certaines communautés animales plus sensibles que *P. lividus* à ce type de pollution semblent reconquérir le milieu (Reish & Bellan 1995). Par conséquent, les fortes densités de populations de *P. lividus* observées dans les années 70 et aujourd'hui proches des rejets de station d'épuration, pourraient résulter de l'enrichissement de l'eau de mer côtière en matière organique qui favorise artificiellement la pullulation de cette espèce.

Pas de compétition apparente entre *Paracentrotus lividus* et *Arbacia lixula*

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de phénomène de compétition entre les peuplements d'*Arbacia lixula* et de *Paracentrotus lividus*. Par contre, en certains sites, les densités d'*A. lixula* sont du même ordre de grandeur que celles de *P. lividus*. Comme il a déjà été observé dans d'autres études (Bulleri et al. 1999 ; Ruitton et al. 2000), la présence

d'*A. lixula* semble être favorisée par les parois rocheuses verticales, qui correspondent à son habitat préférentiel. Dans un contexte de réchauffement global et de non-prélèvement d'*A. lixula*, il apparaît opportun de continuer de suivre l'évolution de cette espèce en parallèle des suivis de *P. lividus* pour comprendre et évaluer l'interaction et co-évolution de ces deux espèces d'oursins communes dans la zone subtidale du bassin nord-ouest méditerranéen.

Conclusion

Ces trois années d'étude ont mis en évidence la fragilité des stocks d'oursins dans l'aire Toulonnaise. Les mesures de gestion actuelles semblent insuffisantes pour assurer la pérennité de l'activité de pêche. L'acquisition de données à long terme permettra d'apprécier l'évolution des populations d'oursins comestibles de cette zone et de réajuster les moyens de gestion de cette ressource (Addis et al. 2009).

CHAPITRE 3. AQUACULTURE ET PRODUCTION DE JUVENILES

Rapports :

KIRCHHOFER D., **COUVRAY S.** et al. (2013). Protocole expérimental de production de juvéniles d'oursins *Paracentrotus lividus*. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 16 pp.

MIARD T., **COUVRAY S.** et al. (2013). Projet oursins du soleil – Bilan expérimental. Institut Océanographique Paul Ricard : 29 pp.

MIARD T., **COUVRAY S.**, BONNEFONT J.-L. (2012) Affinage d'oursins : synthèse bibliographique. Comité Local des Pêches Maritimes et des Elevages Marins du Var / Fonds Européen pour la pêche – Institut Océanographique Paul Ricard. 19 pp.

I. Introduction

A l'origine du projet, l'IOPR ne disposait pas d'infrastructures aquacoles appropriées permettant d'envisager la production, dans des conditions contrôlées et optimales, de juvéniles d'oursins en quantité suffisante pour le repeuplement. La construction d'une écloserie expérimentale était nécessaire et a été rendue possible en 2009 par l'obtention d'un financement privé.

Ce chapitre présente le travail de conception et la mise en œuvre de l'écloserie expérimentale (figure 36), puis le développement d'un protocole fiable et reproductible de production de juvéniles, jusqu'à la maîtrise complète du cycle de vie.

Dans une perspective plus globale, le développement de l'aquaculture de *P. lividus*, comme tous les élevages, s'intègre dans les problématiques de gestion et de conservation de la ressource :

- d'une part en considérant que la capacité de produire des oursins en aquaculture diminuera la pression de pêche sur les stocks naturels
- et d'autre part en ayant la capacité de produire des individus (juvéniles ou oursins de 5 mm) qui pourront être relâchés dans le milieu naturel pour soutenir ou rétablir des populations présentant une érosion démographique trop forte.

1. L'échiniculture

La plupart des stocks des grande pêcheries se retrouvent actuellement surexploités et en déclin (Grojean 2001; Andrew et al. 2002). Ce contexte a engendré un intérêt grandissant pour l'échiniculture (culture des oursins). Au Japon, Les premiers essais ont commencé en 1962. Sur l'espèce *Pseudocentrotus depressus*, dès la fin des années 60, des programmes expérimentaux puis industriels de production de juvéniles d'oursins en aquaculture ont été développés au Japon, aboutissant à la production de plusieurs millions de juvéniles pour le réensemencement au début des années 80 (Yokota 2002a). L'échiniculture est maintenant maîtrisée dans plusieurs pays et pour plusieurs espèces soit dans un but de repeuplement du milieu naturel, soit pour produire des oursins d'aquaculture, directement commercialisables.

Malgré l'importance des techniques et les infrastructures existant au Japon pour la culture des oursins, la production d'oursin développés depuis l'œuf jusqu'à la taille commercialisable n'est pas très fréquente. La pratique la plus fréquente est la récolte d'oursins âgés de 2 à 3 ans après implantation de juvéniles de 10 à 15 mm de diamètre dans des aires de pêche limitées. La polyculture est pratiquée avec l'implantation de juvéniles dans des zones aquacoles. La densité appropriée de juvéniles lâchés est calculée à partir de la production de poissons et des communautés algales (production primaire du site pour nutrition des oursins). Les prédateurs des oursins comme les étoiles de mer sont éliminés avant l'implantation des oursins. Le milieu est donc partiellement artificialisé.

Des complexes industriels produisent les juvéniles qui sont implantés dans les fermes aquacoles. Il en existe 22 uniquement dans la région d'Hokkaido. La plus grosse entreprise produit 8 à 10 millions de juvéniles par an. En 1999, la production annuelle de *Strongylocentrotus intertidus* et *Strongylocentrotus nudus* était respectivement de 65 millions et 334 000 individus.

En complément de l'élevage, la transplantation est aussi pratiquée. Les oursins qui vivent dans un environnement avec une faible activité photosynthétique (faible production d'algues) sont généralement « maigre » (petites gonades). Ils sont donc transplantés dans des fermes aquacole avec suffisamment d'algues ou dans des cages avec de la nourriture. Après grossissement des gonades, les animaux sont collectés et mis sur le marché. Il s'agit donc d'une forme d'affinage d'oursins provenant de stocks naturels. Il a été constaté que la pratique de la transplantation provoque un déclin de la ressource (Yokota 2002a).

La Chine et l'Irlande sont actuellement les deux seuls pays au monde à avoir développé une aquaculture industrielle dont la production est enregistrée dans les statistiques de la FAO. La Chine est le principal producteur avec 3000 à 8000 tonnes d'oursins *Strongylocentrotus spp* produits annuellement, ce qui représente entre 10 et 30 millions de dollars USD par an (FAO, 2012). En comparaison, l'Irlande produit des oursins d'aquaculture à une échelle beaucoup plus artisanale. Les données enregistrées par la FAO pour les années 2001 et 2004 sont respectivement de 5 et 4 tonnes d'oursins *Paracentrotus lividus* produites.

En France, les stocks d'oursins sont en déclin et ne suffisent plus à satisfaire une demande toujours plus forte (Boudouresque & Verlaque 2007). Pour l'espèce *Paracentrotus*

lividus, le développement larvaire et l'élevage sont maîtrisés depuis les années 80 mais presque exclusivement utilisés pour des expérimentations scientifiques. Malgré la forte demande et l'important potentiel aquacole de cette espèce, « l'oursine de Ré » est la seule aquaculture d'oursin actuellement en activité en France qui produit des oursins *Paracentrotus lividus* de façon artisanale. Les oursins sont vendus à l'unité ou en conserve. L'aquaculture de *Paracentrotus lividus* est donc très peu développée.

L'élevage larvaire de cette espèce est particulièrement délicat, le développement et la survie des larves étant conditionnés par de nombreux paramètres physiques, chimiques et nutritionnels. Des verrous zootechniques limitent encore le développement de l'élevage de cet oursin, notamment la reproductibilité de l'élevage larvaire, le taux de survie à la métamorphose et les conditions d'élevage au cours des premiers mois de vie benthique.

II. L'écloserie expérimentale

L'écloserie se situe sur l'île des Embiez, accolée aux laboratoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard, dans un hall d'aquaculture constitué par une double serre de type agricole (figure 35).



Figure 35 : Localisation de l'écloserie expérimentale de l'IOPR.

Cette structure de 250m² a été conçue pour être modulable afin de répondre aux spécificités d'élevages d'espèces différentes (poissons, invertébrés), en conditions contrôlées de productions intensives et extensives, permettant la recherche et le développement aquacole (figure 36).

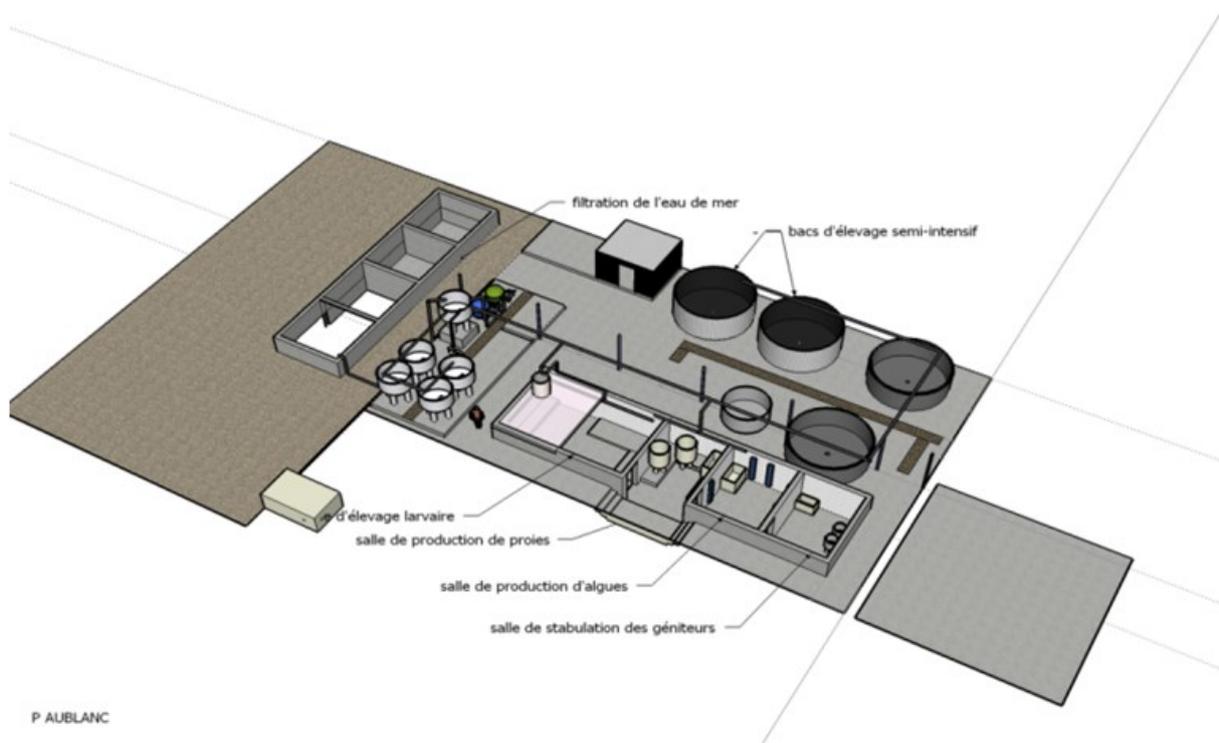


Figure 36 : Schéma de l'organisation interne de l'écloserie expérimentale de L'IOPR (© P. Aublanc, 2012).

Le pompage de l'eau de mer est effectué dans une parcelle lagunaire privée réservée aux activités de recherche de l'Institut Océanographique Paul Ricard. Cette parcelle d'un hectare, à proximité de l'écloserie expérimentale est connectée avec la lagune du Brusuc par deux buses permettant la libre circulation de l'eau de mer. Le pompage et le traitement de l'eau de mer sont réalisés en circuit semi-ouvert où seule la quantité d'eau utilisée est pompée (figure 37).

L'eau de mer arrive dans des bassins extérieurs. Le premier bassin est ouvert, d'une capacité de 20 m³, permet la décantation de la matière particulaire en suspension. L'eau passe ensuite dans un deuxième bassin fermé de 20 m³, équipé d'un système de régulation thermique (groupe froid et résistances électriques), ainsi que d'un écumeur permettant l'élimination d'une partie de la matière organique dissoute. L'eau est ensuite acheminée à l'intérieur du hall aquacole où elle passe successivement à travers un filtre à sable, un filtre

biologique ainsi qu'à travers un filtre à cartouche de porosité 20 μm . Ce dernier filtre est utilisé pour l'alimentation en eau de mer de certains bacs d'élevages semi-intensifs. Cette eau de mer filtrée est acheminée dans un bac de charge qui alimente par système gravitationnel toutes les pièces du hall aquacole. L'excédent d'eau filtrée non utilisé est réacheminé *via* une surverse dans le bassin extérieur de régulation thermique et d'écumage.

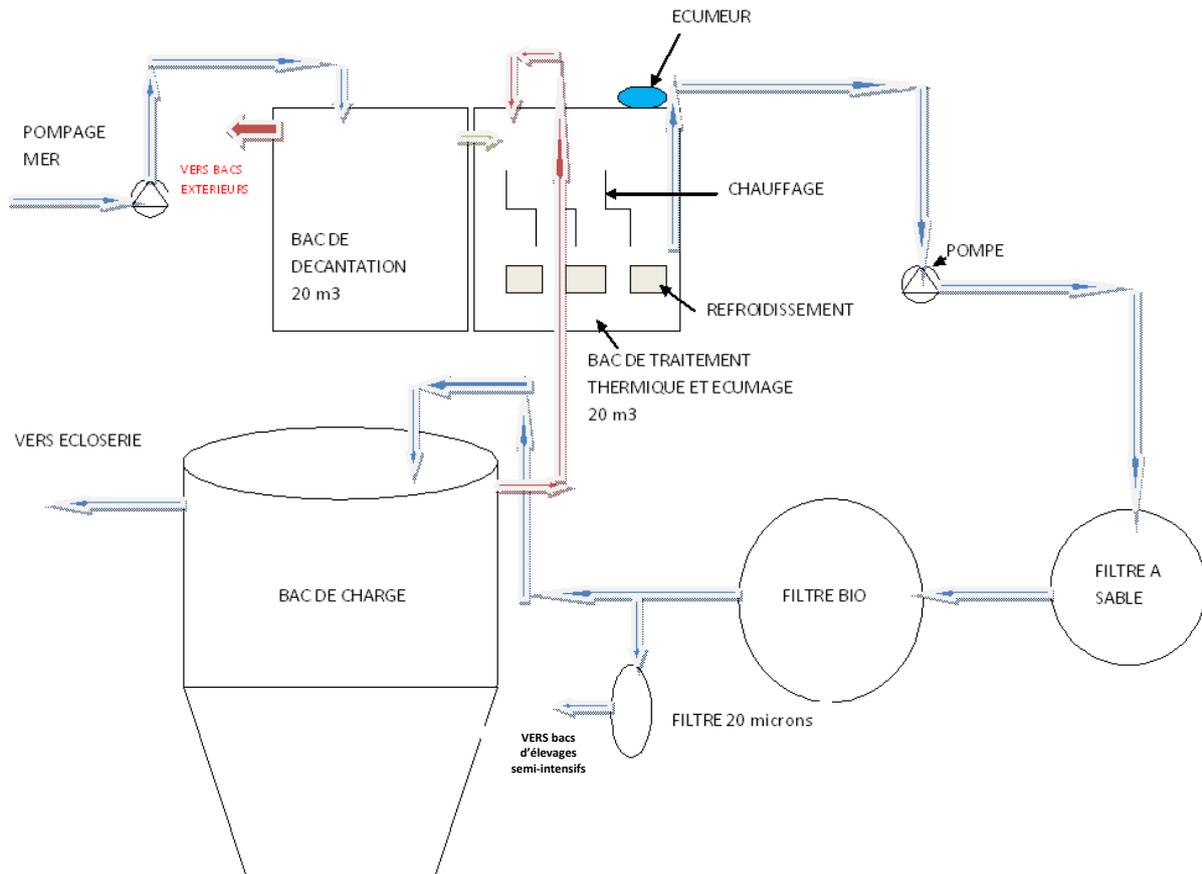


Figure 37 : Système de traitement de l'eau de mer avant distribution dans l'écloserie et hall aquacole (© P. Aublanc).

Pour l'élevage des oursins, trois pièces semi-enterrées ont été conçues et sont consacrées respectivement à la stabulation des adultes, la production de micro-algues et l'élevage larvaire et des juvéniles (figure 38). Une quatrième pièce est dédiée à la production de proies vivantes pour d'autres types d'élevages. Chaque pièce est thermo-régulée par un système de climatisation. L'eau de mer prétraitée et thermo-régulée arrivant dans chacune de ces salles va repasser dans un système de filtration adapté aux besoins des activités spécifiques. Chaque salle est munie d'un système de filtre à sable, filtre biologique raccordé si besoin à un filtre à cartouche dont la maille de filtration est modulable grâce à un jeu de cartouches interchangeables. En complément, la salle d'élevage larvaire est munie d'un filtre

UV, assurant une qualité d'eau suffisante pour l'élevage larvaire et la mise en œuvre de techniques aquacoles. Tout comme le système de prétraitement, chaque circuit est semi-ouvert, et permet un passage multiple de l'eau au travers des divers systèmes de filtration.

Chaque salle est aussi alimentée en eau douce et en air filtré sous pression provenant d'un suppresseur permettant l'oxygénation et le brassage de chacun des bacs d'élevage.

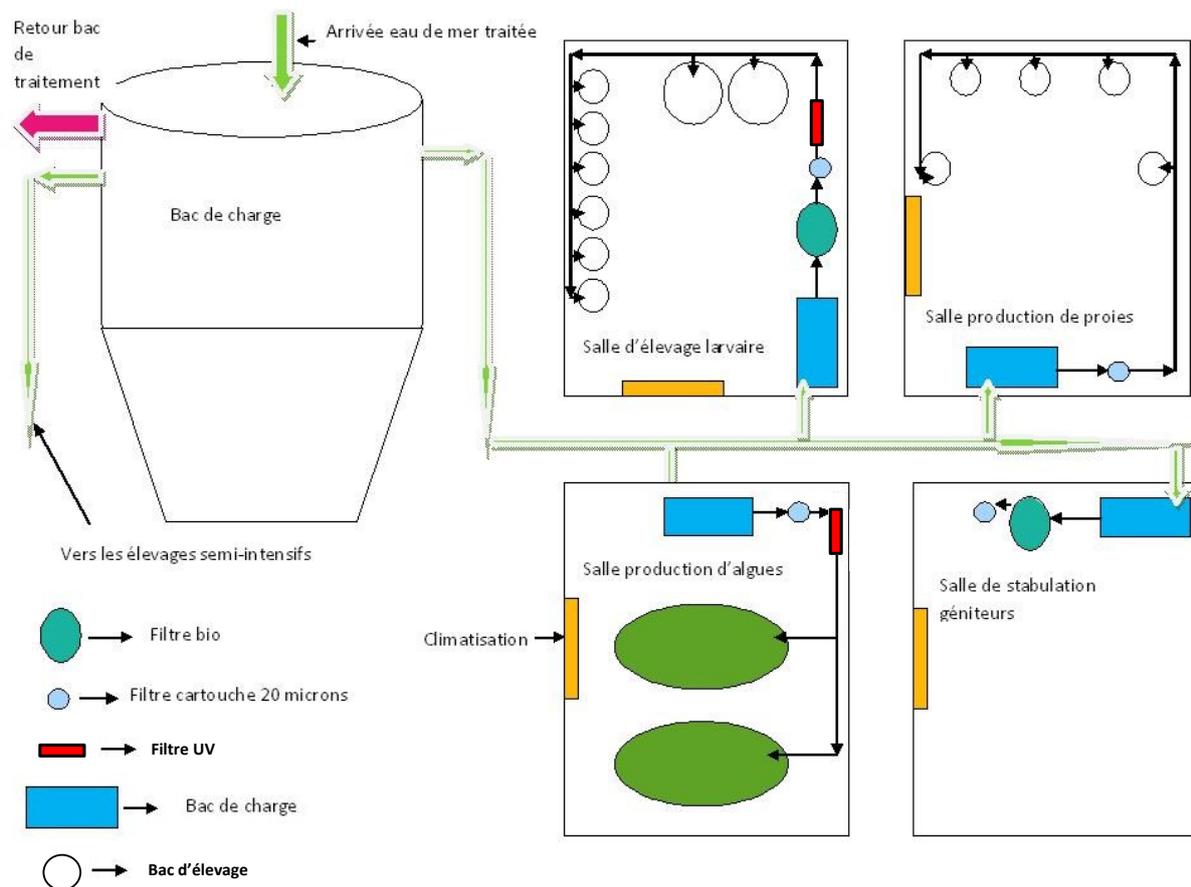


Figure 38 : système de filtration et de distribution de l'eau de mer dans les salles d'élevage (© P. Aublanc).

III. Production de juvéniles de *P. lividus*

Le développement des larves de *P. lividus* jusqu'à la métamorphose puis l'obtention de juvéniles dure environ de 3 à 4 semaines. Les larves sont sensibles à un ensemble de paramètres biologiques et physico-chimiques, notamment lors de la métamorphose, dont nous avons optimisé la maîtrise. Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à trouver une méthode rapide de production de juvéniles en grand nombre pour assurer les opérations de lâcher (cf. chapitre 3). Dans un second temps, nous avons renforcé le

développement jusqu'à obtenir en routine le cycle complet avec des F1 (première génération d'individus provenant de la reproduction et de l'élevage en éclosierie avec des géniteurs sauvages) sexuellement matures permettant d'envisager un transfert de technologies vers l'aquaculture intensive à visée commerciale (données confidentielles).

Le protocole ci-dessous présente les conditions zootechniques qui ont permis la production de juvéniles pour les opérations de lâcher ainsi que les techniques d'élevage et de grossissement des juvéniles.

1. Obtention de géniteurs, récolte des gamètes et fécondation

Les géniteurs proviennent du milieu naturel. Ils ont été prélevés autour de l'île des Embiez durant les périodes de pêche autorisées. Environ 60 individus sont conservés en stabulation dans un bassin approprié. Ils sont nourris quotidiennement par un apport d'*Ulva rigida*, une macro-algue verte commune en Méditerranée. Cette algue est cultivée dans des bassins extérieurs à l'éclosierie pour permettre un approvisionnement constant et de bonne qualité.

Plusieurs techniques permettent d'induire la ponte des oursins pour l'obtention des gamètes nécessaires à la fécondation comme les stress mécaniques, les variations de température ou encore des stress chimiques (injection de KCl).

Pour notre étude, nous avons utilisé deux techniques rapides et efficaces pour l'obtention de gamètes de bonne qualité et en quantité suffisante. La première d'entre elles consiste à agiter les oursins pendant quelques secondes et de les placer à l'envers sur des petits pots stériles en matière plastique. Ce stress va rapidement induire la ponte des individus matures. Cette technique évite de sacrifier les oursins et permet de sélectionner les géniteurs les plus féconds, et au bon stade de maturité.

Une autre technique consiste à ouvrir les oursins à l'aide d'une pince ou de ciseaux. Après examen visuel des gonades, les géniteurs les plus matures et féconds sont sélectionnés. Les gonades mâles et femelles sont incisées ; les œufs et le sperme libérés sont ensuite collectés dans des pots en matière plastique. Bien que cette technique nécessite de sacrifier les géniteurs, elle s'avère particulièrement efficace et rapide (figure 39).



Figure 39 : Récupération des produits génitaux nécessaires avant fécondation.

Pour la production de juvéniles destinés à des opérations de lâchers, il est recommandé d'utiliser un grand nombre de géniteurs (idéalement une cinquantaine) issus de la population locale, afin de limiter les risques de perturbation de la diversité génétique de la population (Le Vay et al. 2007).

L'émission des gamètes dure environ une demi-heure. Le sperme collecté est filtré sur un tamis de mailles de 30 μm pour éliminer d'éventuelles impuretés. De même, les ovocytes sont tamisés sur une maille de 70 μm et retenus sur une maille de 30 μm . La fécondation a lieu dans un seau propre de 10 L d'eau de mer (filtrée à 5 μm et traitée aux U.V) par mise en contact de la totalité des ovocytes et 2 mL de sperme. Un bullage assure le brassage et la mise en suspension des gamètes.

Deux heures après la mise en contact des gamètes, la concentration d'ovocytes et le taux de fécondation sont calculés. Avec des gamètes de bonne qualité et des géniteurs bien matures ce taux doit être supérieur à 90%. Les comptages sont réalisés à l'aide d'une loupe binoculaire sur 100 œufs.

2. Les bacs d'élevage et renouvellement d'eau

L'élevage larvaire a été réalisé dans des bacs cylindro-coniques de 80 L couramment utilisés en aquaculture. Les bacs sont munis d'une arrivée d'air afin d'assurer l'oxygénation, le brassage et le maintien en suspension des larves. Chaque bac est muni d'une arrivée d'eau de mer filtrée et d'une surverse avec une crépine de 50 μm permettant d'évacuer le surplus d'eau lié au renouvellement sans laisser échapper les larves (figure 40).



Figure 40 : Conditionnement des larves dans des bacs cylindro-coniques de 80L (© D.Kirchhofer, 2013).

Des essais sans renouvellement d'eau ont été testés, et il s'est avéré préférable d'apporter un volume d'eau de mer filtrée en continu dans le circuit afin de conserver une qualité d'eau constante et d'évacuer les éventuelles matières en suspension. Ce renouvellement est mis en place 48 heures après la fécondation, lorsque les larves ont atteint une taille supérieure à 50 μm , taille qui correspond à la maille de la crépine. Le débit du renouvellement, effectué par un système de goutte à goutte, est d'environ 1,2 L/h soit 36% du volume toutes les 24 heures.

3. Température et photopériode

L'élevage est maintenu à une température constante de 20°C. Cette température permet de garantir un bon développement des larves tout en limitant les risques de prolifération bactérienne. Les essais réalisés à des températures plus élevées (par ex. 26°C) ont permis de réduire les temps d'élevages avec une métamorphose atteinte à partir du 15^{ème} jour d'élevage à 26°C. Cependant le risque de contamination bactérienne est important et augmente considérablement le risque de malformations voire de mortalité massive, et donc de perte de l'élevage. De plus, le maintien de cette température demande un apport énergétique supplémentaire non négligeable.

La photopériode est continue (24/24h). La lumière ne semble pas influencer le développement larvaire et permet de conserver l'activité photosynthétique des micro-algues dont se nourrissent les larves d'oursins.

4. Densités d'élevage

Des expériences ont été menées avec différentes densités. Si le développement complet peut être réalisé avec environ 10 à 15 larves/mL, il semble toutefois préférable de ne pas dépasser une densité d'élevage de 5 larves/mL pour en garantir le succès. En effet, des densités plus élevées nécessitent une augmentation des apports en nourriture (phytoplancton), ce qui peut altérer la qualité de l'eau d'élevage à cause des engrais contenus dans la culture de phytoplancton (milieu de Conway) ainsi que de la différence de salinité.

Il est préférable de multiplier le nombre de bacs d'élevage pour obtenir le nombre de juvéniles désiré plutôt que de surcharger un nombre restreint de bacs.

5. Suivi des paramètres de développement larvaire

Pendant toute la durée de l'élevage, les taux de survie, d'anomalies et de retards de développement larvaires sont mesurés quotidiennement dans chaque bac. Les mesures sont réalisées en triplicat. Ces mesures sont des instantanés de la qualité de l'élevage et ne permettent pas de prédire avec précision la proportion de juvéniles que l'on va produire dans chacun des bacs.

6. Alimentation

L'alimentation larvaire est constituée du mélange des micro-algues *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana* et *Pavlova lutherii*. Les micro-algues sont cultivées au sein de l'écloserie à partir des souches monospécifiques entretenues au laboratoire dans une salle dédiée à cet effet (figure 41). Bien que ce mélange de micro-algues représente les conditions optimales pour le développement, l'alimentation mono-spécifique en micro-algues est également possible pour élever les larves jusqu'à la métamorphose.

Les cultures de micro-algues sont réalisées en grand volume dans des gaines de 80

litres. La qualité de l'alimentation étant cruciale pour les élevages, il est nécessaire de contrôler régulièrement la qualité des cultures, par exemple la recherche de contaminants ou d'agrégats de cellules mortes.



Figure 41 : Salles de production de micro- algues de l'IOPR. (©M. Delville, 2009).

L'apport de nourriture intervient à partir de 48 heures de développement, lorsque le tube digestif des larves est constitué et fonctionnel ; jusqu'à 48 heures de développement les larves se nourrissent grâce aux réserves vitellines. La quantité optimale de micro algues a été déterminée par Grosjean et al. (2001) pour *P. lividus*. Dans cette étude, nous avons ajusté l'apport en phytoplancton en fonction des conditions de chaque élevage. En début d'élevage, l'apport correspond à environ 1.10^5 cellules de phytoplancton par larve et par jour, distribué en deux fois, le matin et le soir afin de maintenir une disponibilité alimentaire suffisante et minimiser les dépenses énergétiques liées à la recherche de nourriture sans toutefois surcharger le milieu pour ne pas modifier les conditions physico-chimique de l'élevage. Le volume de culture de micro-algues à ajouter au milieu d'élevage est donc fonction de la concentration des micro-algues déjà présente, de la densité des larves dans les bacs et du stade de développement des larves.

7. La métamorphose larvaire

La métamorphose est une étape clé de l'élevage larvaire. En une vingtaine de jours, la larve plutéus acquiert progressivement 4, 6 puis 8 spicules (on parle de stades 4, 6 et 8 bras). A partir du stade 8 bras, apparaissent progressivement l'échino-rudiment et les pédicellaires. A ce stade, la larve est dite compétente et s'engage alors dans sa métamorphose pour devenir une post-larve puis un juvénile (figure 42 et 43).

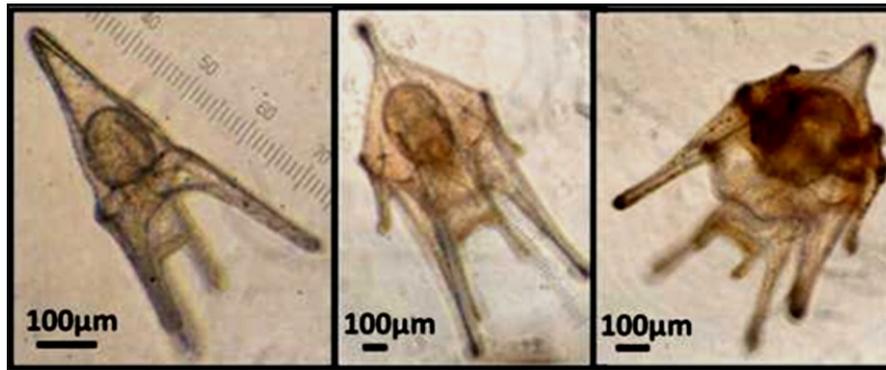


Figure 42 : Evolution des différents stades larvaires, 4, 6 et 8 bras avant métamorphose (© A. Hanz, 2013).

Lorsque plus de 80 % des larves d'un bac d'élevage sont compétentes, elles sont transférées des bacs cylindro-côniques dans des bacs rectangulaires à fond plat pour qu'elles y effectuent leur métamorphose. Dans certains cas, il arrive que les larves métamorphosent au sein même du bac d'élevage. Une manipulation plus délicate doit alors s'effectuer pour décoller les post-larves des parois et les transférer dans les bacs destinés à la poursuite de l'élevage.

Les post-larves ont la forme de petits oursins mais le développement de leurs organes digestifs n'est pas achevé. Pendant environ une semaine, elles se nourrissent de leurs réserves (phase d'endotrophie). A la fin de cette phase, les juvéniles d'oursins mesurent environ un millimètre avec leur piquants et commencent à se nourrir par broutage. A partir de ce stade, les oursins produits au sein de l'écloserie sont nourris avec des ulves (*Ulva rigida*) (figure 43). Bien qu'il soit difficile en milieu aquacole de reproduire la diversité alimentaire rencontrée par les juvéniles en milieu naturel, les tests d'alimentation effectués avec cette macro-algue se sont avérés concluants. Les détails techniques pour la production d'ulve sont décrits dans le rapport du Projet « *Oursins du soleil – Bilan expérimental* » (Miard, Couvray et al. 2013).



Figure 43 : Larve compétente à gauche et oursins métamorphosés (©T. Miard, 2012).

IV. Transfert dans le milieu naturel

Chacun des cinq sites de lâchers a été réapprovisionné avec 250 000 juvéniles produits à l'écloserie en juillet 2010 et février 2011. Le choix d'utiliser des juvéniles de 1 mm de diamètre, malgré le fort taux de mortalité lors de la première année de vie d'un oursin, a été imposé par les difficultés techniques rencontrées lors des essais de croissance des juvéniles. Au moment où ces opérations de lâchers ont été effectuées, nous ne pouvions pas encore assurer la production d'un nombre suffisant de petits oursins de l'ordre de 1 cm de diamètre pour approvisionner tous les sites de l'étude.

Le transfert d'une production aquacole dans le milieu naturel est d'autant plus complexe que l'organisme transféré est jeune et sensible aux conditions physico-chimiques qui ne sont différentes. Les juvéniles sont transportés de l'écloserie aux sites de lâchers dans les pochons au sein desquels ils ont métamorphosé. Le jour du lâcher, les pochons contenus dans des bailles de 80 L d'eau de mer aérée par des bulleurs sont transportés en bateau sur site (Figure 44).

Sur les lieux du lâcher, les pochons sont transférés dans des seaux immergés pour acclimater les oursins à la température de l'eau de mer. Un plongeur transporte ensuite les pochons jusqu'au lieu présentant l'habitat le plus propice à la survie du point de vue des cachettes disponibles et de l'accès à la nourriture. Les juvéniles sont alors déversés du pochon, à proximité immédiate du fond dans les anfractuosités des roches afin qu'ils trouvent au plus vite un abri contre d'éventuels prédateurs. En effet, lors des lâchers, on observe un nombre considérable de girelles (*Coris julis*) qui se regroupent autour des plongeurs pour tenter de manger les petits oursins.



Figure 44 : Opération de lâcher de juvéniles d'oursin. (© IOPR et D. Rebillard).

V. Discussion

Les travaux d'ingénierie aquacole réalisés pour le design et la conception de l'écloserie expérimentale au cours de cette étude ont permis de réaliser les objectifs de production de juvéniles d'oursins destinés aux opérations d'ensemencement en milieu naturel. Les améliorations techniques apportées dans les processus de pompage, de filtration, d'isolement, de thermorégulation de l'eau et de l'air, permettant l'optimisation des conditions expérimentales ont permis de faire de cette structure un outil polyvalent pour la recherche en biologie marine et le développement de techniques aquacoles.

1. Elevage larvaire

L'optimisation de notre technique d'élevage permet aujourd'hui de produire en routine des juvéniles de quelques millimètres et même si besoin des F1 sexuellement matures (rapport de production confidentiel). En regard de ces capacités à produire des oursins de bonne taille en phase finale d'élevage, on observe que les rendements de production peuvent encore être contrastés d'une production à l'autre. Ces différences de rendements peuvent avoir une origine technique, humaine (manipulation) ou liée à la

biologie de l'organisme. S'il est tout à fait envisageable que les bacs puissent être contaminés par des bactéries ou des prédateurs qui déciment les productions, il se peut aussi que des spécificités reproductives liées à l'espèce soient responsables des arrêts brutaux de développement (génotypes incompatibles). Par exemple il semble en effet qu'il existe une spécificité de reconnaissance des gamètes chez l'oursin *Strongylocentritus purpuratus* (Palumbi et al 1996), de même il a été mis en évidence le rôle de protéine Bindin dans la reconnaissance des gamète chez l'espèce *Paracentrotus lividus* (Calderon et al. 2009).

Ces disparités dans les résultats montrent que des progrès restent à accomplir pour optimiser et fiabiliser le taux de survie à la métamorphose.

Il reste néanmoins qu'à ce stade les manipulations sont faciles à mettre en œuvre, que la capacité de production est conséquente et que le temps d'élevage larvaire est relativement court (moins de 3 semaines). Ainsi, dans le cas où des anomalies de développement surviendraient dès les premiers jours de l'élevage larvaire, un nouvel élevage peut être relancé rapidement.

La production de phytoplancton nécessaire au développement larvaire doit faire l'objet d'une attention toute particulière. Il est nécessaire de disposer de culture de qualité en permanence pour assurer la réussite de l'élevage larvaire. Des tests alimentaires sont actuellement en cours pour envisager la possibilité d'élever les larves avec une alimentation de substitution (algue concentrée, lyophilisée, ou séchée) afin de se dédouaner de la production de phytoplancton.

2. Grossissement

La phase la plus délicate, tant en termes de survie que de suivi d'élevage se situe aujourd'hui dans la phase post-métamorphique. Le temps de croissance des juvéniles est relativement lent et les techniques utilisées jusqu'à présent ne permettent pas un dénombrement précis des juvéniles obtenus. De plus, en ce qui concerne l'élevage des juvéniles jusqu'à la taille adulte, la production de quantité importante de macro algues pour leur alimentation est également un facteur à prendre en compte. Il est nécessaire de bien maîtriser les cycles biologiques de certaines macro-algues comme *Ulva rigida* pour une production à plus grande échelle. Les recherches au sein de l'IOPR se poursuivent dans cette voie. Le choix de nourriture et sa disponibilité sont très importants dans le développement

des juvéniles.

VI. Conclusion

A l'heure actuelle, une seule structure commerciale de reproduction et d'élevage est identifiée sur le territoire Français. Il s'agit de « L'Oursine de Ré » située sur l'île de Ré qui commercialise sa production avec une forte valorisation économique. Actuellement, aucune autre structure ne se consacre au développement de ce secteur. Par contre d'autres structures non commerciales telles que l'IOPR ou Stella Mare (Corse) se consacrent à l'amélioration des techniques d'élevage de cette espèce.

La production de juvéniles en éclosérie sur le littoral méditerranéen est possible. L'élevage larvaire est maîtrisé mais des améliorations en terme de zootechnie doivent être apportées à la deuxième phase de l'élevage à savoir la croissance et le maintien des juvéniles.

CHAPITRE 4. EVALUATION DE LA REUSSITE ET DE L'IMPACT DE L'ENSEMENCEMENT DE JUVENILES D'OURSINS A ECHELLE PILOTE.

Article :

Couvray S. et al. (2014). Experimental larval releasing of *Paracentrotus lividus* juveniles in an exploited French Mediterranean coast. Journal of Shellfish Research (accepté).

Coupé S, **Couvray S** et al. (2011). In situ spine sampling and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) PCRs proved relevant methods for molecular studies on the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 409 : 310–314

Rapports :

COUVRAY S., et al. (2013). Evaluation des opérations de lâchers expérimentaux de juvéniles d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus*. Décembre 2013. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 35 pp.

I. Introduction

Dans le chapitre 1, nous avons montré que les populations d'oursins de la zone TPM étaient sensibles aux prélèvements, malgré une réglementation stricte encadrant les captures. Or, la pression de pêche est toujours forte sur cette ressource, entretenant les faibles densités d'adultes, indépendamment de la démographie initiale des populations impactées. Compte tenu que la présence des adultes est favorable au recrutement des larves et à la survie des juvéniles, le prélèvement des adultes engage donc mécaniquement ces populations dans une spirale d'érosion démographique (effet Allee). En effet, alors que la zone est naturellement approvisionnée en larves, dans la plupart des sites pêchés le recrutement et la survie des juvéniles sont faibles et ne suffisent pas à maintenir les stocks à des niveaux permettant leur exploitation durable (Couvray *et al.* 2014, soumis). La préoccupante raréfaction de cette ressource d'intérêt écologique, économique et patrimoniale, a incité les pêcheurs professionnels et les gestionnaires à envisager la voie du réapprovisionnement des stocks par des opérations de lâchers de juvéniles produits en écloserie.

Le soutien démographique des populations sauvages de *P. lividus* a déjà été tenté dès la fin des années 1980 par la transplantation d'oursins provenant de zones insalubres vers des zones de pêches (à Marseille) ou des réserves marines (à Monaco) (Gras 1988 ; Delmas 1992). L'objectif de ces transplantations était la détoxification et le grossissement des individus. Nous ne sommes pas réellement ici dans une stratégie de repeuplement pour reconstituer un stock de pêche durable mais plutôt dans une démarche de « sea ranching », pour compenser l'impact négatif de l'effort de pêche. Les transplantations peuvent en outre être néfastes aux populations prélevées. Cependant, dans le contexte des années 1980, où les abondances étaient très fortes, il est probable que ces opérations n'aient eu que peu d'impact. Enfin, aucune étude n'a été réellement réalisée pour évaluer l'effet des transplantations sur les populations. En 2006, un essai de repeuplement en juvéniles de *Paracentrotus lividus* a été réalisé dans la baie de La Ciotat par l'Institut Océanographique Paul Ricard avec le concours financier de l'agence de l'eau RMC et du Conseil Général des Bouches du Rhône, mais la survie des individus réintroduits et donc l'éventuel bénéfice n'ont pas pu être évalué faute d'outils de reconnaissance des individus provenant d'écloserie.

Pour favoriser le succès et les bénéfices, et minimiser l'impact d'un repeuplement, il est idéalement requis de caractériser les populations sauvages réceptrices. Ainsi, des études préliminaires concernant la dynamique des populations, la diversité génétique, la capacité de charge de l'environnement (Cross 2000; Hutchinson et al. 2001; Bravington & Ward 2004; Bell et al. 2005; Ward 2006) et les meilleures conditions de réensemencement (sites, saison, âge des individus) devraient être réalisées (Le Vay et al. 2007; Blaxter 2000). L'évaluation du succès et l'étude de l'impact du repeuplement sur les populations sont quant à elles indispensables. Elles nécessitent de pouvoir distinguer, parmi les individus d'une classe d'âge ceux provenant de l'écloserie. Dans la plupart des programmes de réensemencement, l'assignation des individus à un site de production est réalisé par télémétrie ou marquages chimiques, difficilement applicable sur des juvéniles d'oursins de petites tailles (Lorenzen et al. 2013).

Dans le cadre du programme de réensemencement entrepris par l'IOPR, nous avons donc caractérisé la diversité génétique des populations sauvages en utilisant les marqueurs microsatellites hautement polymorphes disponibles au début l'étude (Calderon & Turon 2010; Araki & Schmid 2010). Ces mêmes marqueurs nous ont permis de réaliser l'assignation parentale et ainsi évaluer la faisabilité et l'impact du repeuplement.

II. Matériel et méthode

1. Sites de réensemencement

Cinq sites du littoral TPM ont été retenus pour les lâchers expérimentaux, choisis en concertation avec les prud'homies (figure 45). Le choix a tenu compte des caractéristiques du biotope, du type de nourriture et des abris disponibles pour les juvéniles d'oursins afin de favoriser leur survie.

Les sites retenus sont : Rayolet, Rix, Bomasse, la Coudoulière et les Baux Rouges dont les caractéristiques ont été décrites dans le chapitre 1.

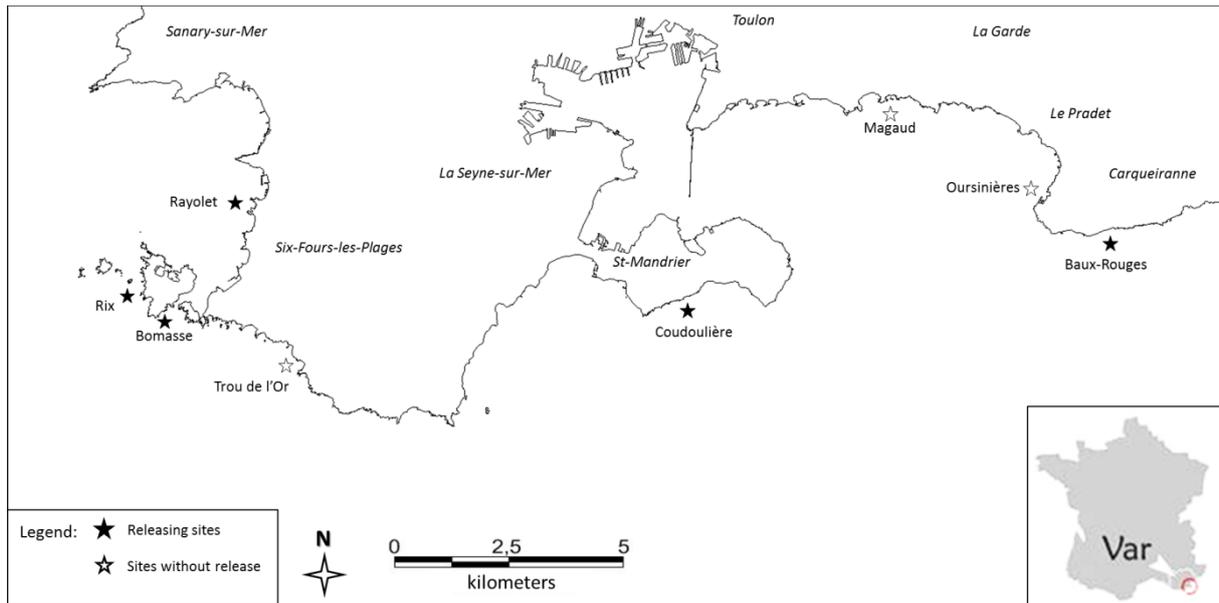


Figure 45 : Sites d'étude de génétique des populations avec et sans opérations de lâchers.

Rayolet : le lâcher a été effectué dans une petite crique, à 3 m de profondeur. La taille et la forme des roches offrent des cachettes adaptées aux petits oursins.

Rix : les fonds de la zone choisie pour réaliser le lâcher sont constitués de blocs recouverts d'algues photophiles et d'un herbier épars à posidonie de roche à environ 3 m de profondeur.

Bomasse : le lâcher a été réalisé à 3 m de profondeur sur une zone de petits blocs avec des tâches d'herbier de posidonies.

Coudoulière : les juvéniles ont été lâchés à 3,5 m de profondeur sur des fonds majoritairement constitué de gros blocs et de quelques tâches d'herbier de posidonies.

Baux rouges : la zone de lâcher se situe entre 3 et 4 m de profondeur à la limite entre la zone rocheuse à algues photophiles et l'herbier de posidonies.

2. Caractérisation des densités d'oursins et des peuplements algaux.

Pour chacun des sites, des suivis de densité et de structuration des peuplements de *P. lividus* ont été réalisés deux fois par an pendant toute la durée de l'étude afin d'évaluer l'effet des opérations de lâchers sur l'évolution des abondances d'oursins (cf. chapitre 1).

Pour estimer l'impact des oursins sur les communautés algales, des observations ont été réalisées sur chacun des sites avant les opérations de lâchers puis deux fois par an

pendant toute la durée de l'étude. Il s'agissait de déterminer le type de recouvrement algal et les éventuelles modifications pouvant être attribuées à un surpâturage des oursins en cas de forte augmentation des densités d'oursins après les opérations de lâchers.

3. Échantillonnage

Compte-tenu de l'effort d'échantillonnage et de l'impact possible sur les populations faiblement peuplées, nous avons choisi d'échantillonner les populations sauvages sans sacrifier les individus et sans les déplacer de leur population naturelle. Cela consiste à prélever quelques piquants dont la base contient de l'épiderme et des cellules musculaires. Quatre à 5 piquants suffisent pour extraire l'ADN nécessaire aux analyses génétiques. Les échantillons sont immergés dans l'éthanol absolu, et sont transportés au laboratoire dans une glacière puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN (Coupé et al. 2011).

Huit populations, dont les 5 concernées par les lâchers expérimentaux, ont été échantillonnées au cours des printemps 2010, 2011 et 2012, ce qui représente environ 630 individus. Un échantillonnage d'environ 100 à 200 petits oursins d'1 cm de diamètre a été effectué sur les populations repeuplées un an après le lâcher.

4. Extraction d'ADN et géotypage

L'ADN de chaque échantillon a été purifié avec le kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) selon le protocole « animal tissue protocol ». L'ADN a été élué dans 200 µL de tampon d'élution, quantifié au spectrophotomètre à 260 nm (Nanodrop 1000, Amersham) et la pureté des ADN a été évaluée par la mesure du ratio d'absorbance 260 nm/280 nm. Les concentrations d'ADN ont été normalisées à 20 ng/µL par dilution avec du tampon d'élution. Les échantillons d'ADN purifiés sont conservés à -80°C.

Chaque individu a été géotypé à l'aide de six loci microsatellites caractérisés par Calderon et al. (2009a) amplifiés en 3 PCR multiplexées. Les conditions d'amplifications en multiplex ont été optimisées pour la température d'hybridation, la concentration de MgCl₂ et les concentrations d'amorces, pour différentes combinaisons d'amorces (cf. Résultats et tableau 5).

Multiplex	Locus (numéro d'accès)	Séquence de l'amorce F et R (5'-3')		Motif répété	Température d'hybridation (°C)
		F	R		
Multiplex 1	PI_Hist (FJ468440)	F: ATGCACAAACGGCTCTTTTC	R: TTGCACGTTGTTTCATTGTCA	AGT(AAT)2(GAT)4AAC(AGT)2 AGCAGTACA(AGT)9CTAGTC(GTA)5	58 °C
	PI_T (FJ468439)	F: AAAGCGAGAACGGATGACTG	R: CTCTCCGTGTACGTCTGTGCG	(AG)11CG(AG)4	58 °C
Multiplex 2	PI_L (FJ468438)	F: TATTGCGCATGAGTCAGCTT	R: CGACTATCACAGCTCGCATT	(CT)5CC(CT)11	53 °C
	PI28 (FJ468442)	F: TGTATGTTTCGCTCGGACTTG	R: GTATTGCCACACGACTCTCG	(GT)2GG(GT)4GC(GT)26	53 °C
Multiplex 3	PI_B (FJ468435)	F: CCATCCTCTCTTGCAGCTTC	R: ACGGGGTCTTGATGTCAGTT	(TC)12	53 °C
	PI_C (FJ468436)	F: GCGGGTGTGTCCTGTAAGT	R: GACAAGCAAAAAGTGGCACA	(AG)13AT(AG)7AT(AG)8	53 °C

Tableau 5 : Amorces microsatellites utilisées en PCR multiplex.

Les PCR-multiplexées ont été réalisées dans un volume final de 15 µL contenant 1 µL de matrice d'ADN, 1,5 µL de tampon PCR 10X (5PRIME, Dutscher, France), 0.075 µM d'amorce sens non-marquée, 0.025 µM d'amorce sens marquée et 0.1 µM d'amorce anti-sens pour chaque amorce (Eurogentec), 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque désoxynucléoside triphosphate (Amersham, Orsay, France), et 0,6 U de Taq DNA polymerase (5PRIME, Dutscher, France). Les amorces sens (F) sont marquées par fluorescenceselon la combinaison (marqueur fluorescent) suivante : PI_L (ATTO-565) et PI_28 (Dragonfly Orange) ; PI_Hist (6-FAM) et PI_T (VIC) ; PI_B (PET) et PI_C (Ned). La PCR a été réalisée avec une phase de dénaturation initiale de 3 mn à 94 °C, suivie de 35 cycles comportant chacun une phase de dénaturation de 50 s à 94°C, une phase d'hybridation de 50 s à 53°C (PI_L + PI_28 et PI_B + PI_C) ou 58°C (PI_Hist + PI_T), une phase d'élongation de 50 s à 72°C, et pour finir une étape finale d'élongation de 5 mn à 72°C.

La taille des fragments amplifiés a été mesurée par électrophorèse capillaire sur un séquenceur 3730XL (Applied Biosystems), en utilisant le marqueur de taille standard Genscan 600LIZ (Applied Biosystems). Les pics ont été assignés avec le logiciel STRand 2.2.30©.

5. Création de la base de données

Les données brutes récoltées sous STRand 2.2.30© ont permis de créer une banque de données sous Excel©. Avant d'exploiter les données, nous avons procédé à une vérification des valeurs extrêmes, des valeurs aberrantes, d'éventuelles erreurs liées à des problèmes d'amplification ou de contamination, ainsi que la détection des pics artéfacts. Au

final, un nombre restreints d'individus et de stations ont été sélectionnés pour les analyses statistiques (tableau 6).

	2011	2012	Total
BaR	-	35	35
Bom	19	94	113
Ray	49	113	162
Mag	48	-	48
Our	23	-	23
Rix	24	80	104
Cou	21	74	95
Tro	37	14	51
Total	221	410	631

Tableau 6 : Nombre d'individus utilisés pour l'analyse statistique de génétique des populations pour les huit stations et deux années (2011 et 2012) étudiées.

6. Analyses statistiques

Les logiciels Microsatellite Tools (Excel software) et CERVUS 3.0 ont été utilisés pour organiser le jeu de données. Pour la création du fichier d'entrées pour le logiciel Arlequin 3.5 © (Excoffier et al. 2005), les tailles des allèles exprimées en paire de base (pb) ont été arrondies à la taille la plus proche attendue selon le motif de répétition.

Le nombre d'allèles par locus (N_a), les fréquences alléliques, l'hétérozygotie observée et attendue (respectivement H_o et H_e), les tests d'équilibre à Hardy-Weinberg ainsi que les tests de différenciation génétique (F_{ST}) ont été calculés avec le logiciel Arlequin 3.5 ©

La richesse allélique et le déficit d'hétérozygotes dans les populations (F_{IS}) ont été calculés avec le logiciel FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001).

Les fréquences d'allèles nuls ont été estimées avec le logiciel CERVUS 3.0. L'assignation parentale a été réalisée avec CERVUS 3.0 entre les oursins échantillonnés sur sites et les géniteurs de l'écloserie (Kalinowski et al. 2007) avec des seuils de confiance de 80 % et 95 % ($P = 0,05$).

Les analyses réalisées avec CERVUS 3.0 partent du prérequis que les fréquences alléliques pour chaque loci doivent être à l'équilibre d'Hardy Weinberg. Toutefois, CERVUS 3.0 peut tolérer une déviation modérée à l'équilibre d'Hardy Weinberg. Habituellement, les tests d'assignation parentale sont réalisés en utilisant entre 6 et 20 loci microsatellites hautement polymorphes. Dans notre cas, seulement 6 loci ont pu être utilisés. Parmi eux,

PI_B, PI_L et dans une moindre mesure PI_28 s'éloignent de l'équilibre d'Hardy Weinberg à cause d'un nombre important d'allèles nuls ou d'erreurs d'assignation de pics provoquant un excès d'homozygotie. Si l'on retire ces trois loci du jeu de données ainsi qu'il est recommandé dans la littérature (Dewoody et al. 2006), il ne reste plus que 3 à 4 loci exploitables, ce qui est insuffisant. Nous avons donc fait le choix de réaliser les calculs avec les données des 6 loci.

III. Résultats

1. Présentation du jeu de données génétiques

Les conditions de PCR multiplexées ont permis d'obtenir des profils de bonne qualité permettant une interprétation claire des électrophérogrammes pour l'assignation des tailles des pics (figure 46).

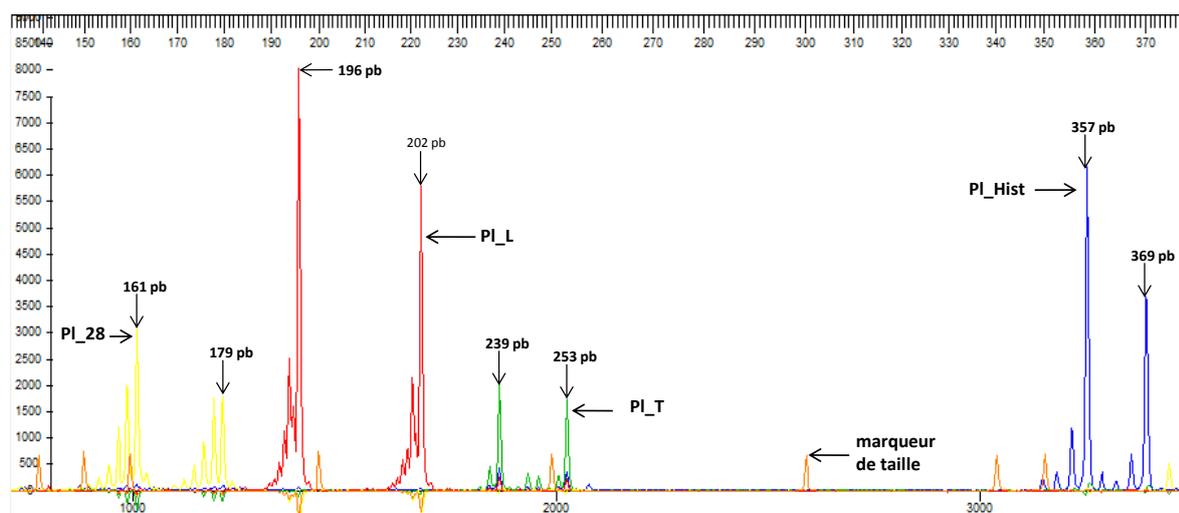
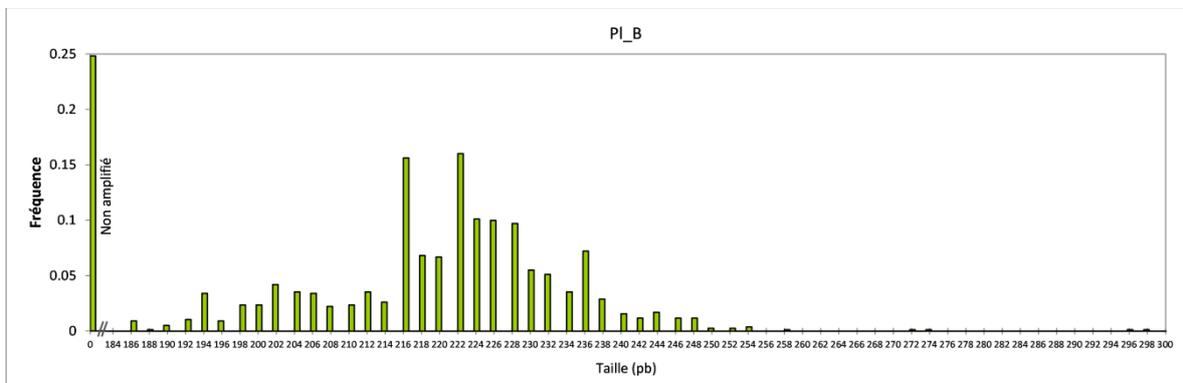
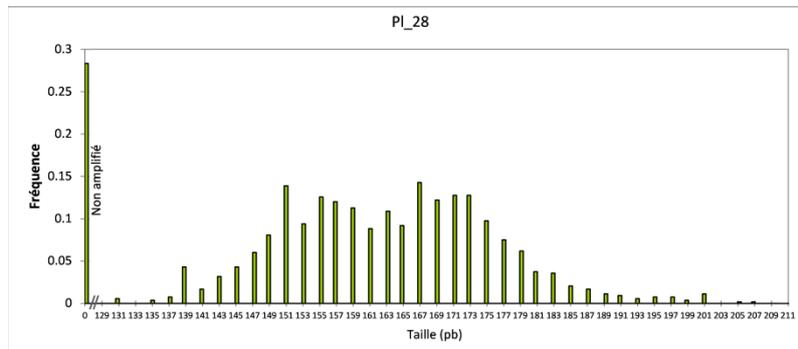
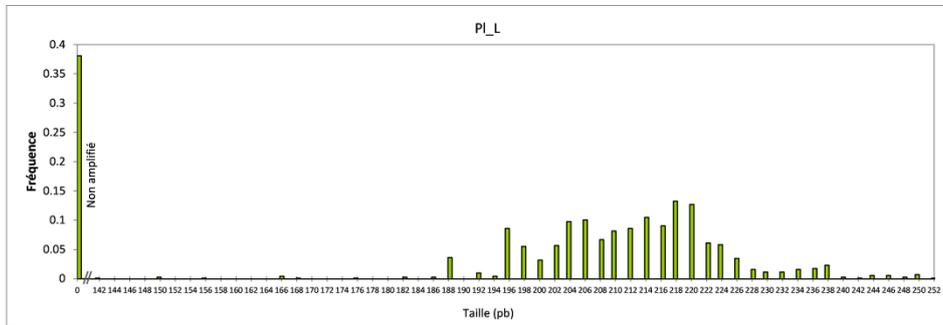
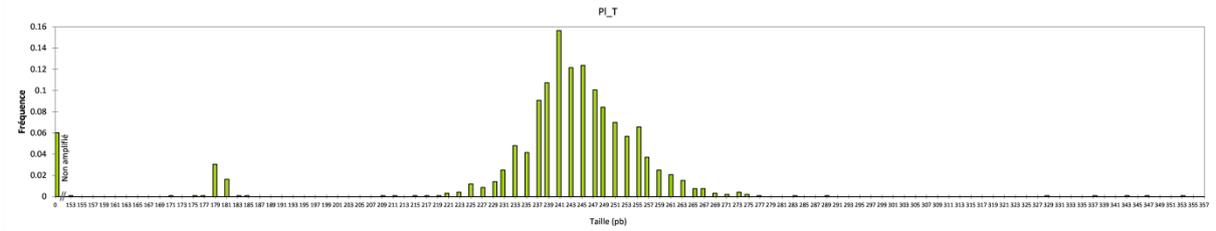
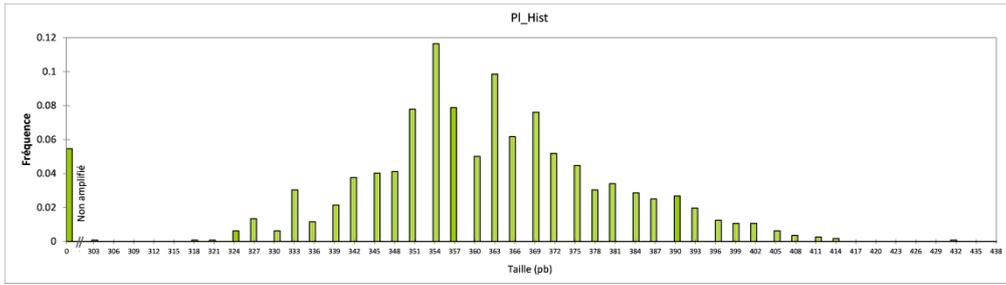


Figure 46 : Exemple de génotype parental après analyse sur séquenceur capillaire.

La lecture des électrophérogrammes de 631 individus pour chacun des loci microsatellites a permis la création d'un jeu de données utilisé pour le calcul des fréquences alléliques, utilisées par la suite pour réaliser des analyses statistiques de génétique des populations ainsi que pour l'assignation parentale (figure 47).



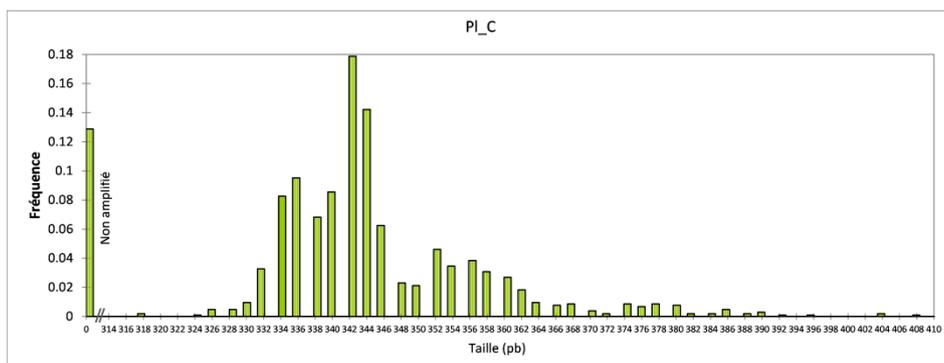


Figure 47 : Fréquences alléliques et fréquence des échecs d'amplification pour chacun des loci microsatellites (PI_28, PI_B, PI_C, PI_Hist, PI_T, PI_L) calculées à partir du génotypage de 631 individus.

Le nombre, la richesse allélique (nombre d'allèles rapporté à la taille de l'échantillon), la gamme de taille des allèles ainsi que les taux d'hétérozygotie obtenus dans les conditions de PCR multiplex sont cohérents avec ceux obtenus par Calderon et al. (2009 a, b) (tableaux 7 et 8). De même, l'analyse de l'hétérozygotie a révélé un excès d'homozygotes, particulièrement pour les allèles PI_L, PI_B et dans une moindre mesure PI_28. Pour ces trois loci, le nombre de fragments non-amplifiés ainsi que l'estimation des allèles nuls et importante (tableaux 7 et 8).

Locus	Source	Nombre d'individus	Température d'hybridation (°C)	Nombre d'allèles	Gamme de taille (bp)	H_O	H_E
PI_Hist	Couvray et al., 2014	631	58 °C	35	403-411	0.912	0.945
	Calderon et al., 2009b	148	56 °C	45	338-473	0.534	0.942
PI_T	Couvray et al., 2014	631	58 °C	49	153-353	0.854	0.937
	Calderon et al., 2009b	148	58 °C	23	160-250	0.799	0.922
PI_L	Couvray et al., 2014	631	53 °C	42	142-254	0.323	0.956
	Calderon et al., 2009a	56	54 °C	19	187-277	0.287	0.918
PI_28	Couvray et al., 2014	631	53 °C	37	131-207	0.727	0.955
	Calderon et al., 2009b	148	54 °C	32	138-192	0.609	0.954
PI_B	Couvray et al., 2014	631	53 °C	42	186-296	0.542	0.944
	Calderon et al., 2009b	148	52 °C	19	186-276	0.445	0.909
PI_C	Couvray et al., 2014	631	53 °C	37	318-404	0.877	0.924
	Calderon et al., 2009b	148	53 °C	29	331-421	0.768	0.891

Tableau 7 : Amorces microsatellites utilisé en PCR multiplex.

Diversité génétique

L'analyse génétique des individus provenant de la zone d'étude a révélé une forte diversité génétique au sein de la population générale de l'aire toulonnaise et de chacun des sites échantillonnés. Le nombre d'allèles détectés est du même ordre de grandeur pour les 6

Locus	Parametre	Bom 2011 (N = 39)	Cou 2011 (N =49)	Mag 2011 (N = 48)	Our 2011 (N = 23)	Rix 2011 (N =24)	SaM 2011 (N =21)	Tro 2011 (N =37)	All 2011 (N = 221)	BaR 2012 (N =35)	Bom 2012 (N = 94)	Cou 2012 (N = 113)	Rix 2012 (N =80)	SaM 2012 (N = 74)	Tro 2012 (N = 14)	Tout 2012 (N=410)	Tout 2011 and 2012 (N=631)
Z8	Nb. d'allèles	19	26	23	18	21	20	20	29	24	32	17	26	31	14	36	37
	Richesse allélique	16.218	14.605	14.156	13.25	14.214	14.416	12.952	28.837	14.599	14.582	13.924	13.741	14.793	12.997	33.337	33.06
	HO	0.714	0.833	0.805	0.870	0.875	0.450	0.784	0.781	0.706	0.652	0.714	0.701	0.743	0.615	0.697	0.727
	HE	0.971	0.957	0.954	0.946	0.955	0.956	0.944	0.954	0.958	0.955	0.951	0.950	0.958	0.951	0.955	0.955
	F(Null)	0.135	0.064	0.078	0.032	0.033	0.352	0.085	0.099	0.144	0.186	0.139	0.148	0.123	0.199	0.156	0.135
	FIS	0.272**	0.130**	0.158**	0.082	0.085	0.536**	0.172**	0.182**	0.266**	0.318**	0.251**	0.263**	0.225**	0.362**	0.27**	0.238**
	HW (p-value)	0.000	0.082	0.002	0.084	0.147	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
B	Nb. d'allèles	12	26	17	16	11	19	18	32	19.000	16	23	26	21	7	37	42
	Richesse allélique	10.253	14.777	10.741	12.530	8.602	13.957	12.540	31.637	12.043	10.411	11.542	12.011	11.953	6.913	30.493	35.232
	HO	0.500	0.605	0.511	0.400	0.364	0.500	0.471	0.495	0.457	0.581	0.626	0.588	0.557	0.333	0.569	0.542
	HE	0.921	0.958	0.908	0.931	0.855	0.949	0.935	0.954	0.930	0.910	0.921	0.923	0.927	0.862	0.923	0.944
	F(Null)	0.242	0.219	0.280	0.391	0.396	0.301	0.326	0.316	0.336	0.215	0.189	0.221	0.248	0.425	0.237	0.271
	FIS	0.466**	0.371**	0.440**	0.577**	0.581**	0.479**	0.500**	0.482**	0.512**	0.364**	0.321**	0.365**	0.401**	0.624**	0.383**	0.426**
	HW (p-value)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	Nb. d'allèles	13	17	21	15	16	15	20	29	15.000	20	30	28	27	13	37	37
	Richesse allélique	11.111	10.920	12.512	11.69	11.805	11.268	11.982	27.838	10.214	10.729	10.969	12.034	12.285	11.413	32.793	31.234
	HO	0.941	0.979	0.979	0.957	1.000	0.905	0.892	0.953	0.800	0.872	0.788	0.797	0.788	0.932	0.831	0.877
	HE	0.923	0.904	0.933	0.928	0.929	0.918	0.896	0.923	0.901	0.904	0.909	0.922	0.927	0.915	0.914	0.924
	F(Null)	0.025	0.047	-0.030	-0.028	-0.049	-0.006	-0.004	-0.018	0.053	0.009	0.071	0.070	-0.007	0.056	0.047	0.026
	FIS	-0.020	-0.083*	-0.050	-0.032	-0.078	0.014	0.005	0.000	0.113	0.035	0.134**	0.136**	-0.006	0.146	0.09**	0.051**
	HW (p-value)	0.254	0.939	0.092	0.574	0.656	0.157	0.596	0.057	0.475	0.482	0.009	0.017	0.649	0.148	0.005	0.006
Hist	Nb. d'allèles	14	25	25	24	19	19	24	30	24.000	30	30	27	29	15	33	35
	Richesse allélique	13.100	14.135	13.662	15.339	13.150	14.127	14.473	29.685	13.419	13.694	12.584	13.649	14.217	12.984	30.604	30.716
	HO	0.846	0.909	0.867	0.957	1.000	0.905	0.811	0.894	1.000	0.904	0.883	0.911	0.972	0.929	0.921	0.912
	HE	0.951	0.947	0.947	0.960	0.933	0.956	0.955	0.950	0.940	0.946	0.930	0.922	0.951	0.939	0.943	0.945
	F(Null)	0.042	0.014	0.040	-0.010	-0.049	0.014	0.075	0.029	0.040	0.021	0.025	0.017	-0.015	-0.013	0.011	0.018
	FIS	0.114	0.040	0.086*	0.004	-0.074	0.055	0.153**	0.060**	-0.065	0.045	0.051*	0.038	-0.022	0.012	0.023	0.036**
	HW (p-value)	0.256	0.668	0.251	0.861	0.501	0.245	0.009	0.243	1.000	0.509	0.074	0.143	0.503	0.453	0.041	0.020
L	Nb. d'allèles	14	20	18	16	13	11	20	30	15.000	24	24	25	29	12	38	42
	Richesse allélique	13.478	13.031	12.052	11.981	10.056	10.216	12.675	30.000	10.557	13.311	13.462	13.165	13.619	12.000	33.887	33.419
	HO	0.333	0.306	0.316	0.429	0.364	0.067	0.242	0.299	0.323	0.349	0.344	0.377	0.290	0.273	0.336	0.323
	HE	0.957	0.943	0.932	0.926	0.906	0.885	0.934	0.945	0.908	0.946	0.947	0.922	0.943	0.931	0.945	0.946
	F(Null)	0.469	0.505	0.487	0.363	0.423	0.855	0.583	0.518	0.469	0.459	0.463	0.425	0.529	0.533	0.475	0.490
	FIS	0.662**	0.679**	0.664**	0.543**	0.604**	0.927**	0.743**	0.684**	0.649**	0.632**	0.639**	0.601**	0.694**	0.717**	0.645**	0.658**
	HW (p-value)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T	Nb. d'allèles	11	21	26	20	17	14	22	34	20	26	31	27	26	13	42	49
	Richesse allélique	10.083	12.764	13.296	13.912	12.437	10.647	12.455	32.863	12.512	12.629	12.440	13.375	12.208	11.554	33.159	33.389
	HO	0.786	0.909	0.909	0.870	0.913	0.850	0.919	0.893	0.914	0.860	0.813	0.873	0.761	0.786	0.834	0.854
	HE	0.915	0.939	0.933	0.953	0.936	0.908	0.926	0.935	0.934	0.934	0.933	0.922	0.928	0.918	0.936	0.937
	F(Null)	0.059	0.011	0.009	0.036	0.003	0.018	-0.003	0.022	0.001	0.038	0.066	0.037	0.095	0.060	0.057	0.046
	FIS	0.146	0.033	0.026	0.089	0.025	0.065	0.008	0.046*	0.021	0.079**	0.130**	0.076**	0.182**	0.149	0.109**	0.088**
	HW (p-value)	0.433	0.841	0.605	0.148	0.899	0.719	0.970	0.737	0.145	0.008	0.018	0.148	0.046	0.332	0.000	0.000
Tout	Nb. d'allèles	13.833±2.787	22.500±3.728	21.667±3.670	18.167±3.371	16.167±3.710	16.333±3.559	20.667±2.066	30.667±1.966	19.500±4.037	24.667±6.022	27.500±3.391	26.500±1.049	27.167±3.448	12.333±2.805	37.167±2.927	40.333±5.125
	HO	0.687±0.228	0.757±0.256	0.731±0.260	0.747±0.261	0.753±0.305	0.613±0.336	0.686±0.270	0.719±0.263	0.700±0.264	0.703±0.217	0.695±0.193	0.922±0.922	0.709±0.254	0.620±0.266	0.698±0.216	0.706±0.231
	HE	0.941±0.022	0.941±0.019	0.934±0.016	0.940±0.015	0.919±0.035	0.928±0.030	0.932±0.020	0.944±0.012	0.928±0.021	0.933±0.021	0.932±0.016	0.922±0.922	0.939±0.014	0.919±0.031	0.936±0.015	0.942±0.010
	FIS	0.277**	0.198**	0.220**	0.210**	0.185**	0.347**	0.266**	0.238**	0.249**	0.247**	0.256**	0.246**	0.246**	0.335**	0.254**	0.251**

FIS:coefficient d'hybridation (FSTAT). *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

HO; HE; H-WE (p-value): Arlequin

Richesse allélique(FSTAT) par locus et population basé sur un échantillonnage minimal de: 11 individus diploïdes pour chaque population de 2011 et 2012.

177 individus diploïdes pour toutes les populations combinées en 2011, 2012 et 2011 combiné avec 2012.

Tableau 8 : Diversité génétique des peuplements d'oursins des sites de lâchers et de la population générale de la zone d'étude.

loci, compris entre 31 (PI_Hist) et 43 allèles (PI_T). La richesse allélique, calculée pour un échantillonnage minimal de 11 individus, est similaire entre station et d'une année sur l'autre, quel que soit le locus. Seules deux valeurs plus faibles ressortent de cette tendance : les richesses alléliques du site Rix en 2011 et du site Trou de l'Or en 2012 sont respectivement de 8,602 et 6,913 pour le locus PI_B (tableau 8).

Pour les loci PI_C, PI_Hist et PI_T, l'hétérozygotie observée est à l'équilibre d'Hardy-Weinberg à l'exception des sites Rayolet et Rix en 2011 pour PI_C ; Trou de l'Or en 2011 pour PI_Hist et Bomasse, Rayolet et Saint-Mandrier en 2012 pour PI_T.

Différenciation génétique entre populations

Environ la moitié des valeurs de Fst sont statistiquement significatives (40/78). Toutes sont inférieures à <0,05, ce qui indique une absence de différenciation génétique entre les populations étudiées, les variations intra-populationnelles représentant la quasi-totalité de la variabilité génétique globale. Les valeurs de Fst obtenues par comparaison du site Magot avec chacun des autres sites sont toujours très significatives. Le site Magot se situe à l'intérieur de la Grande Rade de Toulon, ce qui lui confère une localisation géographique particulière. En effet, le site est géographiquement fermé avec probablement un hydrodynamisme particulier.

De façon similaire, nous n'avons pas détecté de différenciation génétique entre cohortes temporelles, pour chacun des sites (Tableau 9). Les valeurs obtenues sont cohérentes avec un fort brassage des populations larvaires lors de leurs dispersions.

	BaR 2012	Bom 2011	Bom 2012	Ray 2011	Ray 2012	Mag 2011	Our 2011	Rix 2011	Rix 2012	Cou2011	Cou 2012	Tro 2011	Tro 2012
BaR 2012	-												
Bom 2011	0.009	-											
Bom 2012	0.009*	0.006	-										
Ray 2011	0.011***	0.003	0.011*	-									
Ray 2012	0.006	0.005	0.003	0.013***	-								
Mag 2011	0.017***	0.011*	0.021***	0.009*	0.019***	-							
Our 2011	0.013	0.013*	0.009	0.008	0.015***	0.013**	-						
Rix 2011	0.013*	0.010	0.009	0.013**	0.010	0.022***	0.012*	-					
Rix 2012	0.008*	0.004	0.002	0.008***	0.003	0.017***	0.012***	0.009*	-				
Cou2011	0.019*	0.015	0.018**	0.012	0.015*	0.016***	0.015	0.016	0.011	-			
Cou 2012	0.009*	0.009**	0.003	0.013***	0.004	0.019***	0.010*	0.008	0.002	0.014*	-		
Tro 2011	0.006	0.008	0.004	0.008	0.008	0.015***	0.014**	0.012*	0.006*	0.011	0.008**	-	
Tro 2012	0.015	0.012	0.013	0.024**	0.012	0.036***	0.023	0.019	0.010	0.03*	0.013	0.023*	-

FST. *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.

Tableau 9 : Comparaison de la structuration génétique entre échantillons de 2011 et 2012 pour chaque site de lâchers et sites sans lâchers.

Réussite et impact des opérations de lâchers

Survie des juvéniles et impact des lâchers sur la structuration génétique

Le test d'assignation parentale a mis en évidence la survie d'individus provenant de l'écloserie pour deux des cinq sites de l'étude : Rayolet et Bomasse. Les taux de recaptures sont non négligeables, représentant jusqu'à 12% des jeunes recrues (tableau 10).

Site	Niveau	Confiance (%)	LOD Critique	Assignation	Taux d'assignation
Rayolet	Assigné	95	4.67	3	2%
		80	1.5	4	3%
	non-assigné			152	97%
	Total			156	100%
Site	Niveau	Confiance (%)	LOD Critique	Assignation	Taux d'assignation
Bomasse	Assigné	95	4.67	0	0%
		80	1.5	13	12%
	non-assigné			94	88%
	Total			107	100%

Tableau 10 : Assignation parentale entre les échantillons des sites de lâchers et les géniteurs.

L'impact sur la diversité génétique apparaît limité, même pour le site Bomasse où 12% des petits oursins sont assignés à l'écloserie (tableau 9). Les valeurs de F_{ST} indiquent que les lâchers n'ont pas induit de différenciations génétiques des populations sauvages (tableau 11) même pour Bomasse, où la proportion de jeunes individus issus de lâchers n'est pas négligeable par rapport au recrutement naturel.

	Pop2011Nat	Pop2012Nat	Pop2012Tot
Pop2011Nat	0.00000		
Pop2012Nat	0.00557*	0.00000	
Pop2012Tot	0.00534*	-0.00206	0.00000

FST. *: P < 0.05.

Tableau 11 : Comparaison de la structure génétique entre la population générale de 2011 (Pop2011Nat), de 2012 sans individus issus de lâchers (Pop2012Nat) et de 2012 avec des individus issus de lâchers (Pop 2012Tot).

Impact des lâchers sur les densités de *P. lividus* et sur les communautés (macrophytiques) phytobenthiques

Pour l'ensemble des cinq sites, l'étude des densités de *P. lividus* au cours de la période d'étude ne révèle aucune variation significative de densité, aussi bien pour les petits individus (<4cm), que pour les gros (>4cm) (cf. chapitre 1). De plus, les observations faites

sur ces sites ne montrent pas de modification apparente des communautés algales benthiques. Aucun signe de surpâturage n'a été observé. Ces résultats ne montrent donc pas d'effet probant des opérations de lâchers aussi bien d'un point de vue démographique que pour l'impact éventuel sur les communautés de macrophytes. Il se peut toutefois que les individus qui ont survécu aux lâchers n'aient pas encore atteint une taille suffisante pour être observés, ou que leur nombre soit insuffisant pour augmenter significativement les densités de petits individus.

Discussion

Ce travail a permis de valider l'hypothèse que des lâchers de juvéniles peuvent être envisagés pour le repeuplement. Il montre très clairement que le succès est variable d'un site à l'autre avec des taux de recapture qui peuvent être significatifs, ce qui démontre que la diversité génétique du pool larvaire doit être bien considérée avant la réintroduction, pour éviter tout risque de dérive génétique induite.

Les oursins ont été génotypés grâce aux microsatellites décrits précédemment par Calderon et al. (2009). Pour réduire les coûts, les loci ont été amplifiés en PCR multiplexées. Pour un certain nombre d'échantillons, il s'est avéré difficile d'assigner les pics, notamment lorsque les profils comportaient des pics artéfacts d'intensités similaires aux vrais pics ou lorsque les profils comportaient des vrais pics avec de fortes différences d'intensité. Cela peut être expliqué par des conditions d'amplification de PCR multiplexées inadaptées pour ces échantillons. Les valeurs des paramètres de génétique des populations (intra- et inter-populationnels) obtenus avec les conditions de PCR multiplexées sont toutefois en accord avec les résultats des études similaires (Calderon et al., 2009a,b).

Le faible niveau de différenciation génétique des populations observé dans cette étude est un résultat cohérent à la fois avec le mode de dispersion larvaire de cette espèce et la proximité spatiale des populations étudiées. En effet, la distance parcouru par dispersion au cours des trois semaines de vie larvaire est potentiellement plus grande que l'étendu de la zone d'étude.

Parmi les six loci microsatellites utilisés, trois d'entre eux se sont montrés peu informatifs du fait de la forte proportion d'homozygotes observés, probablement dû à un

excès d'allèles nuls, et provoquant un déséquilibre à Hardy-Weinberg. En fait, nous estimons que l'écart à l'équilibre Hardy-Weinberg est en réalité faible ou non significatif, puisque les trois autres loci qui ont correctement amplifié ne présentent pas de déséquilibre à Hardy-Weinberg (Pemberton et al. 1995). Bien que l'analyse ait été réalisée avec un nombre limité de loci microsatellites, cette faiblesse est contrebalancée par un haut niveau de polymorphisme des loci ainsi que par le nombre élevé d'individus échantillonnés.

Les résultats des tests d'assignation parentale ont mis en évidence qu'en certains sites, des juvéniles d'oursin *P. lividus* provenant d'écloserie et lâchés en milieu naturel peuvent survivre, grandir et s'intégrer à la population sauvage. Toutefois, ces résultats ne nous permettent pas en l'état de savoir si les individus provenant des lâchers vont intégrer la population de géniteurs et contribuer à la production de la génération suivante.

Le recrutement naturel n'a pas été évalué dans cette étude compte tenu des difficultés techniques que cela représente. Par conséquent, on ne peut pas extrapoler l'efficacité des lâchers du point de vue quantitatif (taux de survie des individus lâchés) puisqu'on ne sait pas dans quelle proportion les individus lâchés ont été dilués dans la cohorte naturelle.

Bien qu'aucun individu issu de lâchers n'ai été retrouvé pour les sites Rix, Coudoulière et Baux Rouges, il se peut que l'échantillonnage n'ait pas été assez représentatif des individus présents sur la zone et n'ait pas permis de retrouver des individus provenant de l'écloserie. En effet, pour ces sites où la topographie des fonds est constituée de gros blocs (particulièrement Coudoulière et Baux-Rouges), il s'est avéré difficile de dénicher les petits individus pour l'échantillonnage de matériel génétique. Toutefois, le recrutement et la survie de juvéniles ont bien lieu sur ces sites puisque les densités d'oursins de taille comprise entre 1 et 4 cm sont du même ordre de grandeur que pour tous les sites de lâcher (voir chapitre 1). Aussi, on peut considérer que lors des campagnes d'échantillonnage, la probabilité de retrouver des individus issus de lâchers n'est pas influencée par la densité des recrues naturelles.

L'étude génétique n'a pas révélé d'appauvrissement de la diversité génétique des peuplements naturels pour les sites où des individus issus de lâchers ont survécu. L'introduction de juvéniles n'a pas induit de modification significative de la structuration génétique des peuplements bien que la proportion de ces jeunes individus soit parfois assez importante par rapport au recrutement naturel (sites Rayolet et Bomasse). Les opérations de

lâchers réalisées dans cette étude n'ont donc pas perturbé la diversité génétique de la population locale.

Pour le site de la Bomasse où 12% des individus échantillonnés en 2012 sont reconnus comme provenant de l'écloserie, on peut conclure à un bon succès de l'opération de repeuplement. Les résultats présentés ici sont issus du traitement d'une seule campagne d'échantillonnage pour l'identification d'individus provenant de lâchers. Maintenant qu'il est montré que des individus ont survécu, de nouvelles campagnes d'échantillonnages plus importantes sont à prévoir. La campagne à venir permettra de confirmer les premiers résultats et de rechercher à nouveau des individus issus de lâchers qui auraient survécu, grandi et intégré la population sauvage, même pour les sites où cette première analyse n'a pas permis d'en retrouver.

Au vu de ces résultats, des opérations de lâchers de juvéniles d'oursins *P. lividus* pour soutenir ou restaurer une communauté naturelle semblent réalisables d'un point de vue technique. En tenant compte des recommandations sur la provenance et le nombre de géniteurs, le risque de perturbation de la génétique des populations réceptrices peut être maîtrisé, et permet d'envisager des lâchers expérimentaux à plus grande échelle.

DISCUSSION GENERALE

Les compétences développées au cours de cette thèse ont été très diverses : ingénierie aquacole, suivi démographique, caractérisation de diversité génétique des populations, réalisation des opérations de réensemencement et étude de l'impact sur les stocks naturels. Cette diversité de compétences reflète le caractère multidisciplinaire que requiert la biologie de la conservation et la gestion des ressources biologiques.

Contrairement à d'autres espèces marines ou terrestres, *P. lividus* n'est pas menacé d'extinction à l'échelle de l'espèce dans le bassin méditerranéen. Cependant, les différentes pressions qui pèsent sur la ressource peuvent engager localement une population, ou un ensemble de populations, dans une spirale d'extinction provoquant la diminution constante des effectifs, et finalement risquer d'aboutir au même collapse que celui observé en Bretagne il y a 40 ans.

La gestion des ressources nécessite donc un suivi régulier et à long terme afin de pouvoir anticiper et ajuster au mieux les mesures de gestion. C'est dans ce contexte que les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été conçus.

Dans cette partie de discussion générale, nous ferons le point sur les avancées réalisées au regard des objectifs initiaux. Nous présenterons ensuite notre conception d'une gestion durable de la ressource oursinière, en considérant aussi les changements environnementaux annoncés. Enfin, nous exposerons les perspectives de recherches, dont certaines sont déjà engagées, qu'ouvre ce travail sur la dynamique et la structuration génétique des populations à grande échelle et les applications à la gestion des organismes benthopélagiques exploités.

Etat de la ressource dans l'aire toulonnaise et effet de la pêche.

Cette étude est la première qui décrit l'état et la structuration des stocks d'oursins en zone exploitée et anthropisée de l'aire toulonnaise (département du Var), en considérant deux classes de tailles correspondant au stock de pêche et au stock de renouvellement. Les données obtenues durant trois années de comptages bisannuels montrent que les

populations sont structurées très clairement en fonction du biotope et de la profondeur, l'essentiel des effectifs étant localisé à faible profondeur sur des substrats rocheux, et que les densités observées sont variables d'une population à l'autre au sein de la zone exploitée.

Notre analyse semble indiquer que les facilités d'accès à la ressource influencent négativement les densités des stocks de pêche mais aussi des stocks renouvelables, probablement en raison de la sensibilité des oursins à l'effet Allee (Allee 1931 ; Bostford et al. 2004 ; Kramer et al. 2009). Celui-ci s'exprime par une densité dépendance vis-à-vis des individus de grande taille aussi bien pour l'efficacité de reproduction que pour le recrutement. C'est à dire que la productivité et la résilience des stocks sont d'autant plus faibles et lentes que les peuplements sont affaiblis. Le maintien des peuplements à des niveaux bas, entretenu par l'activité de pêche, augmente donc le risque d'effondrement des stocks, tel qu'il s'est déjà produit en Bretagne et en Irlande malgré l'arrêt des captures (Allain 1975 ; Andrew et al. 2002 ; Williams 2002 ; FAO 2012).

Ainsi, dans l'aire toulonnaise, même si à première vue l'activité de pêche ne semble pas induire de diminution directe de la ressource, les faibles densités de *P. lividus* rencontrées actuellement révèlent une sensibilité des stocks vis-à-vis du prélèvement.

Pour autant, les densités de populations actuellement mesurées sont-elles anormales ? Par comparaison avec les données historiques disponibles, il semble que les populations les moins accessibles de notre étude présentent des densités de populations comparables à celles des populations de Port-Cros et de Porquerolles (Hereu et al. 2005 ; Hereu et al. 2006). Avant les grands épisodes de maladies des oursins chauves dans les années 1970-80 et les premiers signes de surexploitation de la ressource, les densités étaient excessivement élevées (Hereu et al. 2005), artificiellement entretenues par l'enrichissement en matière organique provenant du déversement des eaux usées brutes non épurées dans les eaux côtières (Harmelin et al. 1981). Aujourd'hui, cette tendance est encore observée au droit des émissaires de stations d'épuration où la concentration en matière organique est importante et où la pêche est interdite. Ces fortes densités d'oursin étaient aussi entretenues par un déficit de prédation causé par plusieurs siècles de d'exploitation par l'homme des stocks de poissons commercialisables, dont *Diplodus sargus*, principal prédateur des oursins en Méditerranéen (Campillo et Bigot 1992 ; Farrugio et al. 1993 ; Pinnegar et al., 2000).

Dans les aires marines protégées (AMP), où la qualité de l'eau est considérée comme bonne, et où les abondances et la tailles des poissons prédateurs sont supérieures à celles rencontrées en zones pêchées, les populations d'oursins peuvent être de densités plus faibles celles rencontrés en zones proche de rejet de station d'épuration ou celles rencontrés dans les années 1970 (Sala & Zabala 1996 ; Sala et al. 1998 ; Sala et al. 1998 ; Hereu et al. 2005). Au cours des quarante dernières années, les prélèvements par la pêche aux oursins ont contrebalancé le déficit de prédation provoqué par le manque de prédateurs naturel, ramenant les densités d'oursins à des niveaux plus proche de ceux observés dans des AMP établies telles que le Parc national de Port-Cros ou les îles Mèdes (en Espagne) (figure 48, 49, 50 et 51).

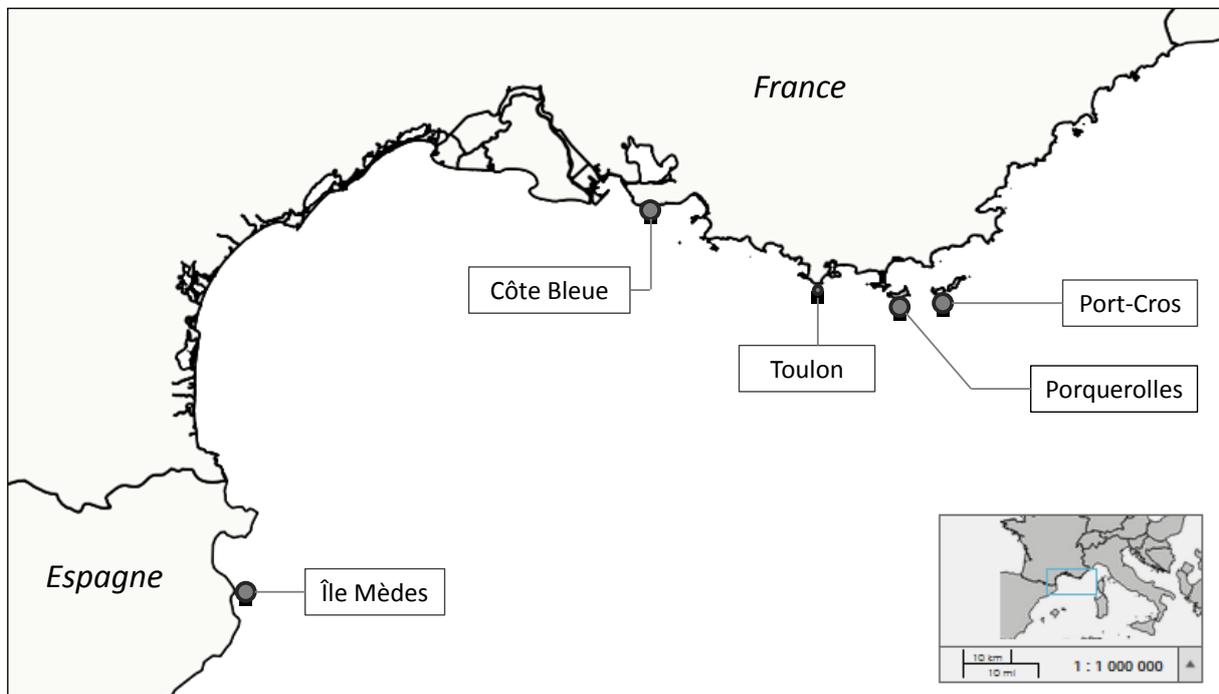


Figure 48 : Localisation géographique des principaux sites ayant fait l'objet de suivis de densités d'oursins *Paracentrotus lividus*.

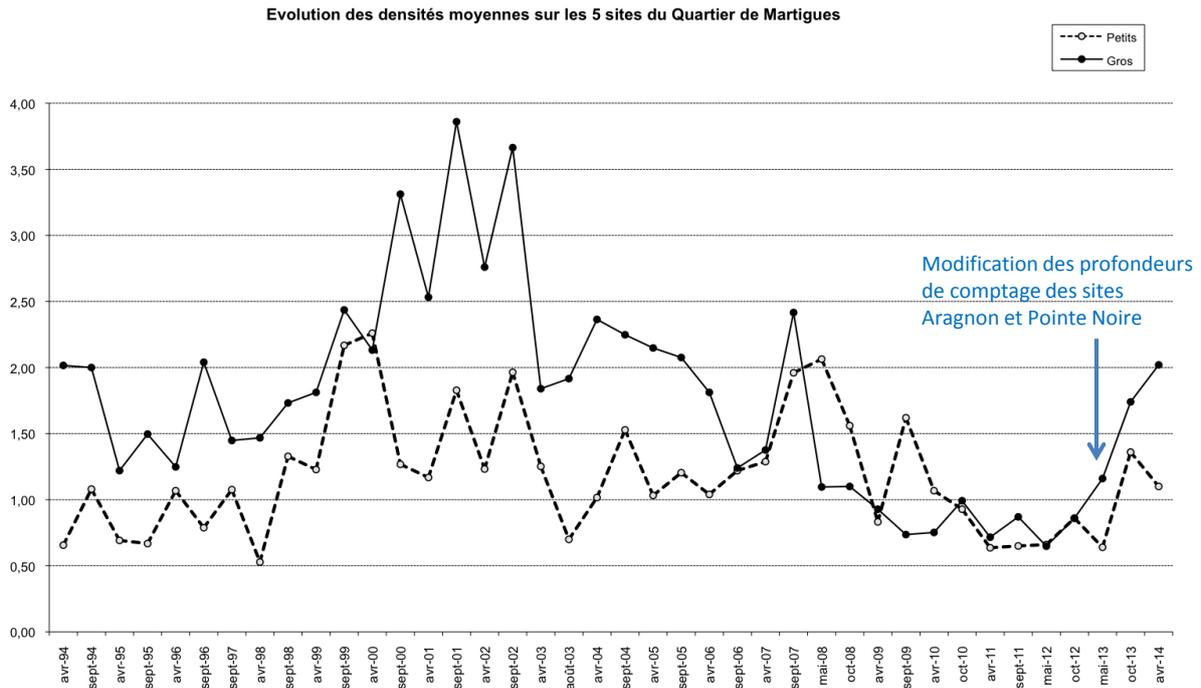


Figure 49 : Evolution des densités moyennes d'oursins (ind./m²) dénombrés selon deux classes de tailles (gros > 40 mm, petits < 40 mm) sur les 5 sites du secteur maritime de Martigues (d'après Bachet et al., 2014)

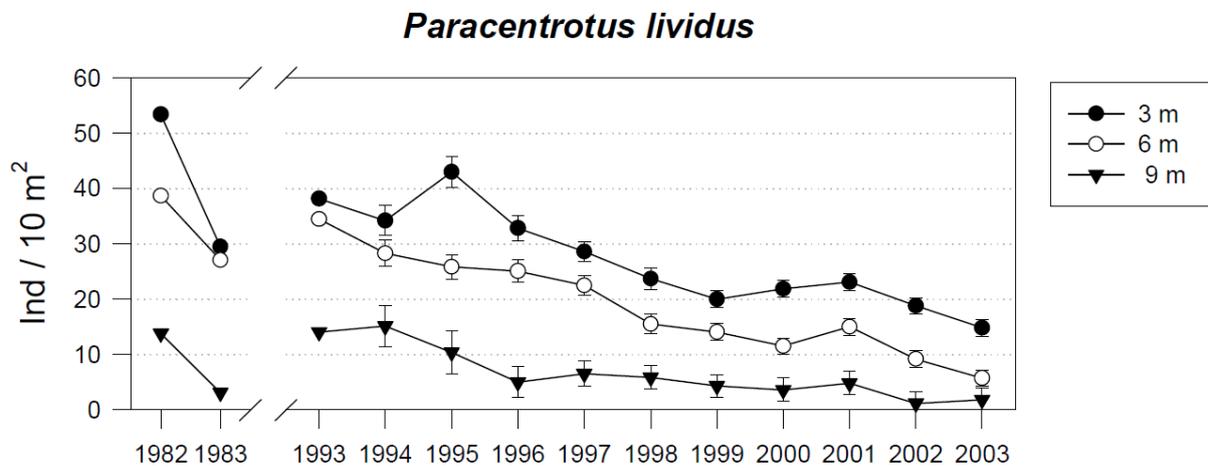


Figure 50 : Évolution temporelle de la densité moyenne (Ind./10m² ± e.s.) de *Paracentrotus lividus* à trois profondeurs, autour de l'île de Port-Cros (d'après Hereu et al., 2005).

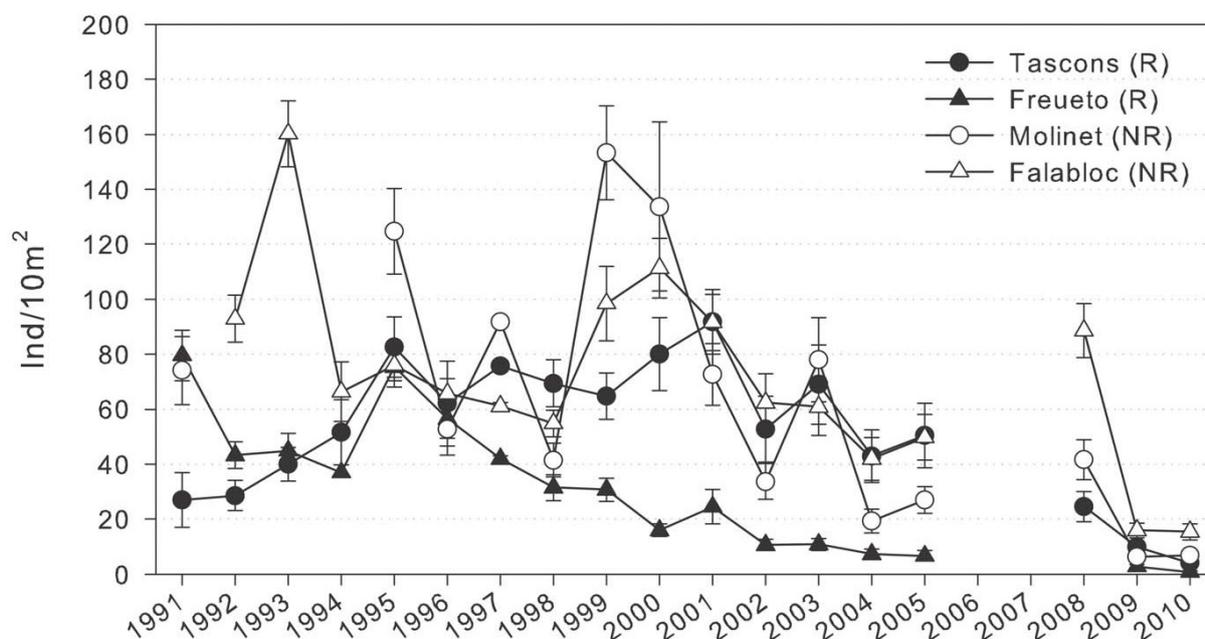


Figure 51 : Evolution des densités de *Paracentrotus lividus* à l'intérieur de la réserve des îles Mèdes (Espagne, Nord-Ouest Méditerranée) (symboles noir) et à l'extérieur de la réserve (symboles blanc), sur substrat rocheux (d'après Hereu et al., 2012).

Dans ce contexte, il apparaît difficile d'estimer un niveau de densité de population d'oursins de référence.

Le suivi mis en place au cours de cette thèse a apporté les premières données d'abondance, de structuration et d'évolution démographique des populations d'oursins de l'aire toulonnaise. Cependant, plusieurs données manquent encore pour décrire suffisamment la dynamique des populations dans cette zone d'étude, sur le long terme. D'abord, nous devons inclure au moins une zone de non-prélèvement éloignée des sources de pollutions organiques, située hors d'une réserve intégrale et facilement accessible. Les sites de cette zone seront de vrais points de références qui manquent actuellement dans notre étude. Cela permettra de mieux évaluer la productivité des sites, c'est à dire leur capacité de charge, l'effet de la pêche sur les peuplements, ainsi que leur capacité de résilience. Ensuite, il serait utile de connaître le niveau et la saisonnalité des recrutements naturels sur chacun des sites suivis, ce qui permettrait aussi d'estimer les taux de survie à un an. Nous ne disposons pas non plus de données sur les vitesses de croissance des oursins en fonction des sites ce qui pourrait avoir une importance sur la capacité de résilience des sites.

Aquaculture et lâchers expérimentaux de juvéniles d'oursins à l'échelle pilote.

Malgré l'apparente faisabilité et la réussite des opérations de lâchers de juvéniles d'oursins, il n'est pas clairement démontré que ce genre d'action augmente significativement et rapidement les stocks de pêche tels qu'attendus par les pêcheurs professionnels. La demande en oursins étant toujours plus forte, la voie de l'aquaculture apparaît comme une alternative. Une seule ferme aquacole d'oursin *P. lividus* existe en France et se situe sur l'île de Ré. A l'examen des résultats des expérimentations sur la production de juvéniles et des essais d'affinage d'oursins récemment réalisés à l'Institut Océanographique Paul Ricard (Miard et al. 2013), l'aquaculture d'oursins sur le littoral méditerranéen est peut être une opportunité plus réaliste que le repeuplement.

Les avancées zootechniques pour la culture de cette espèce permettent aujourd'hui de produire à échelle pilote des oursins adultes. Dans les années à venir, l'effort devra être porté sur le transfert de ces connaissances pour le développement d'une activité aquacole rentable. Le développement d'écloseries pourrait être envisagé à la fois pour fournir du « naissain » aux aquacultures mais aussi pour fournir des juvéniles aux programmes de réensemencements.

La construction et la mise en service de l'écloserie expérimentale nous a permis de travailler au développement des techniques d'élevages qui nous permettent aujourd'hui de maîtriser le cycle complet de développement, en conditions entièrement contrôlées. Avec « l'oursine de Ré » située sur la façade atlantique, qui a une activité commerciale de production d'oursins (environ 5 tonnes/an), l'IOPR est la seule structure à avoir développé sa capacité aquacole à des fins de productions, grossissement et affinage d'oursins de tailles commercialisables. Plus récemment, la plate-forme Stella-Mare, située en Corse commence à développer des recherches similaires.

Dès le début du projet, nous avons focalisé la recherche et le développement sur la capacité de produire un grand nombre de larves de bonne qualité, sur les modalités de transfert des juvéniles de l'écloserie vers le milieu naturel et sur l'étape de métamorphose et de croissance de juvéniles. Les conditions de productions et de transfert des juvéniles ont été vite maîtrisées, au contraire de la production d'oursins de taille comprise entre 5 et 10 mm. Au moment des opérations de réensemencement, nous avons été contraints de

relâcher des juvéniles d'environ 1 mm de diamètre au lieu d'individus plus gros (au moins 5 mm de diamètre), pourtant plus aptes à survivre.

Les lâchers de juvéniles représentent un acte pouvant avoir des conséquences importantes sur une ressource naturelle. Certaines précautions sont donc requises, notamment en l'absence de données sur les niveaux de recrutement naturels, les taux de survie, la vitesse de croissance, les capacités de charge des milieux récepteurs ou la structuration génétique des populations. En effet, l'oursin *Paracentrotus lividus* étant une espèce clé dans la régulation des peuplements algaux et de l'écosystème associé, toute variation d'abondance peut avoir des conséquences sur les communautés benthiques infralittorales et par conséquent sur d'autres ressources marines exploitées par la pêche aux petits métiers. Il a déjà été rapporté dans le passé, notamment en Grèce, des plaintes de pêcheurs à cause de la surpopulation de cette espèce, appauvrissant le milieu (Le Direac'h et al. 1987). Les opérations de lâchers doivent être réalisées en adéquation avec l'ensemble des mesures de gestion du milieu naturel et des ressources marines. Sur le plan génétique, l'apport de nouveaux individus peut modifier la diversité génétique de la population receveuse ou impacter indirectement celle des populations voisines.

Nous avons donc pris un ensemble de précautions visant à limiter l'impact sur l'écosystème et sur la diversité génétique des populations naturelles (Blankenship & Leber 1995 ; Lorenzen et al. 2010). Ainsi, 250 000 juvéniles ont été produits pour chacun des sites de lâchers, à partir d'un nombre conséquent de géniteurs prélevés dans l'aire d'étude, en partant de l'hypothèse que ce nombre serait suffisant pour pouvoir recapturer des petits oursins un an après l'opération.

Notre analyse génétique (assignation parentale) a permis l'identification de petits oursins provenant de l'écloserie sur 2 des 5 sites de l'étude et montre qu'ils peuvent contribuer pour une part importante à la population totale. Ces résultats valident ainsi l'hypothèse qu'un soutien aux populations par le réensemencement de juvéniles est possible, et sans induire de modification de diversité génétique, en tout cas vis à vis des marqueurs suivis et à cette échelle.

Toutefois ces essais de repeuplement doivent être considérés comme une première approche comme outil de gestion de la ressource. Pour les développer, il faudra pouvoir disposer de données complétées et plus fines en termes de dynamique et de structuration

génétique des populations. Par exemple, la connaissance des taux de survies larvaires et de la capacité de charge d'un site permettraient de mieux dimensionner les lâchers. De même, une meilleure caractérisation de la diversité génétique devra être réalisée, par exemple en prenant aussi en compte la diversité haplotypique mitochondriale, voire des régions du génome non-neutres.

Le réensemencement des populations par des individus plus âgés peut également être envisagé. Bien que le coût de production soit plus élevé, le rendement final peut être bien supérieur à celui obtenu avec des lâchers de post-larves. Les juvéniles de plusieurs millimètres sont plus facilement manipulables et pourraient être disposés directement à proximité des adultes, favorisant leur survie au moment du lâcher.

Un autre avantage d'utiliser des individus plus âgés est qu'il est possible d'utiliser des méthodes de marquage alternatives au génotypage, par exemple en utilisant la tétracycline (Calderon et al. 2009). Cela permettrait d'évaluer la réduction éventuelle de diversité génétique pouvant résulter d'une baisse de fitness liées à l'élevage, uniquement sur les individus recapturés provenant de l'écloserie.

De manière générale, l'analyse génétique demeure nécessaire quel que soit l'âge des individus relâchés, pour s'assurer de l'absence de dérive génétique au cours de l'élevage.

Enfin, dans l'optique de mieux caractériser les populations, la capacité d'identifier des individus marqués ou dont le génotype est connu permettrait d'envisager des mesures d'effectif global d'une population par des méthodes de type « capture-marquage-recapture » et ce pour plusieurs classes de taille différentes.

Proposition de méthodes de gestion de la ressource

Dans l'aire Toulonnaise étudiée, certains sites sont constamment dépeuplés bien que l'apport larvaire semble assez conséquent, si on se fie à la densité de populations de petits oursins rencontrés au Cap Sicié (chapitre 1). Les mesures de gestion actuelles apparaissent donc insuffisantes pour maintenir les stocks à des niveaux permettant une exploitation durable et rentable de la ressource, et rien ne laisse présager une inversion de cette tendance puisque les stocks continuent d'être exploités malgré leur moindre productivité et les faibles niveaux de recrutement.

D'autres mesures de gestion complémentaires devraient être envisagées pour limiter les prélèvements et restaurer la dynamique de croissance des populations. Compte-tenu de la pression de pêche actuelle et de l'état des stocks, il semble illusoire de pouvoir inverser la tendance sans mesure d'interdiction locale et temporaire de l'activité de pêche, malgré l'application de mesures compensatoires telles que les opérations de lâchers. Concernant les sites dépeuplés, l'interdiction pourrait durer le temps de reconstitution du stock, de l'ordre de 5 années, temps nécessaire aux nouvelles recrues pour atteindre la taille commercialisable (Grosjean et al. 2003 ; Ouréns et al. 2013). Ainsi, des cantonnements de pêche spécifique à cette espèce pourraient être appropriés pour empêcher l'effondrement des stocks et maintenir l'activité de pêche rentable et durable (Quinn et al. 1993 ; Pfister 1996 ; Bostford et al. 1999). Ouréns et al. (2015) fait aussi la promotion d'un réseau de cantonnements, ce qui permettrait la mise en place d'un système d'exploitation par rotation. Ces zones de cantonnement sont assez similaires à des aires marines protégées et on voit vite que les questions d'organisation spatiale de ces zones présentent les mêmes problématiques de connectivités rencontrées dans le design des réseaux d'AMPs. En outre, pour que les cantonnements soient efficaces, ils doivent être placés à la fois sur des zones où les densités d'oursins sont suffisantes pour assurer un taux de croissance efficace de la population, mais aussi en zone à forte disponibilité d'habitat.

Ce type de mesure pourrait ainsi permettre aux stocks de se régénérer naturellement. Enfin, dans une stratégie d'exploitation durable, le prélèvement dans chaque site ne devrait pas excéder le seuil de densité pour lequel les oursins ne peuvent plus assurer d'agrégats fonctionnels assurant le succès des nouvelles cohortes.

Dans les zones fortement dépeuplées et où le recrutement naturel est faible, la voie du repeuplement semble envisageable et pourrait renforcer l'action des cantonnements de pêche. Pour que ce type d'opération soit efficace à la fois sur le plan écologique et économique, les programmes de réensemencement doivent être réalisés sur plusieurs années en tenant compte des recommandations requises (Blankenship & Leber 1995 ; Lorenzen et al. 2010). Ainsi, si dans les années à venir, des programmes de lâchers sont envisagés, des études plus poussées devront être entreprises en amont pour déterminer les outils de gestion complémentaires à instaurer pour en assurer le succès. Une étude socio-économique devra évaluer les coûts et bénéfices engendrés pour déterminer la rentabilité

de telles opérations et prendre les décisions appropriées. Le suivi de la dynamique et de la génétique des populations ainsi que celui des indicateurs de l'état de l'écosystème devront être réalisés pour évaluer régulièrement l'impact et le résultat de telles opérations.

Sur le plan sociétal ces pratiques donnent lieu à des questions éthiques légitimes liées au risque de perte ou d'altération d'un stock génétiquement sauvage unique (Micael et al. 2009). S'il est aisé de reconnaître l'utilité de l'intervention humaine sur des espèces en danger d'extinction ou en extrême raréfaction, la réintroduction d'individus dans le milieu naturel pour assurer le maintien des stocks de pêche peut être mal perçue, même si le risque de collapse est réel. Il sera intéressant de développer des recherches en science humaine pour évaluer le niveau d'acceptabilité de ces pratiques de gestion, d'autant plus qu'elles s'insèrent aujourd'hui dans le contexte des changements globaux, dont l'influence sur les ressources naturelles est déjà visible (Garrabou et al. 2009 ; Lejeune et al. 2009).

Analyses génétiques

Au début du projet, nous avons fait le choix de réaliser le génotypage des individus par ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), sur la base des polymorphismes de longueur des régions situées entre des séquences microsatellites, due à des mutations par insertions ou délétions. De nombreuses études phylogénétiques ont été réalisées avec ce type de marqueurs ou d'autres marqueurs similaires tel que l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Le génotypage à l'aide de marqueurs ISSR est en effet intéressant car d'optimisation rapide, assez robuste et pertinent pour des espèces non modèles. C'est une bonne alternative au criblage de microsatellites encore aujourd'hui relativement coûteux. En général, l'amplification ISSR génère de multiples amplifiats de tailles différentes, et pour réaliser un génotypage précis, la technique requiert souvent l'utilisation de nombreuses amorces différentes.

Nous avons pu mettre en évidence la faisabilité de cette approche pour caractériser la diversité génétique des populations (Coupé, Couvray et al. 2011, cf. Annexe). Cependant, l'ISSR présente un certain nombre de limites. C'est un marqueur dominant, qui ne permet pas de distinguer les individus homozygotes et hétérozygotes à un locus donnée. Les risques d'homoplasie sont possibles, c'est à dire que deux fragments amplifiés correspondant à deux

loci différents aient la même taille, d'autant plus que le nombre de bandes générées au cours de l'amplification est élevé. Notre première analyse a révélé une très forte diversité de tailles de bandes (d'allèles) au sein et entre individus. L'analyse par ISSR nécessitait donc une analyse sur séquenceur l'assignation de taille de fragment amplifié avec une résolution à la base près. Finalement, nous avons choisi de réaliser l'analyse avec les marqueurs microsatellites décrits par Calderon et al. (2009) pour *Paracentrotus lividus*, qui nous permettaient d'évaluer les homozygotes, de réaliser plus directement l'assignation parentale afin d'évaluer l'efficacité des lâchers et d'avoir un point de comparaison pour discuter de nos résultats obtenus sur une aire géographique différente.

L'approche ISSR restera intéressante pour compléter les analyses par microsatellites, par exemple pour aider à déterminer le nombre et la structure des populations. Elle permet en outre de pouvoir cribler rapidement des fluctuations de diversité génétique à l'échelle du génome, et éventuellement de mettre en évidence des régions du génome sous pression de sélection, dont on sait qu'elles peuvent être informatives pour étudier par exemple la connectivité.

PERSPECTIVES

Le travail réalisé est un préliminaire qui jette les bases d'une recherche qui sera dans les années à venir approfondie au sein de l'Institut Océanographique Paul Ricard et du laboratoire PROTEE, sur la gestion et la conservation des ressources biologiques.

En effet, il est clair que la gestion d'une ressource doit idéalement faire l'objet d'une approche globale, d'autant plus quand il s'agit d'espèces très dispersives, qui occupent des habitats hautement fragmentés, et qui sont soumises à des pressions anthropiques diverses. Cela implique de s'intéresser à l'effet de nombreux facteurs qui influencent l'état d'une ressource locale et qui généralement agissent aussi à des échelles plus grandes de temps et d'espaces.

Une ressource durable est une ressource dont la démographie et la diversité génétique sont régulièrement entretenues par l'apport larvaire, et qui est capable de faire face aux fluctuations de l'environnement. Pour comprendre comment soutenir et gérer efficacement cette ressource, il faut donc savoir quels sont les facteurs qui agissent sur la dynamique et sur la structuration génétique des populations.

Distribution de diversité génétique à l'échelle régionale. Connectivité.

Dès le début du travail de thèse, nous avons souhaité caractériser la distribution de diversité génétique à l'échelle régionale. Les informations que nous attendions concernaient (i) la structuration des populations à différentes échelles spatiales et pour différentes cohortes temporelles, (ii) le patron de connectivité, avec l'identification d'éventuelles barrières à la dispersion, et (iii) l'identification de possibles divergences adaptatives.

Ainsi, nous avons réalisé un large échantillonnage de matériel génétique des populations d'oursins *P. lividus* des côtes de la région PACA au cours des années 2010, 2011 et 2012, représentant près de 4000 individus (pour l'essentiel juvéniles de diamètre inférieur à 1 cm) provenant de 24 sites répartis entre l'étang de Thau et Villefranche-sur-Mer. Les ADNs provenant de 13 populations ont été génotypés avec le jeu de microsatellites décrit précédemment pour ce travail de thèse, et sont actuellement en cours d'analyse.

En raison de la faiblesse de certains des marqueurs microsatellites, nous avons débuté la recherche et la caractérisation de nouveaux loci microsatellites par criblage bio-informatique des banques génomiques, fournies par le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer (LOV). Actuellement, une trentaine de marqueurs, situés dans des régions géniques ou intergéniques, ont été identifiés et sont en cours de validation biologique. Ils devront permettre de renforcer l'assignation parentale entre des individus relâchés et leurs géniteurs, et de caractériser plus finement la structuration génétique et la connectivité des populations naturelles à petite et moyenne échelle. Nous avons de plus l'intention de caractériser la diversité haplotypique mitochondriale d'un nombre plus limité d'individus, ce qui permettra de renforcer la caractérisation de la structure de la population régionale.

Nous pensons que l'effort d'échantillonnage important et l'augmentation du nombre de marqueurs permettra de mieux caractériser le patron de connectivité. Cependant, c'est probablement grâce au couplage des données de génétique des populations avec les simulations hydrodynamiques qu'il sera possible d'avoir une idée réaliste des modalités de dispersion larvaire. Dans cette optique nous commençons à réfléchir avec l'aide d'informaticiens aux paramètres à étudier et à la façon d'extraire les résultats de dispersion.

Outre ces perspectives « immédiates », l'analyse génétique réalisée sur des individus au moment du recrutement puis quelques mois plus tard pourraient permettre de mettre en évidence une influence du milieu sur les populations. Ce type de recherches devra être réalisé à partir de marqueurs *a priori* non neutres, par exemple des gènes candidats impliqués dans la réponse au stress, l'immunité ou les échanges ioniques. Cette approche porte l'idée qu'il pourrait y avoir des barrières chimiques à la dispersion, qui suppose donc qu'on s'intéresse aussi aux processus de sélection des populations larvaires vis à vis des polluants, et plus généralement aux conditions environnementales.

Suivi de la dynamique des populations

Ce travail est le fondement d'une étude de long terme qui sera poursuivie pendant au moins cinq ans dans le cadre du contrat du Contrat de Baie n°2 de Toulon, et constitue un outil de veille écologique indispensable à la gestion de la ressource. C'est en effet, le suivi sur

un grand pas de temps qui permettra de dessiner des tendances démographiques évolutives des populations d'oursins.

Nous avons délibérément choisi les modalités de suivi mis en place dans le parc marin de la côte bleue (Bachet et al. 2014), de manière à ce que nos résultats puissent être statistiquement comparés. En effet, les études démographiques des populations de *P. lividus* référencées au début de notre étude sont toutes réalisées à des échelles locales. La mise en commun de nos résultats permettra de mieux appréhender les processus qui influencent la dynamique des populations à plus grande échelle, plus cohérente avec les capacités de dispersion larvaire.

Nous proposons d'améliorer le protocole de suivi pour prendre en compte le niveau et la saisonnalité des recrutements, et le caractère agrégatif des individus. Il sera bien sûr utile de coupler le maximum de paramètres à ce suivi, comme la mesure de chlorophylle totale, les fluctuations de température, les événements météorologiques remarquables tels que les canicules marines, les fortes pluies, vents violents.

Pour restaurer les stocks et pour avoir des prélèvements durables (soutenables) certains aspects de l'écologie comportementale de *P. lividus* doivent être davantage pris en compte. Du fait de la complexité des écosystèmes marins et de la difficulté pour réaliser des échantillons, l'approche écosystémique est rarement prise en compte dans la gestion des ressources marine ce qui contribue à une surpêche à l'échelle mondiale et à l'effondrement des stocks (Bostford et al. 1997). La gestion des écosystèmes marins nécessite une connaissance approfondie de la dynamique de ces écosystèmes et de l'organisation des communautés qui les composent (Bostford et al. 1997). Il serait donc intéressant de réaliser en parallèle des suivis des oursins, des suivis des communautés ichtyologiques et macrophytique.

On sait que la survie des larves dépend de la quantité et qualité de l'alimentation (Fenaux 1994). En effet, les changements globaux, la pollution, la diminution des apports nutritifs par la diminution du débit des principaux fleuves du pourtour méditerranéen peuvent engendrer des bouleversements dans les communautés phytoplanctoniques et avoir des répercussions sur les ressources marines à phase larvaire pélagique. Il serait donc intéressant d'analyser les connaissances sur l'évolution de la production phytoplanctonique de ces dernières années pour la comparer à l'évolution des stocks d'oursins.

La variabilité locale du recrutement est un paramètre déterminant dans la structuration spatiale des populations des organismes benthiques. La connaissance sur la productivité des sites de pêche est une information essentielle pour l'élaboration d'une stratégie de gestion de la ressource (Ouréns et al. 2015). En complément du suivi des peuplements d'oursins adultes, tel qu'il a été initié dans ce travail de thèse, l'étude de l'intensité et variabilité du recrutement sur les mêmes sites pourrait apporter des informations précieuses pour la compréhension de la structuration spatiale des peuplements d'oursins de cette zone. L'activité de pêche a un rôle prédominant dans la productivité des peuplements. Le prélèvement peut à la fois diminuer le potentiel de reproduction des populations exploitées mais aussi affecter les nurseries de juvéniles (Tegner & Dayton 1977).

Amélioration des mesures de gestions

En premier lieu nous recommandons la mise en place de cantonnements de sites. Cet outil de gestion semble présenter le meilleur rapport coût-bénéfice. Nous aimerions pouvoir aussi étendre le suivi à d'autres populations situées à l'est et à l'ouest de l'aire toulonnaise, et en particulier suivre des populations d'oursins qui vivent déjà en zone de cantonnement (Cantonement de pêche du Cap Roux, Var).

Enfin, de nouvelles opérations de lâcher seront envisagées avec des individus de 5 à 10 mm de diamètre pour en évaluer l'efficacité et l'effet sur l'écosystème. Cela nous permettrait en outre d'estimer la capacité de charge des habitats.

Aquaculture

Les perspectives de recherches aquacoles intéressent en premier lieu le transfert des techniques d'élevages, pour l'instant optimisées à l'échelle de l'écloserie, pour des productions plus importantes. Ensuite, il s'agira de travailler à l'affinage et au grossissement des oursins pour favoriser une production annuelle qui répondra à la demande sans impacter les ressources naturelles.

REFERENCES

- Addis, P., Secci, M., Manunza, A., Corrias, S., Niffoi, A., Cau, A., 2009. A geostatistical approach for the stock assessment of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, in four coastal zones of Southern and West Sardinia (SW Italy, Mediterranean Sea). *Fish. Res.* 100, 215–221.
- Agnetta, D., Badalamenti, F., Ceccherelli, G., Di Trapani, F., Bonaviri, C., Gianguzza, P., 2015. Role of two co-occurring Mediterranean sea urchins in the formation of barren from *Cystoseira* canopy. *Estuar. Coast. Shelf S.* 152, 73-77.
- Allain, J.-Y., 1975. Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea) soumises à la pêche sur les côtes nord de Bretagne. *Rev Trav Inst Pêch. Marit* 39, 171–212.
- Allee, W., 1931. *Animal Aggregations: A Study in General Sociology*, University of Chicago Press. ed. Chicago. 431 pp.
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26, 32–46.
- Andrew, N.L., Agatsuma, Y., Ballesteros, E., Bazhin, A.H., Creaser, E.P., Barnes, D.K.A., Botsford, L.W., Bradbury, A., Campbell, A., Dixon, J.D., Einarsson, S., Gerring, P.K., Hebert, K., Hunter, M., Hur, S.B., Johnson, C.R., Juinio-Menez, M.A., Kalvass, P., Miller, R.J., Moreno, C.A., Palliero, J.S., Rivas, D., Robinson, S.M.L., Schroeter, S.C., Steneck, R.S., Vadas, R.L., Woodby, D.A., Xiaoqi, Z., 2002. Statut and management of world sea urchin fisheries. *Oceanogr. Mar. Biol.* 40, 343–425.
- Araki, H., Schmid, C., 2010. Is hatchery stocking a help or harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture* 308, S2–S11.
- Arrêté n°0412 du 28 avril 2008 portant règlementation particulière de la pêche sous-marine sur le littoral de Méditerranée Continentale. Accessible sur : http://www.dirm.mediterranee.developpementdurable.gouv.fr/IMG/pdf/arrete_peche_sous-marine_cle5f9411.pdf
- Arrêté 1112 du 27 octobre 2008 fixant les dates d'interdiction de pêche des oursins dans les départements des Bouches du Rhône, du Var et des Alpes Maritimes. Accessible sur : http://www.dirm.mediterranee.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/arrete-PSM-27octobre2008_cle5f77e2.pdf
- Asnaghi, V., Chiantore, M., Mangialajo, L., Gazeau, F., Francour, P., Alliouane, S., Gattuso, J.P., 2013. Cascading effects of ocean acidification in a rocky subtidal community. *PLoS ONE* 8, e61978.
- Asnaghi, V., Mangialajo, L., Gattuso, J.P., Francour, P., Privitera, D., Chiantore, M., 2014. Effects of ocean acidification and diet on thickness and carbonate elemental composition of the test of juvenile sea urchins. *Mar. Environ. Res.* 93, 78–84.

- Azzolina, J.-F., 1987. Evolution à long terme des populations de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* dans la baie de Port-Cros (Var, France), in: Colloque International Sur *Paracentrotus lividus* et Les Oursins Comestibles. GIS Posidonie publ., Marseille, France, pp. 257–269.
- Azzolina, J.-F., Boudouresque, C.-F., Nedelec, H., 1985. Dynamique des populations de *Paracentrotus lividus* dans la baie de Port-Cros (Var): données préliminaires. *Sci Rep Port-Cros Natl Park* 11, 61–81.
- Bachet, F., Monin, M., Charbonnel, E., Bretton, O., Cadville, B., 2014. Suivi de l'évolution des populations d'oursins comestibles (*Paracentrotus lividus*) sur la Côte Bleue – Résultats des comptages d'avril 2014. Rapport Parc Marin de la Côte Bleue et Comité Régional des Pêches Maritimes PACA, avril 2014. 17 pp.
- Balch, T., Scheibling, R.E., 2001. Larval supply, settlement and recruitment in echinoderms, in: *Echinoderm Studies* 6. M. Jangoux & J.M. Lawrence, Lisse, pp. 1–83.
- Ballesteros, E., Sala, E., Garrabou, J., Zabala, M., 1998. Community structure and frond size distribution of a deep water stand of *Cystoseira spinosa* (Phaeophyta) in the Northwestern Mediterranean. *Eur. J. Phycol.* 33, 121-128.
- Ballesteros, E., Garrabou, J., Hereu, B., Zabala, M., Cebrian, E., Sala, E., 2009. Deepwater stands of *Cystoseira zosteroides* (Fucales, Phaeophyta) in the Northwestern Mediterranean: insights into assemblage structure and population dynamics. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 82, 477-484.
- Barnes, D.K.A., Crook, A.C., 2001. Implications of temporal and spatial variability in *Paracentrotus lividus* populations to the associated commercial coastal fishery. *Hydrobiologia* 465, 95–102.
- Barnes, D.K.A., Verling, D.K.A., Crook, A., Davidson, I., O'Mahoney, M., 2002. Local population disappearance follows (20 yr after) cycle collapse in a pivotal ecological species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 226, 311–313.
- Bartley, D.M., Bell, J.D., 2008. Restocking, Stock Enhancement, and Sea Ranching: Arenas of Progress. *Rev. Fish. Sci.* 16, 357–365.
- Becker, P.T., Egea, E., Eeckhault, I., 2008. Characterization of the bacterial communities associated with the bald sea urchin disease of the echinoid *Paracentrotus lividus*. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 136–147.
- Bell, J.D., Leber, K.M., Blankenship, H.L., Loneragan, N.R., Masuda, R., 2008. A New Era for Restocking, Stock Enhancement and Sea Ranching of Coastal Fisheries Resources. *Rev. Fish. Sci.* 16, 1–9.
- Bell, J.D., Rothlisberg, P.C., Munro, J.L., Loneragan, N.R., Nash, W.J., Ward, R.D., Andrew, N.L., 2005. Restocking and stock enhancement of marine invertebrate fisheries., Elsevier. ed, *Advances in Marine Biology*. Southward A.J., Young C.M. and Fuiman L.A. 292 pp.
- Benham, C.E., Supernault, K.J., Burton, R.S., 2012. Genetic assessment of the population connectivity of the red urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 432-433, 47–54.

- Blankenship, H.L., Leber, K.M., 1995. A responsible approach to marine stock enhancement. *Am. Fish. Soc. Symp.* 15, 167–175.
- Blaxter, J.H.S., 2000. The enhancement of marine fish stocks. *Adv. Mar. Bioogy* 38, 1–54.
- Bonaviri, C., Gianguzza, P., Pipitone, C., Hereu, B., 2012. Micropredation on sea urchins as a potential stabilizing process for rocky reefs. *J. Sea Res.* 73, 18–23.
- Bostford, L.W., Castilla, J.C., Peterson, C.H., 1997. The management of fishes and marine ecosystems. *Science* 227, 209–215.
- Bostford, L.W., Morgan, L.E., Lockwood, D.R., Wilen, J.E., 1999. Marine reserves and management of the Northern California red sea urchin fishery. *CalCOFI Rep.* 40, 87–93.
- Bostford, L.W., Campbell, A., Miller, R.J., 2004. Biological reference points in the management of North American sea urchin fisheries. *Can J Fish Aquat Sci* 61, 1325–1337.
- Boudouresque, C.-F., Nedelec, H., Shepherd, S.A., 1980. The decline of a population of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the bay of Port-Cros (Var, France). *Trav Sci Parc Nation Port-Cros Fr* 6, 243–251.
- Boudouresque, C.-F., Verlaque, M., 2007. Ecology of *Paracentrotus lividus*, in: *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. John Miller Lawrence, pp. 243–285.
- Boudouresque, C.F., Verlaque, M., Azzolina, J.F., Meinesz, A., Nedelec, H., Rico, V., 1989. Evolution des populations de *Paracentrotus lividus* et d'*Arbacia lixula* (Echinoidea) le long d'un transect permanent à Galeria (Corse). *Trav Sci Parc Nat Reg Res Nat Corse Fr* 22, 65–82.
- Bradbury, I.R., Laurel, B., Snelgrove, P.V.R., Bentzen, P., Campana, S.E., 2008. Global patterns in marine dispersal estimates: the influence of geography, taxonomic category and life history. *Proceeding R. Soc. B* 275, 1803–1809.
- Bravington, M.V., Ward, D.R., 2004. Microsatellite DNA markers: evaluating their potential for estimating the proportion of hatchery-reared offspring in a stock enhancement programme. *Mol. Ecol.* 13, 1287–1297.
- Bulleri, F., Bertocci, I., Micheli, F., 2002. Interplay of encrusting coralline algae and sea urchins in maintaining alternative habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243, 101-109.
- Calderon, I., Giribert, G., Turon, X., 2008. Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Mar Biol* 254, 137–151.
- Calderon, I., Palacin, C., Turon, X., 2009a. Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Mol. Ecol.* 18, 3036–3049.
- Calderon, I., Turon, X., 2010. Temporal genetic variability in the Mediterranean common sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 408, 149–159.

- Calderon, I., Turon, X., Lessios, H.A., 2009. Characterization of the Sperm Molecule Bindin in the Sea Urchin Genus *Paracentrotus*. *J Mol Evol* 63, 366–376.
- Calderon, I., Turon, X., Pascual, M., 2009b. Isolation of nine nuclear microsatellites in the common Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck). *Mol. Ecol. Resour.* 9, 1145–1147.
- Campillo, A. & Bigot, J.L., 1992. Les pêcheries françaises de Méditerranée. Synthèse des connaissances. IFREMER-CEE (Institut Français de Recherche pour l'Exploration de la Mer), 92/1211625/TF, 206 pp.
- Catoira, J.L., 2004. History and current state of sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck, 1816, fisheries in Galicia, NW Spain., in: *Sea Urchins: Fisheries and Ecology*. DEStech Publication, Lancaster, pp. 64–73.
- Ceccherelli, G., Pais, A., Pinna, S., Sechi, N., Chessa, L.A., 2011. Human impact on *Paracentrotus lividus*: the result of harvest restrictions and accessibility of locations. *Mar Biol* 158, 845–852.
- Cheminée, A., Sala, E., Pastor, J., Bodilis, P., Thiriet, P., Mangialajo, L., Cottalorda, J.M., Francour, P., 2013. Nursery value of *Cystoseira* forests for Mediterranean rocky reef fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 442, 70–79.
- Coupé, S., Couvray, S., Tarnowska, K., Simide, R., Hachfi, L., Pierre, S., Gaillard, S., Richard, S., Prévot d'Alvise, N., Gouze, E., Martin, Y., Bonnefont, J.-L., Vicente, N., Grillasca, J.-P., 2011. *In situ* spine sampling and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) PCRs proved relevant methods for molecular studies on the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 409, 310–314.
- Cross, T.F., 2000. Genetic implications of translocation and stocking of fish species, with particular reference to Western Australia. *Aquac. Res.* 31, 83–94.
- Delmas, P., 1992. Etude des populations de *Paracentrotus lividus* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea) soumises à une pollution complexe en Provence Nord-occidentale: densités, structure, processus de détoxification (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe). Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille III, Marseille. 205 pp.
- Delmas, P., Régis, M.-B., 1984. Influence d'une pollution complexe à dominante domestique sur les populations de l'échinoïde comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck). *Vie Mar.* 6, 63–72.
- Dewoody, J., Nason, J.D., Hipkins, V.D., 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Mol. Ecol. Notes* 6, 951–957.
- Dudley, N., 2008. Guidelines for Applying Protected Area Management Categories. IUCN, Gland, Switzerland. 86 pp.
- Dunn, O.J., 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6, 241–252.

- Duran, S., Palacin, C., Becerro, M.A., Turon, X., Giribert, G., 2004. Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Mol. Ecol.* 13, 3317–3328.
- Eklöf, J.S., de la Torre-Castro, M., Gullström, M., Uku, J., Muthiga, N., Lyimo, T., Bandeira, S.O., 2008. Sea urchin overgrazing of seagrasses: a review of current knowledge on causes, consequences, and management. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 79, 569–580.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinforma. Online* 1, 47–50.
- Fanelli, G., Piraino, S., Esposito, L., Boero, F., 1998. Opposite roles of urchins and starfishes in marine benthic communities, in: *Echinoderm Reseach*. Candia Carnevali & Bonasoro, Rotterdam, pp. 453–457.
- FAO (2012). Global Production Statistics 1950-2012. Available: <http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector>. Accessed 02 August 2014.
- Farrugio, H., Oliver, P. & Biagi, F., 1993. An overview of the history, knowledge, recent and future research trends in Mediterranean fisheries. *Sci. Mar.* 57, 105-119.
- Fenaux, L., 1994. Five tests of food-limited growth of larvae in coastal waters by comparisons of rates of development and form of echinoplutei. *Limnol Ocean.* 39, 84–98.
- Fernández-Boán, M., Fernández, L., Freire, J., 2012. History and management strategies of the sea urchin *Paracentrotus lividus* fishery in Galicia (NW Spain). *Ocean Coast. Manag.* 69, 265–272.
- Fernandez, C., 1996. Croissance et nutrition de *Paracentus lividus* dans le cadre d'un projet aquacole avec alimentation artificielle. (Thèse de doctorat en océanologie). Université de Cose. Fac. Sci. Tec. 227 pp.
- Fernandez, C., Boudouresque, C.F., 1997. Phenotypic plasticity of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in a lagoonal environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 152, 145–154.
- Francour, P., Boudouresque, C.-F., Harmelin, J.-G., Harmelin-Vivien, M.L., Quignard, J.P., 1994. Are the Mediterranean waters becoming warmer? Information from biological indicators. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 523–526.
- Gaines, S.D., 2007. Connecting Places The Ecological Consequences of Dispersal in the Sea. *Oceanography* 20, 90–99.
- Garrabou, J., Coma, R., Bensoussan, N., Bally, M., Chevaldonné, P., Cigliano, M., Diaz, D., Harmelin, J.G., Gambis, M.C., Kersting, D.K., Ledoux, J.B., Lejeusne, C., Linares, C., Marschal, C., Pérez, T., Ribes, M., Romano, J.C., Serrano, E., Teixido, N., Torrents, O., Zabala, M., Zuberer, F., Cerrano, C., 2009. Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Glob. Change Biol.* 15, 1090–1103.

- Giakoumi, S., Cebrian, E., Kokkoris, G.D., Ballesteros, E., Sala, E., 2012. Relationships between fish, sea urchins and macroalgae: The structure of shallow rocky sublittoral communities in the Cyclades, Eastern Mediterranean. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 109, 1–10.
- Gianguzza, P., Chiantore, M., Bonaviri, C., Cattaneo-Vietti, R., Vielmini, I., Riggio, S., 2006. The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). *Fish. Res.* 81, 37–44.
- Gosselin, P., Jangoux, M., 1998. From competent larva to exotrophic juvenile: a morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoida). *Zoomorphology* 118, 31–43.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Gras, G., 1988. Tentative de repeuplement en oursins comestibles de la réserve sous-marine de Monaco: transfert massif de *Paracentrotus lividus* en provenance du Golfe de Marseille. *Assoc. Monég. Pour Prot. Nat. Compte-Rendu Act.* 1986-1987 26–29.
- Grojean, P., 2001. Growth model of the reared sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Université Libre de Bruxelles. 272 pp.
- Grosberg, R.K., Cunningham, C.W., 2001. Genetic structure in the sea: from populations to communities, in: *Marine Community Ecology*. M. D. Bertness, S. Gaines, and M. E. Hay, eds., Sunderland, MA., pp. 61–84.
- Grosjean, P., Spirlet, C., Jangoux, M., 2003. A functional growth model with intraspecific competition applied to sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Can J Fish Aquat Sci* 60, 237–246.
- Guidetti, P., Terlizzi, A., Boero, F., 2004. Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). *Fish. Res.* 66, 287–297.
- Hanski, I., Gilpin, M., 1991. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biol. J. Linn. Soc.* 42, 3–16.
- Hara, M., Onoue, S., Taniguchi, N., 2008. Assessing the Impact of Releasing Exogenous Hatchery-Reared Juveniles of Pacific Abalone, *Haliotis discus*. *Rev. Fish. Sci.* 16, Issue 1-3, 278–284.
- Harmelin, J.-G., Bouchon, C., Hong, J.-S., 1981. Impact de la pollution sur la distribution des échinodermes des substrats durs en Provence (Méditerranée Nord-Occidentale). *Téthys* 10, 13–36.
- Harmelin, J.-G., Hereu, B., Martiny de Maissonave, L., Teixidor, N., Dominguez, L., Zabala, M., 1995. Indicateurs de biodiversité en milieu marin: Les échinodermes. Fluctuation temporelles des peuplements d'échinodermes à Port-Cros. Comparaison entre les années 1982-84 et 1993-95 (No. Rapport 1995). Parc National de Port-Cros. 13 pp.
- Hartl, D.L., 1994. Génétique des populations, Flammarion-Médecine-Sciences. ed. Paris. 305 pp.

- Hartl, D.L., Clark, A.G., 2007. Principles of population genetics, Fourth edition, Sinauer Associates. ed. Sunderland, MA. 565 pp.
- Hereu, B., 2004. Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Mar. Biol.* 144, 1011–1018.
- Hereu, B., 2005. Movement patterns of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a marine reserve and an unprotected area in the NW Mediterranean. *Mar. Ecol.* 26, 54–62.
- Hereu, B., Linares, C., Diaz, D., Dantart, L., Garrabou, J., Sala, E., Ballesteros, 2005a. Indicateur de diversité en milieu marin: les échinodermes; Fluctuations temporelles des peuplements d'échinodermes à Port-Cros 1982-2003. Port-Cros. 29 pp.
- Hereu, B., Zabala, M., Linares, C., Sala, E., 2005b. The effects of predator abundance and habitat structural complexity on survival of juvenile sea urchins. *Mar. Biol.* 146, 293–299.
- Hereu, B., Linares, C., Diaz, D., Teixidor, N., Zabala, M., 2006. Diversité d'échinodermes dans les fonds marins de Porquerolles (No. Contrat n° 05-018). 52 pp.
- Hereu, B., Zabala, M., Sala, E., 2008. Multiple controls of community structure and dynamics in a sublittoral marine environment. *Ecology* 89, 3423–3435.
- Hereu, B., Linares, C., Sala, E., Garrabou, J., Garcia-Rubies, A., Diaz, D., Zabala, M., 2012. Multiple processes regulate long-term population dynamics of sea urchins on Mediterranean rocky reefs. *PLoS ONE* 7, e36901.
- Himmelman, J.H., 1986. Population biology of green sea urchins on rocky barrens. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33, 295–306.
- Hoffman, J.I., Clarke, A., Clark, M.S., Fretwell, P., Peck, L.S., 2012. Unexpected fine-scale population structure in a broadcast-spawning Antarctic marine mollusc. *PLoS ONE* 7, e32415.
- Hunte, W., Younglao, D., 1988. Recruitment and population recovery of *Diadema antillarum* (Echinodermata; Echinoidea) in Barbados. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45, 109–119.
- Hutchinson, W.F., Carvalho, G.R., Rogers, S.I., 2001. Marked genetic structuring in localised spawning populations of cod *Gadus morhua* in the North Sea and adjoining waters, as revealed by microsatellites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 223, 251–260.
- Irwin, D.E., 2002. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. *Evolution* 56, 2383–2394.
- Iuri, V., Patti, F.P., Procaccini, G., 2007. Phylogeography of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea): first insights from the South Tyrrhenian Sea. *Hydrobiologia* 580, 77–84.
- Jangoux, M., 1984. Diseases of echinoderms. *Helgol. Mar. Res.* 37, 207–216.

- Jangoux, M., 1987a. Diseases of Echinodermata. I. Agents microorganisms and protistans. *Dis. Aquat. Organ.* 2, 147–162.
- Jangoux, M., 1987b. Diseases of Echinodermata. II. Agent metazoans (Mesozoa to Bryozoa). *Dis. Aquat. Organ.* 2, 205–234.
- Jangoux, M., 1987c. Diseases of Echinodermata. III. Agents metazoans (Annelida to Pisces). *Dis. Aquat. Organ.* 3, 59–83.
- Jangoux, M., 1987d. Diseases of Echinodermata. IV. Structural abnormalities and general considerations on biotic diseases. *Dis. Aquat. Organ.* 3, 221–229.
- Jangoux, M., Maes, P., 1987. Les épizooties chez les oursins réguliers (Echinodermata). Presented at the Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, Boudouresque edit., GIS Posidonie publ., Marseille, France, pp. 299–307.
- Johansson, M.L., Banks, M.A., Glunt, K.D., Hassel-Finnegan, H.M., Buonaccorsi, V.P., 2008. Influence of habitat discontinuity, geographical distance, and oceanography on fine-scale population genetic structure of copper rockfish (*Sebastes caurinus*). *Mol. Ecol.* 3051–61
- Johnson, J.A., Toepfer, J.E., Dunn, P.O., 2003. Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented populations of greater prairie-chickens. *Mol. Ecol.* 12, 3335–3347.
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos.* 69, 373–386.
- Jones, G.P., Srinivasan, M., Almany, G.R., 2007. Population connectivity and conservation of marine biodiversity. *Oceanography* 20, 100–111.
- Juino-Meñez, M.A., Pastor, D., Bangi, H.G., 2008. Enhancing the recovery of depleted *Tripneustes gratilla* stocks through grow-out culture and restocking. *Rev. Fish. Sci.* 16, 35–43.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16, 1099–1106.
- Kesäniemi, J.E., Mustonen, M., Boström, C., Hansen, B.W., Knott, K.E., 2014. Temporal genetic structure in a poecilogonous polychaete: the interplay of developmental mode and environmental stochasticity. *BMC Evol. Biol.* 14, <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/14/12>.
- Kramer, A.M., Dennis, B., Liebhold, A.M., Drake, J.M., 2009. The evidence for Allee effects. *Popul Ecol* 51, 341–354.
- Le Direac'h, J.P., Boudouresque, C.F., Antolic, B., Kokatas, A., Panayotidis, P., Pancucci, A., Semroud, R., Span, A., Zaouali, J., Zavodnik, D., 1987. Rapport sur l'exploitation des oursins en Méditerranée. Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, C.F. Boudouresque edit., Marseille, Fr., pp. 329–334.

- Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergnet-Martini, C., Boudouresque, C.F., Pérez, T., 2009. Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends Ecol. Evol.* 25, 250–260.
- Le Vay, L., Carvalho, G.R., Qunitio, E.T., Lebata, J.H., Ut, V.N., Fushimi, H., 2007. Quality of hatchery-reared juveniles for marine fisheries stock enhancement. *Aquaculture* 268, 169–180.
- Levins, R., 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 15, 237–240.
- Levitan, D.R., 2004. Density-dependent sexual selection in external fertilizers: variances in male and female fertilization success along the continuum from sperm limitation to sexual conflict in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Am. Nat.* 164, 298–309.
- Levitan, D.R., Sewell, A., Chia, F.S., 1992. How distribution and abundance influence fertilization success in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Ecology* 73, 148–254.
- Lipcius, R.N., Eggleston, D.B., Schreiber, S.J., Seitz, R.D., Shen, J., Sisson, M., Stockhausen, W.T., Wang, H.V., 2008. Importance of metapopulation connectivity to restocking and restoration of marine species. *Rev. Fish. Sci.* 16, 101–110.
- Lopez, S., Turon, X., Montero, E., Palacin, C., Duarte, C.M., Tarjuelo, I., 1998. Larval abundance, recruitment and early mortality in *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). Interannual variability and plankton-benthos coupling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172, 239–251.
- Lorenzen, K., Agnalt, A.L., Blankenship, H.L., Hines, A.H., Leber, K.M., Loneragan, N.R., Taylor, M.D., 2013a. Evolving context and maturing science: aquaculture based enhancement and restoration enter the marine fisheries management toolbox. *Rev. Fish. Sci.* 21, 213–221.
- Lorenzen, K., Agnalt, A.L., Blankenship, H.L., Hines, A.H., LEBER, K.M., Loneragan, N.R., Taylor, M.T., 2013b. Evolving Context and Maturing Science: Aquaculture-Based Enhancement and Restoration Enter the Marine Fisheries Management Toolbox. *Rev. Fish. Sci.* 21, 213–221.
- Lorenzen, K., Leber, K.M., Blankenship, H.L., 2010. Responsible approach to marine stock enhancement: an update. *Rev. Fish. Sci.* 18, 189–210.
- Luis, O., Delgado, F., Gago, J., 2005. Year-round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Relevance for the use of its larvae as live feed. *Aquat. Living Resour.* 18, 45–54.
- MacArthur, R.H., Wilson, E.O., 1967. The theory of island biogeography. *Monographs in Population Biology*. Princeton Univ.
- MacArthur, R., Wilson, E.O., 1963. An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution* 17, 373–387.
- Maes, P., Jangoux, M., 1984. The bald-sea-urchin disease: a biopathological approach. *Helgol. Mar. Res.* 37, 217–224.

- Maltagliati, F., Di Giuseppe, G., Barbieri, M., Castelli, A., Dini, F., 2010. Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Biol. J. Linn. Soc.* 100, 910–923.
- Martin, S., Richier, S., Pedrotti, M.L., Dupont, S., Castejon, C., Gerakis, Y., Kerros, M.E., Oberhänsli, F., Teyssié, J.L., Jeffree, R., Gattusi, J.P., 2011. Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO₂-driven acidification. *J. Exp. Biol.* 214, 1354–1368.
- McClanahan, T.R., Shafir, S.H., 1990. Causes and consequences of sea urchin abundance and diversity in Kenyan coral reef lagoons. *Oecologia* 83, 362–370.
- McEdward, L., Miner, B.G., 2007. Echinoid larval ecology, in: *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Second Edition.*, Developments in Aquaculture and Fisheries Science. John M. Lawrence, U.S.A., pp. 71–93.
- Menge, B.A., 1995. Indirect effects in marine rocky intertidal interaction webs: patterns and importance. *Ecological Monographs* 65: 21-74.
- Miard, T., Couvray, S., Aublanc, P., Maire, E., Dehail, M., Kirchhofer, D., Bonnefont, J.L., 2013. *Projet oursins du soleil - Bilan expérimental.* Institut Océanographique Paul Ricard. 29 pp.
- Micael, J., Alves, M.J., Costa, A.C., Jones, M.B., 2009. Exploitation and conservation of echinoderms. *Oceanogr. Mar. Biol.* 47, 191–208.
- Miller, A.D., Versace, V.L., Matthews, T.G., Montgomery, S., Bowie, K.C., 2013. Ocean currents influence the genetic structure of an intertidal mollusc in southeastern Australia - implications for predicting the movement of passive dispersers across a marine biogeographic barrier. *Ecol. Evol.* 3, 1248–1261.
- Morgan, L.E., Shepherd, S.A., 2006. Population and spatial structure of two common temperate reef herbivores: Abalone and sea urchins, in: *Marine Metapopulations.* J.P. Kritzer, and P.F. Sale, London, pp. 205–246.
- Nishizaki, M.T., Ackerman, J.D., 2007. Juvenile–adult associations in sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. droebachiensis*): protection from predation and hydrodynamics in *S. franciscanus*. *Mar. Biol.* 151, 135–145.
- Ouréns, O., Freire, J., Vilar, J.A., Fernández, L., 2014. Influence of habitat and population density on recruitment and spatial dynamics of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: implications for harvest refugia. *ICES Journal Mar. Sci. Adv. Access* 71, 1064–1072.
- Ouréns, O., Naya, I., Freire, J., 2015. Mismatch between biological, exploitation, and governance scales and ineffective management of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) fisheries in Galicia. *Mar. Policy* 51, 13–20.

- Ouréns, R., Fernández, L., Fernández-Boán, M., Naya, I., Freire, J., 2013a. Reproductive dynamics of the sea urchin *Paracentrotus lividus* on the Galicia coast (NW Spain): effects of habitat and population density. *Mar. Biol.* 160, 2413–2423.
- Ouréns, R., Flores, L., Fernández, L., Freire, J., 2013b. Habitat and density-dependent growth of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in Galicia (NW Spain). *J. Sea Res.* 76, 50–60.
- Pais, A., Chessa, L.A., Serra, S., Ruiu, A., Meloni, G., Donno, Y., 2007. The impact of commercial and recreational harvesting for *Paracentrotus lividus* on shallow rocky reef sea urchin communities in North-western Sardinia, Italy. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 589–597.
- Palacin, C., Giribert, G., Carner, S., Dantart, L., Turon, X., 1998. Low densities of sea urchins influence the structure of algal assemblages in the western Mediterranean. *J. Sea Res.* 39, 281–290.
- Palleiro-Nayar, J.S., Sosa-Nashizaki, O., Montañó-Moctezuma, G., 2011. Impact of substrate and the presence of adults on recruitment of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* in Baja California. *Cienc. Mar.* 37, 59–70.
- Palumbi, S.R., 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 25, 547–572.
- Palumbi, S.R., 2009. Speciation and the evolution of gamete recognition genes: pattern and process. *Heredity* 102, 66–76.
- Pedrotti, M.L., Fenaux, L., 1992. Dispersal of echinoderm larvae in a geographical area marked by upwelling (Ligurian Sea, NW Mediterranean). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 86, 217–227.
- Pemberton, J.M., Slate, J., Bancroft, D.R., Barrett, J.A., 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4, 249–252.
- Penant, G., Aurelle, D., Feral, J.P., Chenuil, A., 2013. Planktonic larvae do not ensure gene flow in the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 480, 155–170.
- Pennigton, J.T., 1985. The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation and synchronous spawning. *Biol. Bull.* 169, 417–430.
- Perkol-Finkel, S., Airoidi, L., 2010. Loss and recovery potential of marine habitats: an experimental study of factors maintaining resilience in subtidal algal forests at the Adriatic sea. *PLoS One* 5 (5), e10791.
- Pineda, J., 2000. Linking larval settlement to larval transport: assumptions, potentials, and pitfalls. *Oceanogr. Eadtern Pac.* 1, 84–105.
- Pineda, J., Hare, J.A., Sponaugle, S., 2007. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography* 20, 22–39.

- Pinnegar, J.K., Polunin, N.V.C., Francour, P., Badalamenti, F., Chemello, R., Harmelin-Vivien, M.L., Hereu, B., Milazzo, M., Zabala, M., D'Anna, G., Pipitone, C., 2000. Trophic cascades in benthic marine ecosystems: lessons for fisheries and protected-area management. *Environ. Conserv.* 27, 179-200.
- Pinsky, M.L., Palumbi, S.R., Andréfouët, S., Purkis, S., 2012. Open and closed seascapes: Where does habitat patchiness create populations with high fractions of self-recruitment? *Ecol. Appl.* 22, 1257–1267.
- Prado, P., Tomas, F., Pinna, S., Farina, S., Roca, G., Ceccherelli, G., Romero, J., Alcoverro, T., 2012. Habitat and Scale Shape the Demographic Fate of the Keystone Sea Urchin *Paracentrotus lividus* in Mediterranean Macrophyte Communities. *PLoS ONE* 7, e35170.
- Privitera, D., Noli, M., Falugi, C., Chiantore, M., 2011. Benthic assemblages and temperature effects on *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* larvae and settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407, 6–11.
- Puebla, O., Bermingham, E., Guichard, F., 2009. Estimating dispersal from genetic isolation by distance in a coral reef fish (*Hypoplectrus puella*). *Ecology* 90, 3087–3098.
- Puritz, J.B., Tooner, R.J., 2011. Coastal pollution limits pelagic larval dispersal. *Nat. Commun.* 2.
- Quinn, J.F., Wing, S.R., Bostford, L.W., 1993. Harvest refugia in marine invertebrate fisheries: models and applications to the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. *Amer Zool* 33, 537–550.
- Régis, M.B., 1987. L'oursin comestible *Paracentrotus lividus*, une ressource en danger dans le quartier maritime de MArseille., in: Colloque International Sur *Paracentrotus Lividus* et Les Oursins Comestibles. C.F. Boudouresque edit., GIS Posidonie publ., Marseille, Fr., pp. 391–397.
- Régis, M.-B., 1989. Impact et résultats de la Campagne “Sauvons l'oursin comestible: *Paracentrotus lividus*” (Echinodermata, Echinoïda). *Vie Mar.* 150–157.
- Régis, M.-B., Pérès, J.-M., Gras, G., 1985. Données préliminaires sur l'exploitation de la ressource: *Paracentrotus lividus* (Lmck) dans le Quartier Maritime de Marseille. *Vie Mar.* 7, 41–60.
- Reish, D.J., Bellan, G., 1995. The long-term effects of municipal discharges from urban areas on the marine environment: a review. In: *Functioning and Dynamics of Natural and Perturbed Ecosystems*. Bellan-Santini D., Bonin G., Eming C.C., Paris, pp. 701–743.
- Ruitton, S., Francour, P., Boudouresque, C.F., 2000. Relationships between algae, benthic herbivorous invertebrates and fishes in rocky sublittoral communities of a temperate sea (Mediterranean). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 50, 217–230.
- Rumrill, S.S., 1990. Natural mortality of marine invertebrate larvae. *Ophelia* 32, 163–198.
- Ryman, N., Palm, S., 2006. POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Mol. Ecol.* 6, 600–602.

- Sala, E., 1997. Fish predators and scavengers of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in protected areas of the north-west Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* 129, 531–539.
- Sala, E., Boudouresque, C.-F., Harmelin-Vivien, M., 1998a. Fishing, trophic cascades, and the structure of algal assemblages: evaluation of an old but untested paradigm. *Oikos* 82, 425–439.
- Sala, E., Ribes, M., Hereu, B., Zabala, M., Alva, V., Coma, R., Garrabou, J., 1998b. Temporal variability in abundance of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in the northwestern Mediterranean: comparison between a marine reserve and an unprotected area. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 168, 135–145.
- Sala, E., Zabala, M., 1996. Predation and the structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 140, 71–81.
- Sloan, N.A., Lauridsen, C.P., Harbo, R.M., 1987. Recruitment characteristics of the commercially harvested red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* in Southern British Columbia, Canada. *Fish. Res.* 5, 55–69.
- Stumpp, M., Dupont, S., Thorndyke, M.C., Melzner, F., 2011. CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development patterns in pluteus larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 160, 320–330.
- Swearer, S.E., Shima, J.S., Hellberg, M.E., Thorrold, S.R., Jones, G.P., Robertson, D.R., Morgan, S.G., Selkoe, K.A., Ruiz, G.M., Warner, R.R., 2002. Evidence of self-recruitment in demersal marine populations. *Bull. Mar. Sci.* 70, 251–271.
- Tajima, K., Silva, J.R.M.C., Lawrence, J.M., 2007. Disease in sea urchins, in: *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, Advances in Marine Biology. John Miller Lawrence, pp. 167–182.
- Tegner, M.J., Dayton, P.K., 1977. Sea urchin recruitment patterns and implications of commercial fishing. *Science* 196, 324–326.
- Tegner, M.J., Dayton, P.K., 1981. Population structure, recruitment and mortality of two sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) in a kelp forest. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5, 255–268.
- Thibaut, T., Pinedo, S., Torras, X., Ballesteros, E., 2005. Long-term decline of the populations of Fucales (*Cystoseira* spp. and *Sargassum* spp.) in the Albères coast (France, North-western Mediterranean). *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1472–1489.
- Thibaut, T., Blanfuné, A., Boudouresque, C.F., Verlaque, M., 2015. Decline and local extinction of Fucales in the French Riviera: the harbinger of future extinctions? *Medit. Mar. Sci.* 16/1, 206–224.
- Tomas, F., Romero, J., Turon, X., 2004. Settlement and recruitment of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in two contrasting habitats in the Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 282, 173–184.

- Turon, X., Giribert, G., Lopez, S., Palacin, C., 1995. Growth and population structure of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122, 193–204.
- Vergés, A., Tomas, F., Ballesteros, E., 2012. Interactive effects of depth and marine protection on predation and herbivory patterns. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 450, 55-65.
- Verlaque, M., 1984. Biologie des juvéniles de l'oursin herbivore *Paracentrotus lividus* (Lamarck): sélectivité du broutage et impact de l'espèce sur les communautés algales de substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France). *Bot. Mar.* 27, 401–424.
- Vielmini, I., Chiantore, M., Gianguzza, P., Bonaviri, C., Mangialajo, L., Cattaneo-Vietti, R., Riggio, S., 2005. Protection effects on feeding and reproduction of *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* on barren grounds at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy)., in: XV Congresso Della Società Italiana Di Ecologia. Presented at the 15th Meeting of the Italian Society of Ecology, Tonino.
- Ward, R.D., 2006. The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fish. Res.* 80, 9–18.
- Williams, H., 2002. Sea urchin fisheries of the world: a review of their status, management strategies and biology of the principal species. Department of primary industries, water and environment, Tasmania. 29 pp.
- Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19, 395–420.
- Yokota, Y., 2002a. Introduction to the sea urchin biology, in: *The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture*. Yokota, Matranga & Smolenicka, Lisse, The Netherland, pp. 1–10.
- Yokota, Y., 2002b. Fishery and consumption of the sea urchin in Japan, in: Yokota, Y., Matranga, Smolenicka, Z. (Eds.), *The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture*. Lisse, The Netherland, pp. 129–138.
- Zhan, A., Hu, J., Hu, X., Zhou, Z., Hui, M., Wang, S., Peng, W., Wang, M., Bao, Z., 2009. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation? *Mar Biotechnol* 11, 223–235.

ANNEXES

Articles

In situ spine sampling and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) PCR proved relevant methods for molecular studies on the sea urchin *Paracentrotus lividus*

Stéphane Coupé ^{a,*}, Sylvain Couvray ^{a, b}, Katarzyna Tarnowska ^a, Rémy Simide ^a, Lamia Hachfi ^a, Stéphanie Pierre ^a, Sandrine Gaillard ^a, Simone Richard ^a, Nathalie Prévot d'Alvise ^a, Elvire Gouze ^c, Yvan Martin ^b, Jean-Luc Bonnefont ^b, Nardo Vicente ^b, Joel-P Grillasca ^a

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 409 (2011): 310–314.

^a Laboratoire PROTEE, Equipe de Biologie Moléculaire Marine, Université du Sud Toulon-Var, Avenue de l'Université, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, France

^b Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez– Le Brusç, 83 140 Six Fours Les Plages, France

^c Inserm U895, Centre méditerranéen de médecine moléculaire, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, 151 route saint Antoine de ginstiere, BP 23194, 06204 Nice cedex 3, France

Abstract

In France, there are raising concerns about the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*, whose populations decline. In this context, molecular analyses contribute to the better understanding of processes that shape populations, which is required to adapt management and conservation programmes. The present study aimed at developing an in situ non-destructive spine sampling method and an ISSR-PCR approach, both dedicated to the genetic analysis of individuals and populations. Forty-five individuals of 3 close populations were studied. In situ spine sampling proved relevant, leading to the clear genotyping of all purified DNAs without any contamination. Molecular analysis revealed high genetic diversity with a large proportion of low-frequency ISSR markers. Six ISSR primers produced 154 scorable polymorphic markers of which 118 (77%) were present at a frequency lower than 25%. Based on genotyping profiles obtained with 3 ISSR primers, significant genetic differentiation between the studied populations was detected. Taken together, these results revealed that both in situ spine sampling and ISSR method are relevant for molecular analyses and that they will likely find their application in future conservation and management programs.

Introduction

In the south of France, the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* has experienced a huge population decline. Deciphering processes (e.g. natural and anthropogenic) that shape populations are needed to adapt conservation and management strategies (Guidetti et al., 2005). This implies long-term genetic monitoring of populations, requiring the analysis of numerous genetic markers on a critical number of individuals. This would be labour intensive and expensive. There is thus a need to develop both easy tissue sampling strategies adapted to endangered marine animals and new PCR approaches that generate high numbers of polymorphic genetic markers at affordable costs.

Molecular genetics has now been widely used to address ecological and conservation issues, thanks to the tremendous diversity of analysis one can perform on only few picograms of DNA (e.g. hairs or faeces). This has led to the development of in situ non-invasive and non-destructive sampling procedures for conservation monitoring, allowing biologists to collect

critical data on wildlife populations without capturing or sacrificing animals. This is of major importance when dealing with small, scarce and endangered populations (Kumar et al., 2007; Lawrence et al., 2008; Le Vin et al., 2011; Zhan et al., 2008). Indeed, while non invasive sampling (i.e. hair, saliva, mucus) does not alter animal integrity and life, this method presents serious limitations due to low amount and quality of DNA recovered, and presence of potential PCR inhibitors. Such limitations might result in the absence of amplification or in incorrect genotyping (i.e. allelic dropout). This can lead to serious misinterpretations in conservation studies, in particular when they concern species with low levels of heterozygosity (Taberlet et al., 1999; Zhan et al., 2008), such as sea urchins (Calderón et al., 2008, 2009). On the contrary, non-destructive methods (i.e. blood sample, biopsy) are invasive but result in higher amounts of recovered DNA (Berg et al., 1995).

Because some tissues can regenerate in echinoderms, the nondestructive method is likely to be the most appropriate for this species (Hamm and Burton, 2000; Waters and Roy, 2003, unpublished personal data). In *P. lividus* sea urchins, spines contain muscle cells. These cells are covered by epidermic tissue over the half basal length (Ebert, 1967; Heatfield and Travis, 1975; Märkel and Röser, 1983) and are easily accessible. Therefore, urchin spine appears a good target tissue for DNA collection, even though it may face non-invasive sample limitations, especially when considering young urchins with small spines. Moreover, samples collected underwater may potentially be contaminated by cross-reactive organisms or inhibitors. Because urchin individuals should be replaced at their initial sites after spine sampling, in situ sampling appears to be a more convenient method. To our knowledge, this method has never been assessed in this species.

Molecular genetic analysis dedicated to wildlife monitoring and conservation issues requires a large set of reliable, highly informative and cost-effective genetic markers (Hagerty et al., 2008; Paetkau et al., 1995; Sanchez-Fernandez et al., 2008; Varela et al., 2007). Among those are dominant Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. ISSR consists in nucleotide sequences flanked by two microsatellite priming sites, inversely oriented on opposite DNA strands, and near enough to be effectively amplified by PCR. Interests of ISSR techniques rely on high polymorphism and wide distribution of microsatellites along genomes, which enables to detect low differentiation levels. ISSR PCR analysis has proven to be efficient in gene flow evaluation, fine-scale genetic structure analysis, and parentage determination (Haig et al., 2003; Su et al., 2008; Wolfe and Liston, 1998; Zong et al., 2008). This type of approach is also reproducible, easy to perform and cost effective. Although ISSR has intensively been used to evaluate genetic structure variations in terrestrial ecosystems, its applications to marine population have been reported scarcely (Casu et al., 2005, 2009; Varela et al., 2007) and to date, have never been used in molecular studies on sea urchin.

The objectives of this study were to develop ISSR-PCR and to assess the relevance of an in situ (underwater) spine sampling method, both dedicated to molecular studies that would find applications in conservation and management programs.

Methods

Specimens and sampling procedure

Fifteen individuals were randomly collected during the legal harvesting period (mid-October to mid-April), by snorkelling between the surface and 5 m depth at three close areas (Rayolet, Sicié, Baux Rouges) of the French–east Mediterranean coast (Fig. 1). Divers wore wet suits and gloves. Two age classes of *P. lividus* were considered based on their size: juveniles (less than 1 year old) and adults, whose test diameters were inferior to 2 cm and superior to 4 cm, respectively (Calderón et al., 2009).

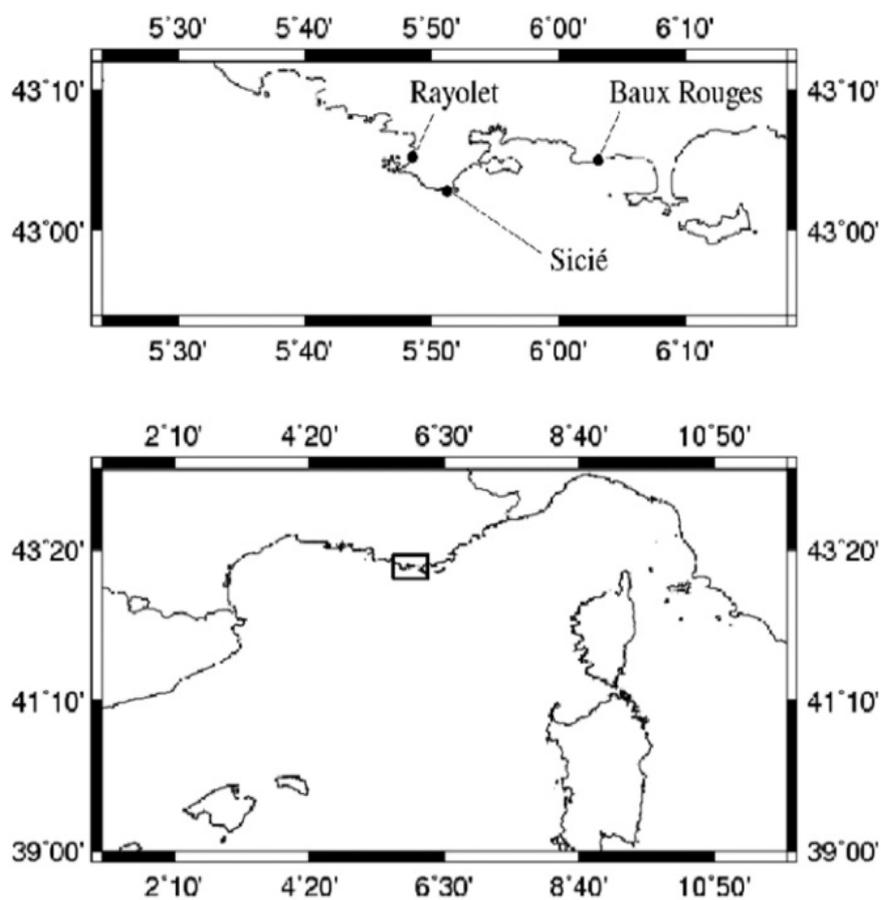


Figure 1: Localization of the studied populations. Top: location of the studied sites. Bottom: overall location of the studied area (frame).

Practically, urchins were hand captured and up to 4 spines were collected at the surface with a clean flat-end clamp and put into a referenced 1.5 ml eppendorf tube with approximately 1 ml of sea water. Following spine collection, the whole urchin was put into a waterproof box with the same reference number as the spine sample. Urchins were sacrificed and a piece of skin around the mouth was collected for tissue DNA extraction. Samples were kept in tubes for the sampling campaign duration (approx. 2 h) after which spines were placed in absolute ethanol and kept at -20°C until DNA extraction.

In order to assess the potential effect of sea water on urchin genotyping profiles, 15 ml of sea water was collected at the surface, from which 1 ml was centrifuged for 10 min at 5000g. Then supernatants were discarded and pellets kept at -20 °C until DNA extraction.

For convenience, spine and skin tissue samples surrounding the mouth will be referred to as “spine” (S) and “tissue” (T), respectively.

To evaluate the efficiency and reliability of the sampling methodology, DNAs purified from spine and tissue for each urchin were genotyped using the ISSR-PCR method described below. Genotyping profiles were then compared to evidence potential contaminations and differences in intensities of amplified bands.

DNA extraction and ISSR-PCR

DNAs were purified using DNeasy Blood and Tissue kit following the “animal issue protocol” (Qiagen), eluted in a 200µl elution buffer and quantified using a spectrophotometer at 260 nm (Eppendorf, Biophotometer Plus).

A set of 6 primers was used (Table 1). They were redesigned to be 16 to 23 nucleotides, with a GC content between 31 and 50%. Optimal annealing temperatures, primer concentrations, magnesium and DNA amounts were assessed. Retained conditions yielded clear and reproducible genotyping profiles.

The reaction mixture consisted in (final concentration): 5 PRIME HotMaster Taq Buffer (1X containing 2.5 mM MgCl₂), 5 PRIME HotMaster Taq polymerase (0.6 U) (Dutscher, France), dNTP (200µM each), primer (2.4µM), 20 ng of DNA and molecular grade water to 15µL. PCRs were performed in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf, France) and conditions were as follows: initial denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min annealing at 50 °C for 50 s, 72 °C for 1 min and a final extension step at 72 °C for 15 min. PCR controls (i.e. negative and seawater) and replicates were included in each PCR amplification to ensure result repeatability and exclude potential PCR contaminations. PCR products (8µL) were analysed by electrophoresis using a 1.5% agarose gel in a 10 mM borate buffer. Gels were run at 110 V for about 2 hours 30 min and stained by soaking in 1µl/10 ml ethidium bromide solution for 10 min. ISSR genotyping profiles were visualised under UV light and recorded by digital photography. Band sizing was performed using 100 bp and 1 kb ladders as references (see figure legends).

Tableau 1: Characteristics of the ISSR primers.

Primers	Sequence (5'–3')	Size range of bands (bp)	Number of bands	Mean number of bands/ind.	Proportion of polymorphic bands (%)		
					Rayolet	Sicié	Baux Rouges
eb6	(CT) ₉ G	310–1250	20	3.9	47.6	76.2	81
eb2m5	(CAGT) ₄ DC	250–1100	16	1.9	22.2	66.7	44.4
G2	(CTT) ₇ AC	300–1500	21	1.5	36.4	68.2	10
G9	(ACA) ₅ G	160–1800	37	5.5	50	89.5	55.3
G8	(AAC) ₅ T	200–3000	41	6	44.2	83.7	72.1
G17	(CTG) ₄ RT	350–1900	19	6.2	36.8	78.9	94.7
Total			154		43.5	83.1	68.2

ISSR analysis

Clear (even faint) and reproducible bands were considered. Smear bands were eliminated from analysis. Amplified ISSR fragments were scored for presence (1) or absence (0) of bands (Haig et al., 2003; Wolfe and Liston, 1998), and converted into allele frequencies. Each band was considered polymorphic if the relevant band was present in one or more, but not all, individuals.

Analysis was performed under the assumption of Hardy–Weinberg equilibrium by means of AFLP-Surv v1.0. (Vekmans, 2002) using Bayesian methods for diploid outcrossing species with non-uniform *a priori* distribution of allele frequencies (Zivotovsky, 1999). This software was used to calculate expected heterozygosity (HE), mean gene diversity within population (HS), total gene diversity (HT) and genetic differentiation among populations (FST). In order to test the significance of FST values at 1%, we performed 1000 permutations. Frequencies of each locus among populations were also determined using the aforementioned software. Clear (even faint) and reproducible bands were considered. Smear bands were eliminated from analysis. Amplified ISSR fragments were scored for presence (1) or absence (0) of bands (Haig et al., 2003; Wolfe and Liston, 1998), and converted into allele frequencies. Each band was considered polymorphic if the relevant band was present in one or more, but not all, individuals. Analysis was performed under the assumption of Hardy–Weinberg equilibrium by means of AFLP-Surv v1.0. (Vekmans, 2002) using Bayesian methods for diploid outcrossing species with non-uniform *a priori* distribution of allele frequencies (Zivotovsky, 1999). This software was used to calculate expected heterozygosity (HE), mean gene diversity within population (HS), total gene diversity (HT) and genetic differentiation among populations (FST). In order to test the significance of FST values at 1%, we performed 1000 permutations. Frequencies of each locus among populations were also determined using the aforementioned software.

Results

ISSR data analysis

Six ISSR-PCR amplifications generated a total of 154 reliable fragments which were all polymorphic, although possibly frequent (Fig. ?). The size of these fragments ranged between 160 and 3000 bp. The average number of bands per individual generated by each primer ranged from 1.5 to 6.2 with an average of 4.2 bands per individual. Analysis of the proportion of polymorphic bands revealed a clear difference between the three tested populations (Table 1). The population of Sicié presented a homogeneous, high level polymorphism with an average of 72.2% and a coefficient of variation (CV) of 11.4%. By contrast, the populations of Rayolet and Baux Rouges presented a lower polymorphism level with an average of 39.5% (CV=25.6%) and 59.6% (CV=50.7%) respectively.

The distribution of the average proportion of polymorphic bands highlighted that 77% of the bands were found in less than 25% of the individuals among the three populations, with an average of 35% of the bands present at a frequency lower than 10% (Table ?). Moreover, 33.1% of the total bands were specific to one or more individuals within a population while 37% of the bands were absent in one population but present in the two others.

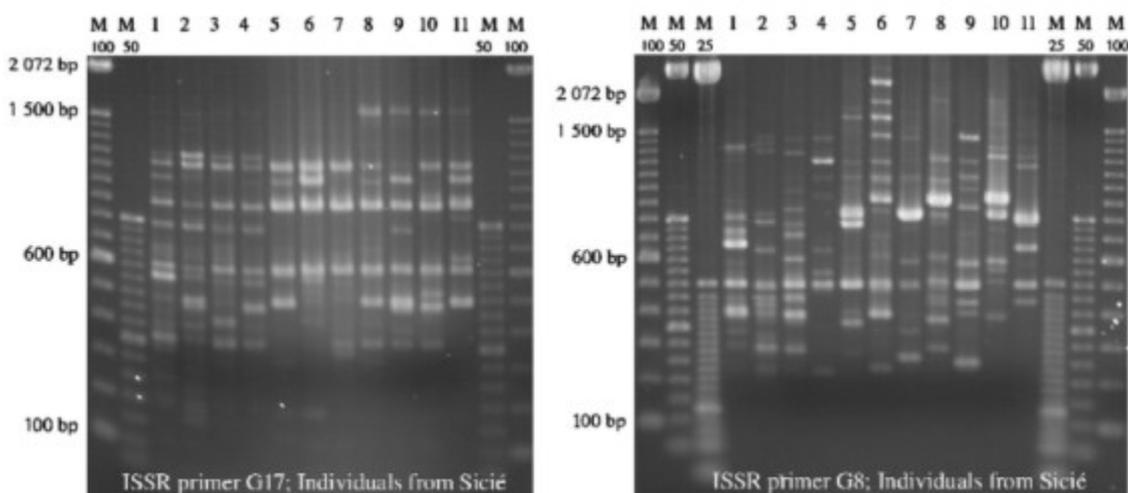


Figure 2: Example of ISSR genotyping profiles. M100, M50 and M25: respectively 100 bp, 50 bp and 25 bp Molecular Weight DNA Ladder (Invitrogen).

Table 2: Distribution of the proportion of polymorphic bands in n % of the whole population.

Primers	Proportion of bands found in less than n % on the whole population					
	n = 10	n = 25	n = 50	n = 75	n = 90	n = 100
eb6	25	55	80	100		
eb2m5	50	87.5	87.5	100		
G2	67	95.5	100			
G9	33	87	95	97.5	100	
G8	27.5	82	97.5	97.5	100	
G17	16	42.5	74	84.5	89.5	100
All	35.2	77.4	91	96.8	98.7	100

Analysis of genetic differentiation between populations for each single primer yielded consistent F_{ST} values for all but eb2m5 primers, ranging from 0.011 to 0.104 ($p < 0.05$). Genetic differentiation was assessed using several primer combinations in order to take into account a high number of bands. The pool of data obtained with the primers eb6 ($F_{ST}=0.104$), G17 ($F_{ST}=0.043$) and G8 ($F_{ST}=0.03$) gave the highest consistent overall F_{ST} value of 0.063. Analysis of pairwise genetic differentiation highlighted that the population of Rayolet was low-to-moderately differentiated from the two other populations, but the populations of Sicié and Baux Rouges were rather poorly differentiated (Table ?). Expected heterozygosities were similar for the populations of Sicié and Baux Rouges, and represented twice that found for the population of Rayolet (Table 3).

Efficiency and reliability assessment of the in situ spine sampling methodology

The total amount of DNA purified from spines was very similar among individuals in the same group and averaged 12 μ g and 1 μ g in adults and juveniles, respectively. The amount of DNA purified from tissue was always more than 50 μ g and was dependent on the mass of sampled tissue. Dilutions of DNA purified from urchin samples did not improve PCR efficiencies, confirming the absence of inhibitors. PCRs performed on pure and diluted DNAs purified from sea water samples were all negative, except when a positive control DNA was added to the reaction mixture that yielded to the expected genotyping profiles (data not shown). Long-sized bands generated by ISSR-PCR confirmed that DNA was likely not degraded (Fig. 3).

Genotyping profiles obtained with DNA purified from either spines or skin tissues were identical in number, size and relative intensities of the bands. Also, intense and individual-specific ISSR bands confirmed the absence of cross-contamination between samples (Fig. 3).

Table 3: Parameters of genetic variability (ISSR primers eb6, G17, G8).

Population	H _E	H _S	H _T	F _{ST} [*]	Pairwise F _{ST} between populations [*]		
Rayolet	0.109				0.000		
Sicié	0.223				0.073	0.000	
Baux Rouges	0.219				0.101	0.032	0.000
All		0.184	0.196	0.063			

* p<0.0001.

Discussion

The first striking result of the present work is that ISSR genotyping profiles were very different from one individual to another, suggesting high genome plasticity. We observed a high genetic diversity with a large proportion of low-frequency ISSR markers. This result was consistent with previous molecular studies performed on *P. lividus* by Duran et al. (2004), Calderón et al. (2008), and more recently by Maltagliati et al. (2010). Based on their study of different markers (i.e. mitochondrial cytochrome c oxidase, 16rRNA gene, adenine nucleotide transporter, nuclear microsatellite and mitochondrial cytochrome b) these authors could not show clear genetic structure of close populations, but demonstrated that *P. lividus* better fit the isolation by distance model (Calderón et al., 2009; Palumbi, 2003). By contrast, Rizzo et al. (2009) reported the use of RAPD, which is similar in principle to ISSR, to distinguish between two relatively close populations of stressed and non-stressed *P. lividus*. While the present study focused on limited data, we have been able to demonstrate moderate yet significant genetic differentiation between three close populations (approximately 20 km between Rayolet and Baux Rouges). The use of several ISSR primers allowed for screening large fractions of the genome with both coding and non-coding regions likely to be amplified. Some specific markers of a population may reflect a particular adaptation to local environments or a local “specificity”. In our study, current, pollution, or physical parameters may explain differences found between the population of Rayolet and the two other populations (Hereu et al., 2004; Pedrotti, 1993). These should be investigated in future dedicated studies. Noteworthy, the population of Rayolet appears to be physically isolated from the populations of Sicié and Baux Rouges, which could explain the moderate pairwise F_{ST} values between Rayolet and either Baux Rouges or Sicié. It is likely that the pool of larvae brought by the east-to-west main Mediterranean circulating current (Ligure) does not easily reach the population of Rayolet, all the more that this site is exposed to the strong north wind Mistral (Hereu et al., 2004; Pedrotti, 1993). In turn self-recruitment also may account for the observed differences.

More evident genetic differentiation between populations is likely possible assuming that it depends on the appropriate choice of ISSR markers to consider (Casu et al., 2009). To this aim, ISSR seems a well-adapted approach, because it likely generates high number of polymorphic data, thus putative population specific markers. Further studies based on

additional ISSR markers will likely lead to a more precise understanding of the population structure (from wide to local scales).

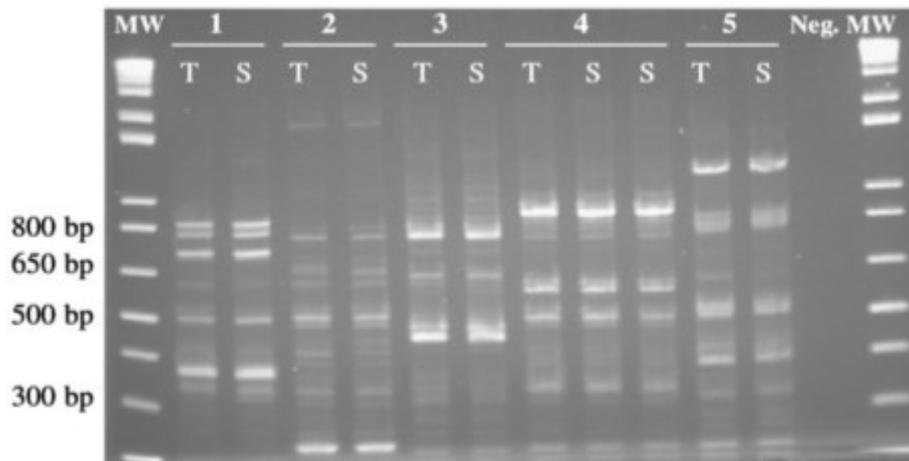


Figure 3: Example of genotyping profiles of 5 individuals obtained from spine or tissue DNA. Profiles were obtained with the primer G9. T: skin tissue; S: spine; MW: 1 kb+ Molecular Weight Ladder (Invitrogen). Individuals 1 to 5 from Sicié.

From a practical point of view, ISSR is cost-effective and requires neither prior knowledge about the genome sequence, nor any a priori concerning the relevance of the genome region studied. Moreover, we have shown that ISSR generate many low-frequency markers, thus it is also a suitable tool for parentage analysis or selective programmes.

Besides ISSR analysis, we proved the relevance of a new in situ sea urchin spine sampling dedicated to genetic analysis. This method has never been described before and presents several advantages. First, our results indicate that there is no need to harvest urchins, that should remain alive at their initial sites (Ebert, 1967; Heat field and Travis, 1975; Märkel and Röser, 1983). Noteworthy, the technique is reliable even for small-size juvenile urchins which are likely less than 1 year old (Calderón et al., 2009). This approach is even more interesting for adult sampling for which the test size cannot be consistently correlated to the age when considering inter-annual cohorts that may present higher genetic differentiation due to pre- and/or post-larval selection (Debenham et al., 2000). Finally, yearly sampling of juveniles is an interesting mean to increase the number of genotyped individuals of a population — they will become progenitors that are already genotypes, which can also help to reduce efforts and costs over time.

Potential environmental contamination might result in a misinterpretation of genotyping profiles with important consequences on conservation and management issues. In order to prevent such bias, water sample should always be included in the experiments.

At last, both the in situ spine sampling and the ISSR method have proved relevant for molecular studies on the sea urchin *P. lividus* species, especially considering endangered populations, and should find applications in management and conservation programmes.

Ongoing research performed on a large number of individuals and populations, using additional ISSR molecular markers, will likely contribute to a better characterization of the

genetic structure of *P. lividus* populations and to the understanding of processes that shape urchin populations in the French east Mediterranean coast.

Acknowledgements

Part of this work has been financially supported by the Institut Océanographique Paul Ricard, the Conseil Régional Provence-AlpesCôte-d'Azur, the Conseil Général du Var (CG83) and Toulon Provence Méditerranée (TPM). We also thank Toulon Var Technologies (TVT) and the Pole Mer PACA for their support.

References

- Berg, D.J., Haag, W.R., Guttman, S.I., Sickel, J.B., 1995. Mantle biopsy: a technique for nondestructive tissue-sampling of freshwater mussels. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 14, 577–581.
- Calderón, I., Giribet, G., Turon, X., 2008. Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Mar. Biol.* 154, 137–151.
- Calderón, I., Palacín, C., Turon, X., 2009. Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Mol. Ecol.* 14, 3036–3049.
- Casu, M., Maltagliati, F., Cossu, P., Lai, T., Galletti, M.C., Castelli, A., Commito, J.A., 2005. Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 325, 46–54.
- Casu, M., Tiziana, L., Curini-Galletti, M., Ruiu, A., Pais, A., 2009. Identification of Mediterranean *Diplodus spp.* and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368, 147–152.
- Debenham, P., Brzezinski, M., Foltz, K., Gaines, S., 2000. Genetic structure of populations of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253, 49–62.
- Duran, S., Palacín, C., Becerro, M.A., Turon, X., Giribet, G., 2004. Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Mol. Ecol.* 13, 3317–3328.
- Ebert, T.A., 1967. Growth and repair of spines in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). *Biol. Bull.* 133, 141–149.
- Guidetti, P., Bussotti, S., Boero, F., 2005. Evaluating the effects of protection on fish predators and sea urchins in shallow artificial rocky habitats: a case study in the northern Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* 59, 333–348.
- Hagerty, B.E., Peacock, M.M., Kirchoff, V.S., Tracy, C.R., 2008. Polymorphic microsatellite markers for the Mojave desert tortoise, *Gopherus agassizii*. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 1149–1151.

- Haig, S.M., Mace, T.R., Mullins, T.D., 2003. Parentage and relatedness in polyandrous comb-crested jacanas using ISSRs. *J. Hered.* 94, 302–309.
- Hamm, D.E., Burton, R.S., 2000. Population genetics of black abalone *Haliotis cracherodii* along the central California coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254, 235–247.
- Heatfield, B.M., Travis, D.F., 1975. Ultrastructural studies of regenerating spines of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. II. Cell types with spherules. *J. Morphol.* 145, 51–71.
- Hereu, B., Zabala, M., Linares, C., Sala, E., 2004. Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Mar. Biol.* 144, 1011–1018.
- Kumar, R., Singh, P.J., Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., Lakra, W.S., 2007. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 992–997.
- Lawrence, H.A., Taylor, G.A., Crockett, D.E., Millar, C.D., Lambert, D.M., 2008. New genetic approach to detecting individuals of rare and endangered species. *Conserv. Biol.* 5, 1267–1276.
- Le Vin, A.L., Adam, A., Tedder, A., Arnold, K.E., Mable, B.K., 2011. Validation of swabs as a non-destructive and relatively non-invasive DNA sampling method in fish. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 107–109.
- Maltagliati, F., Di Giuseppe, G., Barbieri, M., Castelli, A., Dini, F., 2010. Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Biol. J. Linn. Soc.* 100, 910–923.
- Märkel, K., Röser, U., 1983. The spine tissues in the echinoid *Euclidaris tribuloides*. *Zoomorphology* 103, 25–41.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 4, 347–354.
- Palumbi, S.R., 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol. Appl.* 13, S146–S158.
- Pedrotti, M.L., 1993. Spatial and temporal distribution and recruitment of echinoderm larvae in the Ligurian Sea. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 73, 513–530.
- Rizzo, C., Cammarata, M., Di Carlo, M., Pancucci, A., Parrinello, N., 2009. RAPD profiles distinguish *Paracentrotus lividus* populations living in a stressing environment (Amvrakikos Gulf, Greece). *Russ. J. Genet.* 45, 499–503.
- Sanchez-Fernandez, B., Soriguer, R., Rico, C., 2008. Cross-species tests of 45 microsatellite loci isolated from different species of ungulates in the Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) to generate a multiplex panel. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 1378–1381.
- Su, H., Wang, L., Liu, L., Chi, X., Zhang, Y., 2008. Use of inter-simple sequence repeat markers to develop strain-specific SCAR markers for *Flammulina velutipes*. *J. Appl. Genet.* 49, 233–235.

- Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 14, 323–327.
- Varela, M.A., Gonzalez-Tizon, A., Marinas, L., Martinez-Lage, A., 2007. Genetic divergence detected by ISSR markers and characterization of microsatellite regions in *Mytilus mussels*. *Biochem. Genet.* 45, 565–578.
- Vekmans, X., 2002. AFLP-Surv. Available at <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflpsurv.html>.
- Waters, J.M., Roy, M.S., 2003. Marine biogeography of southern Australia: phylogeographical structure in a temperate sea-star. *J. Biogeogr.* 30, 1787–1796.
- Wolfe, A.D., Liston, A., 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J. (Eds.), *Plant Molecular Systematics II*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 43–86.
- Zhan, A., Bao, Z., Hu, X., Lu, W., Wang, S., Peng, W., Wang, M., Hui, M., Hu, J., 2008. Accurate methods of DNA extraction and PCR-based genotyping for single scallop embryos/larvae long preserved in ethanol. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 790–795.
- Zhivotovsky, L.A., 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol. Ecol.* 8, 907–913.
- Zong, M., Liu, H.L., Qiu, Y.X., Yang, S.Z., Zhao, M.S., Fu, C.X., 2008. Genetic diversity and geographic differentiation in the threatened species *Dysosma pleiantha* in China as revealed by ISSR analysis. *Biochem. Genet.* 46, 180–196.

Monitoring of population densities of the exploited edible sea urchin *Paracentrotus lividus* in the area of Toulon agglomeration (Mediterranean French coast): implications for resource management

Sylvain Couvray ^{a,b*}, Robert Bunet ^a, Thomas Miard ^a, Rémy Simide ^b, Damien Kirchhofer ^a, Joel Grillasca ^b, Yvan Martin ^a, Stéphane Coupé ^b and Jean-Luc Bonnefont. ^a

PLOS ONE. Soumis (PONE-D-14-44826).

a Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez – Le Bruscat, 83140 Six Fours Les Plages, France.

b Laboratoire PROTEE, Equipe de Biologie Moléculaire Marine, Université du Sud Toulon-Var, Avenue de l'Université, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, France.

*Corresponding author: Tel: +33 4 94 34 02 49, Fax: +03 4 94 88 05 31, Email address: sylvain.couvray@institut-paul-ricard.org

Keywords: Sea urchin; *Paracentrotus lividus*; stock monitoring; population structure; population density.

Abstract

Over the last forty years, wild populations of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* have experienced gradual demographic erosion along the French Mediterranean coast. Among factors influencing the number of individuals in the populations of *P. lividus*, harvesting by professional and non-professional fishermen is thought to significantly contribute to the stock erosion. Therefore, we assessed in 2011 the existing state of the resource on eight sites along the Toulon coast and followed over a period of three years its demographic evolution on a biannual basis. Field research from 2011 to 2013 showed very low densities, low stock renewal and harvesting sensitivity of *P. lividus* in seven out of the eight sampled sites. Sites exposed to urban waste showed the highest densities for both small and large individuals. All results are discussed with the perspective of developing a sustainable management of this resource.

Introduction

The edible sea urchin *Paracentrotus lividus* is widely distributed along the north-eastern Atlantic coast from Scotland to the south of Morocco, including the Azores, and in the Mediterranean basin [1]. This species preferentially lives on photophilic hard substratum and *Posidonia oceanica* seagrass [2,3] mainly in the first twenty meters depth [1].

Paracentrotus lividus is one of the main grazers in the Mediterranean basin and represents a keystone herbivore that can deplete erect phytobenthic communities. For instance, when present at a high density, *P. lividus* can induce the development and maintenance of

coralline barrens [4–7]. As a consequence, fluctuations in both localized population density and demographic composition of this key species can modify infralittoral benthic communities [1,3,4,8–11].

Significant demographic fluctuations are often observed in time and space [1,12,13]. Mortality rates are predominantly high during the planktonic larval stage and the first year of the benthic life stage, particularly during the post-settlement phase [14–18]. During this critical period, mortality rates depend on the abundance of predators, habitat structure and complexity, and adult density of sea urchins [14–18]. On the other hand, the mortality of adult individuals is influenced by storms and rainfall, predation, diseases and harvesting [9,19,20]. Predators, especially fish, have been reported to control sea urchin communities in the Mediterranean Sea. As a striking example, the abundance of large fish in marine protected areas negatively affects the density of sea urchin populations [6,21,22]. Epizootic diseases such as the bald-sea-urchin disease that happened in the north-western Mediterranean basin in the late 70's-early 80's, are also responsible for massive mortalities [2,23,24].

Furthermore, on many Mediterranean coasts and particularly along the French coast, *P. lividus* is harvested for its valuable palatable roes by professional fishermen as well as recreational and poaching, which significantly influence the abundance of *P. lividus* [25]. With regard to harvesting of the edible sea urchin, the current French legislation imposes a close season (from the 16th of April to the 31st of October) during which harvesting is forbidden, a minimum legal size (test diameter > 5 cm), and unlike professionals, recreational fishermen are restricted to four dozen per day. At last, both professional and recreational harvesting must be performed in apnea, except in the Bouches-du-Rhône department where scuba diving is tolerated for professional fishermen. In spite of such management measures, *P. lividus* populations have experienced a huge decline during the last 40 years on the French eastern Mediterranean coast, partly due to over-exploitation [26–29].

Overall, consequences of human activities, such as pollution, habitat fragmentation and harvesting affect sea urchin communities and their associated ecosystems [26,30–32].

In this context, the regular monitoring of natural stocks is essential to better understand natural population dynamics, to reveal coastal ecosystemic changes, and to help improve the management of the resource in order to better sustain professional harvesting [33,34]. Along the French Mediterranean coasts, such surveillance has been performed in both protected and un-protected areas: in the national park of Port-Cros (Var) [23,24,34], along the Côte Bleue on the west side of Marseille, and in the maritime area of Marseille [35].

In the French Var department, although of major importance, data on abundance and evolution of the natural stocks of *P. lividus* in un-protected areas are still lacking. In addition, no accurate records on landings are available. For these reasons, a long term monitoring of

natural stocks along the littoral of the Toulon agglomeration has been set up. Here we present the current state of the natural stocks of *P. lividus* in this area and a first insight of their evolution based on six sampling campaigns performed during spring and autumn between 2011 and 2013.

Material and methods

Study area

This study has been performed in the north-western Mediterranean French coast, in the Toulon agglomeration area, between Six-Fours-les-Plages (43°05'29.7"N/05°48'27.2"E) and Carqueiranne (43°04'43.8"N/06°02'37.8"E) (Figure 1). Counting campaigns of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* were performed during autumn and spring, respectively before and after the legal harvesting period, from 2011 to 2013. Eight sites were monitored in this area (Figure 1). Among them, Petit-Rouveau, Rix, Bomasse, Coudoulière, Rayolet, Oursinières and Baux-Rouges are subjected to professional and recreational harvesting. The three last sites have been also chosen according to the indications of professional fishermen who had reported a recent population decrease. The site of Sicié has been chosen because harvesting and fishing are prohibited for sanitary concerns. Indeed, the coastal water is chronically exposed to residual urban waste pollution (*i.e.* organic matter enrichment) coming from the waste water treatment plant (WWTP) AMPHITRIA with a capacity of 550.000 population equivalent. An additional site, located outside this area, was sampled from 2012 according to its similarity to Sicié. This creek, called Podestat (43°12'37.7"N/05°22'60.0"E), is located in the heart of the national park of Marseille creeks (north-western Mediterranean, French coast) and subjected to discharges from the WWTP of Cortiou (1 800 000 population equivalent). On this site, the communities of sea urchins and the associated ecosystem have been regularly studied for 50 years [31,36,37].

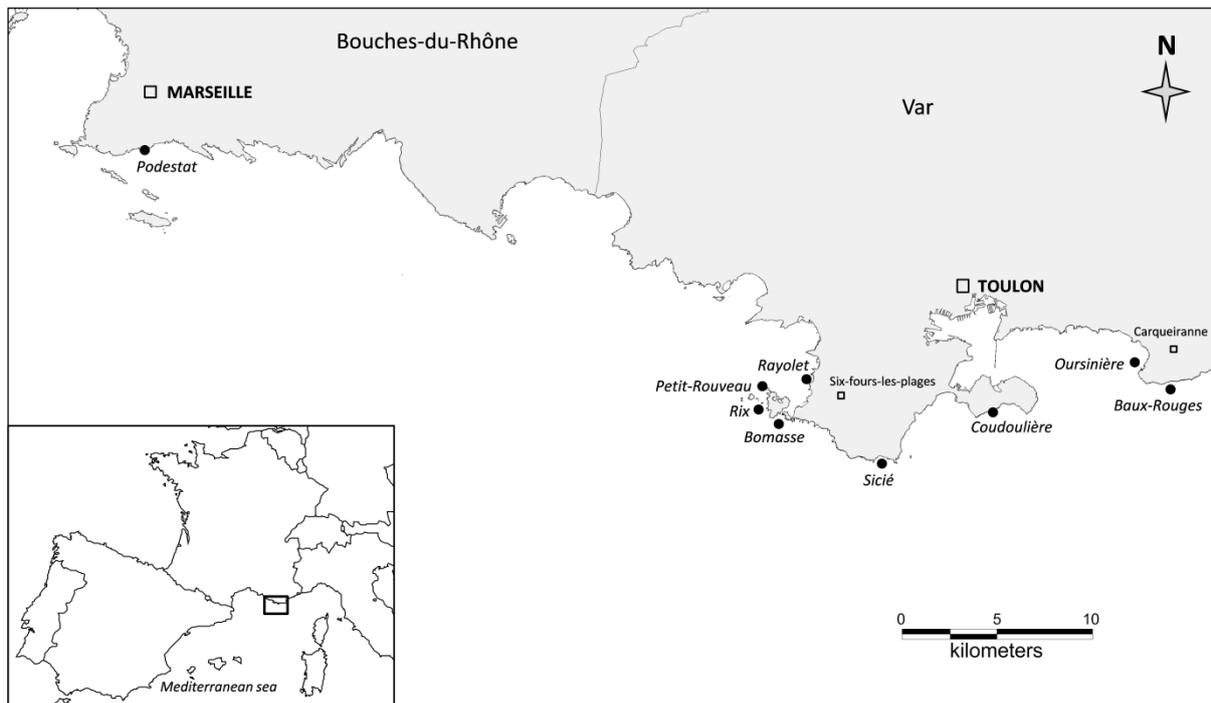


Figure 1: Study sites for the monitoring of *Paracentrotus lividus* populations on the Toulon area.

Fieldwork

Monitoring of the sea urchin stocks was assessed through a visual counting method on permanent transects, shaped using geo-referenced "Feno" topographic tags. Three transects of 60 m² (30 x 2 m) were set up at each site. Where possible by topography and presence of suitable living environment, transects were placed at 3 different depths between 3 and 9 m, in order to give further indications on the distribution of sea urchins in term of depth and nature of the bottom (Table 1). Transects were materialized by a 30-meter tape, which start from a fixed tag and orientated in a specific direction, parallel to the coast to keep depth roughly constant over the entire length. The width was determined by a two meter rigid rod marked in the middle and scrolled along the length.

Table 1: Localisation of sites and transects.

Site	N° transect	GPS position (WGS84)	Direction	Depth (m)	
				start	arrival
Rayolet	1	43°05'29.7"N/05°48'27.2"E	160°	3.4	2.3
	2*	43°05'27.8"N/05°48'28.3"E	200°	3.0	2.0
	3	43°05'27.6"N/05°48'25.4"E	210°	3.3	2.5
Petit Rouveau	1*	43°05'02.6"N/05°48'45.9"E	300°	0.8	0.8
	2	43°04'59.4"N/05°46'42.5"E	300°	3.4	3.9
	3	43°05'04.5"N/05°48'45.8"E	270°	6.0	6.5
Rix	1*	43°04'32.2"N/05°46'39.4"E	340°	3.4	2.5
	2	43°04'31.1"N/05°46'37.3"E	320°	6.0	5.5
	3	43°04'32.6"N/05°46'35.5"E	180°	9.3	9.3
Bomasse	1*	43°04'15.4"N/05°47'03.9"E	230°	3.4	3.0
	2	43°04'16.2"N/05°47'03.1"E	230°	6.0	6.5
	3	43°04'17.5"N/05°47'02.4"E	230°	9.8	9.0
Sicié	1	43°02'59.0"N/05°50'52.6"E	200°	3.5	4.8
	2*	43°02'58.9"N/05°50'52.5"E	210°	4.9	4.8
	3	43°02'58.7"N/05°50'52.3"E	230°	6.0	7.3
Coudoulière	1*	43°04'12.1"N/05°55'35.2"E	60°	4.1	3.5
	2	43°04'11.7"N/05°55'35.9"E	60°	6.5	6.5
	3	43°04'11.4"N/05°55'37.2"E	70°	9.3	8.8
Oursinnières	1*	43°05'14.9"N/06°01'15.3"E	210°	3.8	3.8
	2	43°05'15.1"N/06°01'14.5"E	230°	6.0	5.3
	3	43°05'15.4"N/06°01'14.0"E	220°	7.6	8.0
Baux Rouges	1*	43°04'43.8"N/06°02'37.8"E	260°	3.5	3.7
	2	43°04'43.7"N/06°02'38.2"E	280°	6.0	5.5
	3	43°04'43.7"N/06°02'38.6"E	290°	10.4	9.0
Podestat	1*	43°12'37.7"N/05°22'60.0"E	50°	5.5	4.5
	2	43°12'39.4"N/05°23'0.9"E	100°	2.0	2.5
	3	43°12'37.0"N/05°23'02.0"E	45°	6.0	4.5

* selecting transects which have the most similar and suitable nature of substratum for *P. lividus*.

Each transect was divided into six sections of 5 m long to produce sufficient sub-sampling units for statistical data analyses. All visible *P. lividus* sea urchins along transects were counted and classified according to two size classes: (i) small individuals with a test diameter smaller than 4 cm and (ii) large individuals with a test diameter larger than 4 cm. Despite the harvesting legal size of 5 cm, we estimated at 4 cm the size concerned by harvesting [35]. No stones were moved to search for hidden sea urchin juveniles. For size measurement, only the test diameter excluding spines was used for analysis. The nature of the bottom was recorded within each transect section by estimating the percentage of each type of substratum (Figure 2). Five types were defined: sand, shingles, boulders, rocks and *Posidonia oceanica* seagrass. Algal coverage has also been observed in order to detect the presence of barrens, which indicates overgrazing.

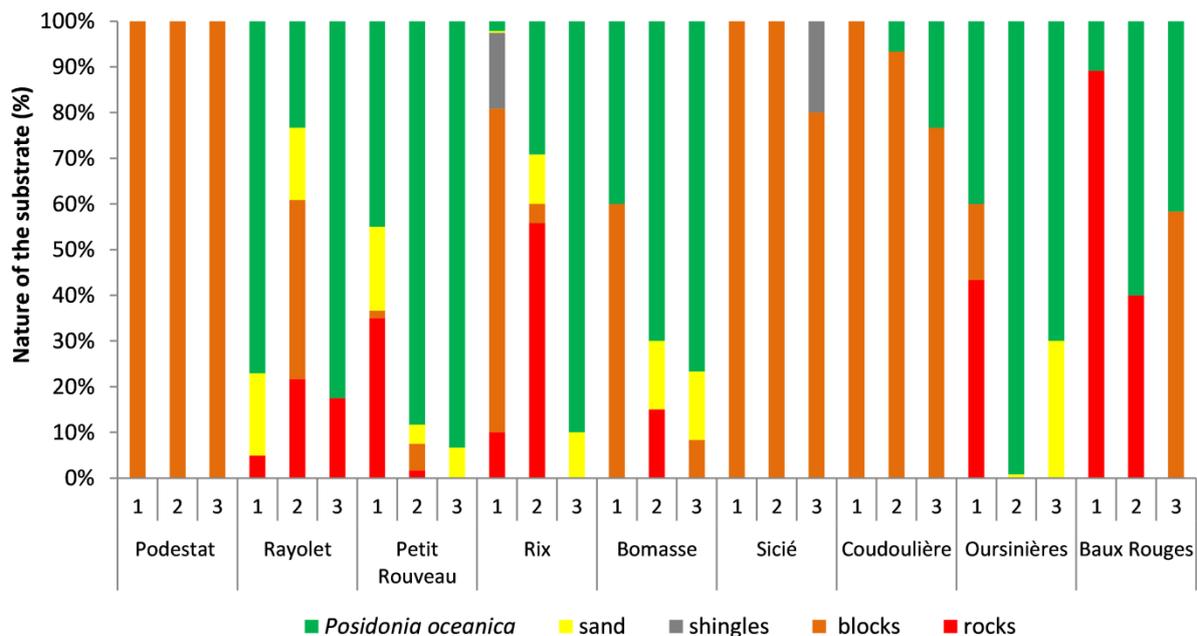


Figure 2: Nature of the substratum (percentage cover) on each transects for the eight sampled sites. The depths of each transect are shown in Table 1.

Statistical data analyses

Density data are expressed in individuals per square meter (ind.m^{-2}) and are reported as mean \pm standard error. The assumption of normality of data was tested by the Shapiro-Wilk test (XLSTAT®). Because normality was not fulfilled even after transformation, non-parametric statistics were used for data analysis.

Non-parametric analysis of variance PERMANOVA based on Bray-Curtis dissimilarity (PERMANOVA V.6.1), [38] was performed to test spatial and temporal variability on the two size classes of *P. lividus* densities. PERMANOVA is a powerful non-parametric method of analysis of variance, based on permutation tests [38,39]. Spatial variability was tested with a hierarchical design with two factors: site as a random factor and transect as a random factor nested in site. To test temporal variability, we applied a similar design with year as a fixed factor and season (spring *versus* autumn) as a fixed factor nested in year. A complementary two-way PERMANOVA was performed to test interaction between time and space with year as a fixed factor and site as a random factor. To test the variation of population density of commercial sea urchin (> 4 cm) after the campaign of exploitation, we performed a two-way PERMANOVA with campaign counting as a fixed factor and site as a random factor. P-values were calculated using 9999 permutations.

Correlations between sea urchin densities for the two size classes, depth and nature of biotope (percentage of each of the five substratum types) were investigated using Spearman's rank of order test (XLSTAT®).

Then, variability between sites was assessed taking into account the most relevant transects per site, including Podestat, using the non-parametric test of Kruskal-Wallis (XLSTAT®), in order to limit as much as possible the influence of substratum (Table 1, Figure 2 and results section). This test was used instead of PERMANOVA because of the unbalanced experimental design (4 counting campaigns for Podestat versus 6 for the other sites). In addition, the non-parametric post-hoc test of pairwise multiple comparison procedure according to Dunn was used to test potential discontinuities between group of sites considering their density [40]. For each test, the level of significance was set as $p < 0.05$.

Ethics statement

No specific permissions for observational activities in these locations were required as this study was supported and approved by the community of agglomeration Toulon Provence Méditerranée, the local management authority of the area (agreement No. DC12/843). The field studies did not involve endangered or protected species.

Results

Variability of *P. lividus* densities in the Toulon area

During the six counting campaigns and taking into account all sites of the Toulon area, the observed mean density in *P. lividus* individuals was 1.67 ± 0.14 ind.m⁻². The mean density of the small (test < 4 cm) individual population was 0.54 ± 0.04 ind.m⁻² while the large (test > 4 cm) individual density was 1.13 ± 0.11 ind.m⁻² (Figure 3).

The statistical analysis using the two-way PERMANOVA reveals that *P. lividus* densities vary significantly between sites (Table 2). Highest densities were always observed at Sicié with a mean density of 9.43 ± 0.71 ind.m⁻², which represents 72.95 % of all counts. In contrast, the lowest densities were always observed at Oursinières (0.06 ± 0.01 ind.m⁻²), which represents 0.3 % of all counts (Figure 3).

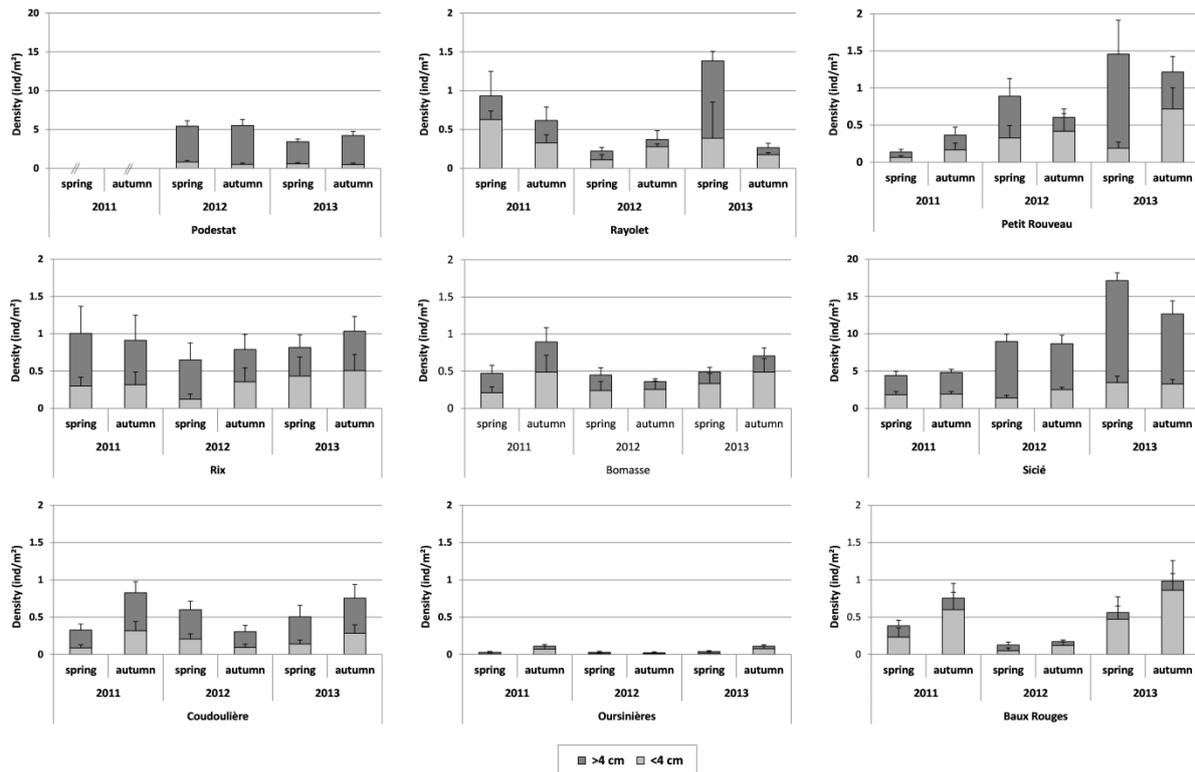


Figure 3: Densities of small (<4 cm) and large (> 4 cm) individuals of *P. lividus* of each site. The ordinate scale of the graph of Sicié is different from other graphics. Error bars represent the standard error.

The statistical analysis performed with the selected transects (see below), revealed significant differences in density between four groups of sites (Figure 4). Group A contains the sites with the lowest densities, Oursinières and Rayolet being the more depleted. Groups B and C shares three sites (Coudoulière, Bomasse, and Rix) on the five they contain (Baux Rouges, Coudoulière, Bomasse, Rix and Petit Rouveau). Group D clusters Sicié and Podestat, the two sites exposed to urban waste and subject to harvesting prohibition due to health risks, along with the site Petit Rouveau, which also belongs to group C. This analysis evidences a site effect *per se* regarding *P. lividus* densities in this area.

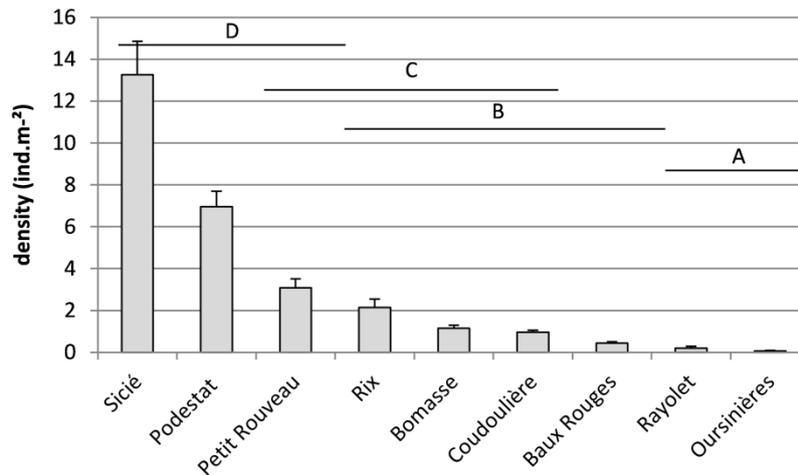


Figure 4: Post-hoc test of Dunn comparing sites based on their *P. lividus* densities on preferential transects. Error bars represent the standard error.

In situ* spatial distribution of *P. lividus

Within each site, field observations showed heterogeneous distribution of sea urchins with a tendency to aggregation. The two-way PERMANOVA reveals a within-site structuration of *P. lividus* density (Table 2).

Table 2: PERMANOVA analyses based on Bray-Curtis dissimilarity for *P. lividus* density data.

Source	df	MS	Pseudo-F	P (perm)
Site	7	77651.36	55.53	0.0001
Transect (site)	16	55878.81	39.96	0.0001
Residual	840	1398.49		
Total	863			
Year	2	5409.96	1.89	0.1062
Season (Year)	3	1530.64	0.53	0.7885
Residual	858	2865.30		
Total	863			
Year	3	2453.03	0.58	0.6972
Site	7	77651.37	32.53	0.0001
Year*Site	14	4200.76	1.76	0.0076
Residual	840	2387.00		
Total	863			
Campaign counting	5	3082.37	0.97	0.4564
Site	7	78773.11	35.79	0.0001
Campaign counting*Site	35	3166.98	1.44	0.0134
Residual	816	2201.19		
Total	863			

Spearman's ranks of order tests indicate that *P. lividus* densities negatively correlate with depth, sandy substrate and *Posidonia oceanica* seagrass ($P < 0.001$) (Table 3). Conversely, the *P. lividus* density positively correlates with covering on blocks and shingles ($P < 0.001$). On the studied sites, the nature of the bottom is linked to depth; covering in blocks significantly negatively correlate with depth ($P < 0.001$) while covering in sand and *Posidonia oceanica* seagrass significantly positively correlate with depth ($P < 0.001$). Within each site, the sea urchin densities are thus influenced by the nature of substratum and *P. lividus* is mostly encountered in the first meters depth on rocky substrate.

Table 3: Spearman correlation values for sea urchins, depth and habitat.

	density of <i>P. lividus</i>	density < 4 cm	density > 4 cm	depth	rocks	blocks	shingles	sand	<i>Posidonia oceanica</i>
density of <i>P. lividus</i>									
density < 4 cm	0.882***								
density > 4 cm	0.908***	0.834***							
depth	-0.444***	-0.414***	-0.36***						
rocks	-0.047	0.004	-0.086**	-0.272***					
blocks	0.531***	0.442***	0.539***	-0.182***	-0.499***				
shingles	0.245***	0.197***	0.267***	-0.009	-0.075*	0.122***			
sand	-0.364***	-0.287***	-0.319***	0.189***	0.055	-0.497***	-0.141***		
<i>Posidonia oceanica</i>	-0.597***	-0.517***	-0.573***	0.307***	0.003	-0.770***	-0.258***	0.348***	

*: significant values at $\alpha=0.05$ (two-tailed), **: significant values at $\alpha=0.01$ (two-tailed) and ***: significant values at $\alpha<0.001$ (two-tailed)

Temporal fluctuation of *P. lividus* densities

Densities of *P. lividus* were assessed at each site on three distinct transects from 2011 to 2013 before and after the harvesting periods (autumn and spring respectively) (Figure 3). In order to examine both the overall seasonal and annual abundance fluctuation of *P. lividus* in the whole study area, a two-way PERMANOVA was performed (Table 2). Altogether, no significant annual or seasonal effect was detected during the studied period. However, at the spatial scale of site, the PERMANOVA analysis crossing factor Year and factor Site revealed a temporal fluctuation of density (Table 2). A complementary test of pairwise comparisons on the interaction among factor Year and factor Site showed that only densities at Sicié increased significantly between 2011 and 2013 ($P\text{-perm} < 0.0001$) (data not shown).

A fourth PERMANOVA (Counting campaign*Site, see Table 2) confirmed the hypothesis of a difference in the density of large sea urchin individuals (> 4 cm) between the start (autumn) and the end (spring) of the legal harvesting period. The *post-hoc* test of pairwise comparisons revealed that this fluctuation only involved the site of Sicié.

Demographic structuration

In this study, we deliberately considered two classes of size for *P. lividus* individuals, reflecting either the renewal stock (< 4 cm) or the harvesting stock (> 4 cm). The highest densities of small individuals were observed at Sicié ($2.40 \pm 0.22 \text{ ind.m}^{-2}$) and Podestat ($0.60 \pm 0.09 \text{ ind.m}^{-2}$), the two sites accounting for the highest proportion of large individuals (74.60 % and 87.07 % respectively) (Figure 3). Conversely, the lowest densities in small sea urchins were found in the six other sites that also exhibit the weakest densities of large individuals. A Spearman's rank of order test confirmed that the density of small individuals was positively correlated ($P < 0.01$) with the density of large individuals (Table 3). Independently of the site, small individuals were more often observed in the direct neighborhood of large individuals. This is consistent with previous observations in other studied areas [41,42]. Besides, small individuals are preferentially found in the first meters depth on rocky substrates, like large individuals (Figure 3). It is thus likely that sites depleted with large individual communities possess a weak potential of stock regeneration.

Discussion

This 3-year monitoring study reports the first data depicting the current structuration and dynamics of the natural stock of *P. lividus* at various sites encompassing the coastal area of Toulon (Var, France).

The observed exploited populations are at steady low densities and sensitive to harvesting

The observed average densities were lower than 1 ind.m⁻² when considering all three transects (3, 6 and 9 m depths) at each site. However, this value results from the non-homogenous distribution of sea urchins within a same site as the average density value is lowered by the decreasing density with depth. Indeed, similarly to previous studies [24, 43, 55] we evidenced that, in our study area, *P. lividus* sea urchins preferentially locate in shallow depths, *i.e.* in the first 3 meters. Then, when considering preferential transects, the observed averaged densities were between 1 and 3 ind.m⁻² for 4 out of the 7 monitored harvested sites of Toulon area (namely Petit Rousseau, Rix, Bomasse and Coudoulière), but lower than 0.5 ind.m⁻² for the 3 others (Rayolet, Oursinières, Baux Rouges). By comparison with the most recent demographic data in the area in 2003, the average density of *P. lividus* population in the marine protected area of Port-Cros Island was approaching 1.5 ind.m⁻² at similar depths (3 m) [24]. Such a density was also reported in shallow waters around the Porquerolles island which is located seven kilometers away from Port-Cros and where harvesting is allowed [43]. This suggests that the reserve effect has a rather limited influence on the observable size of *P. lividus* communities.

The site effect on *P. lividus* population densities that we evidenced in this study highlights two main groups of exploited populations in the Toulon area. A first group comprising the sites Petit Rousseau, Rix and Bomasse, have densities similar to those of the populations of Port-Cros and Porquerolles, and are located on islands as well. A second group with densities under 0.5 ind.m⁻² includes more accessible coastal sites such as Baux Rouges, Rayolet and Oursinières. Though we have not directly assessed the influence of the site accessibility on sea urchin population densities, we assume that islander populations are less sensitive to recreational captures. On the contrary, coastal populations are plausibly more impacted by the combined effect of both professional and recreational captures.

During the studied period, the annual average densities in harvested sites show no significant variation, and surprisingly, the comparison of data gained from the six counting campaigns before and after the legal harvesting periods revealed no significant density fluctuation of marketable individuals. At a short time scale, the impact of harvesting activities on *P. lividus* stocks thus appears limited.

Historic reported landings of *P. lividus* in South of France reveal constant decrease of catch since 1970, which indirectly indicate a collapse of stocks [44,45]. In the 80's, the populations of *P. lividus* in the neighboring department of the Bouches-du-Rhône displayed higher

densities and were considered critical [26,28]. Nowadays, the densities we observe in the Var department are equivalent to the current densities of the monitored *P. lividus* populations in the Bouches-du-Rhône department, which are considered depleted, causing major concerns regarding sustainable professional activities of sea urchin harvesting [35].

Given the weak population densities and the sensitivity of sea urchins to rare events such as storms, rainfall or diseases, the maintenance of populations at low demographic levels increases the risk of collapse, as it already happened in French Brittany and Ireland despite the cessation of harvesting [44,46,47]. The risk of collapse could also be aggravated by the sensitivity of sea urchin communities to the Allee effect [49] where the growth rate of the population is positively correlated with the proportion of larger individuals that can offer protection of recruits with their spine canopies [41,48,50].

The case of the unexploited *P. lividus* populations exposed to urban waste water effluents

Interestingly, we found similarities in densities and structuration of *P. lividus* populations between the sites of Sicié and Podestat that are continuously exposed to urban WWTP effluents. In addition, they are both characterized by a rocky substratum with encrusting and turf algal coverages, sometimes displaying an overgrazed habitat with barren grounds. These two sites present significantly higher population densities than the other monitored sites, for both large and small individuals of *P. lividus*, with a high proportion of large individuals. Such a difference between exposed and unexposed populations to WWTP effluents have been well documented since the mid 70's [1,31,36,37,46] and *P. lividus* was demonstrated to cope with organic enrichment which promoted its development compared to other species [31]. As an example, in the early 80's, observed densities between 2 and 15 meter depth reached 40 ind.m⁻² at Podestat [31], while densities at Port-Cros barely reached 10 ind.m⁻² [24]. The commissioning of the WWTP for the Marseille area in 1987 resulted in about 80% reduction of the solid phase and dissolved pollutants [34]. Species sensitive to organic pollution started to recover in this area [52] and consequently population densities of *Paracentrotus lividus* decreased. Therefore, the high densities of populations *P. lividus* observed in the 70's and nowadays near WWTP, could result from the enrichment of coastal sea water in organic matter that artificially promotes pullulating of this species.

Implications and suggestions to harvesting management

Evidently the sea urchin resource would benefit from a pause in the exploitation of certain coastal sites to favor re-growing of the stock. Nevertheless, the recruitment and survival of juveniles that constitute the renewal stock directly depend on adult densities and aggregates [41,52–55]. From our study, most, if not all, of the harvested sites in the Toulon area are already depleted in large individuals and such a lack in protective aggregates of adults could impede the dynamic of rapid stock restoration. Therefore we could also envisage to artificially restocking some of the depleted and temporary protected sites with large individuals to promote natural recruitment and protection of juveniles. In parallel, this

approach should be accompanied by an effective permutation system between the various cantonment sites to allow efficient use of the resource. As pointed by Ourens *et al.* [55], capture regulations of sea urchins should take into account the Allee or compensatory effect [48]. After a cycle of cantonment, the exploitation of aggregations should thus be partial to leave enough adults at the end of the harvesting campaign allowing the natural replenishment of the stock for further exploitation. Such a management strategy needs to be followed over time to estimate and adjust the minimum threshold density of *P. lividus* that must be maintained in each site. In addition, though densities are informative to describe trends in demographic evolution of sea urchin populations, it does not inform on the capacity of acceptance of one site that is essential for further harvesting management. It would therefore be relevant to evaluate in a future study, the proportion of suitable habitats within each site. Finally, this monitoring will have to be followed over a longer period to assess the relevance of such potential implementations of the existing policy in term of biological, ecological and socio-economic impacts.

Acknowledgment

This study was supported by the community of agglomeration Toulon Provence Méditerranée (TPM). The authors wish to thank Daniel Rebillard and Élodie Rouanet for their technical assistance and expertise.

References

1. Boudouresque CF, Verlaque M (2007). Ecology of *Paracentrotus lividus*. In: Lawrence JM, editor. Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Oxford, UK: Elsevier. pp. 243-285.
2. Boudouresque CF, Nedelec H, Shepherd SA (1980) The decline of a population of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the bay of Port-Cros (Var, France). *Trav Sci Parc Nation Port-Cros Fr* 6: 243-251.
3. Azzolina JF, Boudouresque CF, Nedelec H (1985) Dynamique des populations de *Paracentrotus lividus* dans la baie de Port-Cros (Var): données préliminaires. *Sci Rep Port-Cros Natl Park* 11: 61-81.
4. Verlaque M (1984) Biologie des juvéniles de l'oursin herbivore *Paracentrotus lividus* (Lamarck): sélectivité du broutage et impact de l'espèce sur les communautés algales de substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France). *Bot Mar* 27: 401-24.
5. Frantzis A, Berthon JF, Maggiore F (1988) Relations trophiques entre les oursins *Arbacia lixula* et *Paracentrotus lividus* (*Echinoïda regularia*) et le phytobenthos infralittoral superficiel dans la baie de Port-Cros (Var, France). *Sci Rep Port-Cros Natl Park* 14: 81-140.
6. Sala E, Zabala M (1996) Predation and the structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser* 140: 71-81.

7. Ruitton S, Francour P, Boudouresque CF (2000) Relationships between algae, benthic herbivorous invertebrates and fishes in rocky sublittoral communities of a temperate sea (Mediterranean). *Estuar Coast Shelf Sci* 50: 217-230.
8. Palacin C, Giribert G, Carner S, Dantart L, Turon X (1998) Low densities of sea urchins influence the structure of algal assemblages in the western Mediterranean. *J Sea Res* 39: 281-290.
9. Sala E, Boudouresque CF, Harmelin-Vivien M (1998) Fishing, trophic cascades, and the structure of algal assemblages: evaluation of an old but untested paradigm. *Oikos* 82: 425-439.
10. Barnes DKA, Verling DKA, Crook A, Davidson I, O'Mahoney M (2002) Local population disappearance follows (20 yr after) cycle collapse in a pivotal ecological species. *Mar Ecol Prog Ser* 226: 311-313.
11. Hereu B (2005) Movement patterns of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a marine reserve and an unprotected area in the NW Mediterranean. *Mar Ecol* 26: 54-62.
12. Lozano J, Galera J, Lopez S, Turon X, Palacin C, Morera G (1995) Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar Ecol Prog Ser* 122: 179-191.
13. Hereu B, Linares C, Sala E, Garrabou J, Garcia-Rubies A, Diaz D, et al. (2012) Multiple processes regulate long-term population dynamics of sea urchins on Mediterranean rocky reefs. *PLoS ONE* 7(5): e36901.
14. Pedrotti ML, Fenaux L (1992) Dispersal of echinoderm larvae in a geographical area marked by upwelling (Ligurian Sea, NW Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser* 86: 217-227.
15. Fenaux L (1994) Five tests of food-limited growth of larvae in coastal waters by comparisons of rates of development and form of echinoplutei. *Limnol Ocean* 39(1): 84-98.
16. Lopez S, Turon X, Montero E, Palacin C, Duarte CM, Tarjuelo I (1998) Larval abundance, recruitment and early mortality in *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). Interannual variability and plankton-benthos coupling. *Mar Ecol Prog Ser* 172: 239-251.
17. Luis O, Delgado F, Gago J (2005) Year-round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Relevance for the use of its larvae as live feed. *Aquat Living Resour* 18: 45-54.
18. Prado P, Tomas F, Pinna S, Farina S, Roca G, Ceccherelli G, et al. (2012) Habitat and scale shape the demographic fate of the keystone sea urchin *Paracentrotus lividus* in Mediterranean macrophyte communities. *PLoS ONE* 7(4): e35170.
19. Guidetti P (2004) Consumers of sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, in shallow Mediterranean rocky reefs. *Helgol Mar Res* 58: 110-116.
20. Fernandez C, Pasqualini V, Boudouresque C-F, Johnson M, Ferrat L, Caltagirone A, et al. (2006) Effect of an exceptional rainfall event on the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) stock and seagrass distribution in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuar Coast Shelf Sci* 68: 259-270.

21. Boudouresque CF, Caltagirone A, Lefevre JR, Rico V, Semroud R (1992) Macrozoobenthos de la réserve de Scandola (Corse, Méditerranée Nord-Occidentale). Analyse plurianuelle de "l'effet réserve". In: Olivier J, Gerardin N, Jeudi de Grissac A, editors. Economic impact of the Mediterranean coastal protected areas. Hyères, France; Medpan. pp. 15-20.
22. Sala E, Ribes M, Hereu B, Zabala M, Alva V, Coma R, et al. (1998) Temporal variability in abundance of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in the northwestern Mediterranean: comparison between a marine reserve and an unprotected area. *Mar Ecol Prog Ser* 168: 135-145.
23. Azzolina JF (1987) Evolution à long terme des populations de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* dans la baie de Port-Cros (Var, France). In: Boudouresque CF, editor. Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. Marseille, France: GIS Posidonie publ. pp. 257-269.
24. Hereu B, Linares C, Diaz D, Dantart L, Garrabou J, Sala E, et al. (2005) Indicateur de diversité en milieu marin: les échinodermes; Fluctuations temporelles des peuplements d'échinodermes à Port-Cros 1982-2003. Port-Cros. 29 p.
25. Gianguzza P, Chiantore M, Bonaviri C, Cattaneo-Vietti R, Vielmini I, Riggio S. (2006) The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). *Fish Res* 81: 37-44.
26. Régis MB, Pérès JM, Gras G. (1985) Données préliminaires sur l'exploitation de la ressource: *Paracentrotus lividus* (Lmck) dans le Quartier Maritime de Marseille. *Vie Mar* 7: 41-60.
27. Le Direac'h JP, Boudouresque CF, Antolic B, Kokatas A, Panayotidis P, Pancucci A, et al. (1987) Rapport sur l'exploitation des oursins en Méditerranée. In: Boudouresque CF, editor. Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. Marseille, France: GIS Posidonie publ. pp. 329-334.
28. Régis MB (1989) Impact et résultats de la Campagne « Sauvons l'oursin comestible: *Paracentrotus lividus* » (Echinodermata, Echinoïda). *Vie Mar Hors Séries* 10: 150-157.
29. Guidetti P, Terlizzi A, Boero F (2004) Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). *Fish Res* 66: 287-297.
30. Harmelin JG, Bouchon C, Duval C, Hong JS (1980) Les échinodermes des substrats durs de l'île de Port-Cros, Parc-national (Méditerranée Nord-Occidentale). Eléments pour un inventaire quantitatif. *Trav Sci Parc Nation Port-Cros Fr* 6: 25-38.
31. Harmelin JG, Bouchon C, Hong JS (1981) Impact de la pollution sur la distribution des échinodermes des substrats durs en Provence (Méditerranée Nord-Occidentale). *Téthys* 10(1): 13-36.
32. Iuri V, Patti FP, Procaccini G (2007) Phylogeography of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea): first insights from the South Tyrrhenian Sea. *Hydrobiologia* 580: 77-84.

33. Boudouresque CF, Verlaque M, Azzolina JF, Meinesz A, Nedelec H, Rico V (1989) Evolution des populations de *Paracentrotus lividus* et d'*Arbacia lixula* (Echinoidea) le long d'un transect permanent à Galeria (Corse). *Trav Sci Parc Nat Reg Res Nat Corse Fr* 22: 65-82.
34. Harmelin JG, Hereu B, Martiny de Maissonave L, Teixidor N, Dominguez L, Zabala M (1995) Indicateurs de biodiversité en milieu marin: Les échinodermes. Fluctuation temporelles des peuplements d'échinodermes à Port-Cros. Comparaison entre les années 1982-84 et 1993-95. Parc National de Port-Cros. 13 p.
35. Bachet F, Monin M, Charbonnel E, Bretton O, Cadville B (2014) Suivi de l'évolution des populations d'oursins comestibles (*Paracentrotus lividus*) sur la Côte Bleue – Résultats des comptages d'avril 2014. Rapport Parc Marin de la Côte Bleue et Comité Régional des Pêches Maritimes PACA, avril 2014. 17 p.
36. Delmas P, Régis MB (1984) Influence d'une pollution complexe à dominante domestique sur les populations de l'échinoïde comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck). *Vie Mar* 6: 63-72.
37. Delmas P (1992) Etude des populations de *Paracentrotus lividus* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea) soumises à une pollution complexe en Provence Nord-occidentale: densités, structure, processus de détoxication (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe). Marseille: université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille III. 205 p.
38. Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26: 32-46.
39. Bonaviri C, Gianguzza P, Pipitone C, Hereu B (2012) Micropredation on sea urchins as a potential stabilizing process for rocky reefs. *J Sea Res* 73: 18-23.
40. Dunn OJ (1964) Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6: 241-252.
41. Tegner MJ, Dayton PK (1981) Population structure, recruitment and mortality of two sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) in a kelp forest. *Mar Ecol Prog Ser* 5: 255-268.
42. Hunte W, Younglao D (1988) Recruitment and population recovery of *Diadema antillarum* (Echinodermata; Echinoidea) in Barbados. *Mar Ecol Prog Ser* 45: 109-119.
43. Hereu B, Linares C, Diaz D, Teixidor N, Zabala M (2006) Diversité d'échinodermes dans les fonds marins de Porquerolles. Report No : Contrat n° 05-018. 52 p.
44. Andrew NL, Agatsuma Y, Ballesteros E, Bazhin AH, Creaser EP, Barnes DKA, et al. (2002) Statut and management of world sea urchin fisheries. *Oceanogr Mar Biol* 40: 343-425.
45. FAO (2012). Global Production Statistics 1950-2012. Available: <http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector>. Accessed 02 August 2014.
46. Allain JY (1975) Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea) soumises à la pêche sur les côtes nord de Bretagne. *Rev Trav Inst Pêch Marit* 39(2): 171-212.

47. Williams H (2002) Sea urchin fisheries of the world: a review of their status, management strategies and biology of the principal species. Tasmania: Department of primary industries, water and environment. 29 p.
48. Bostford LW, Campbell A, Miller RJ (2004) Biological reference points in the management of North American sea urchin fisheries. *Can J Fish Aquat Sci* 61: 1325-1337.
49. Allee W (1931) *Animal Aggregations: A Study in General Sociology*. Chicago: University of Chicago Press. 431 p.
50. Kramer AM, Dennis B, Liebhold AM, Drake JM (2009) The evidence for Allee effects. *Popul Ecol* 51: 341-354.
51. Reish DJ, Bellan G (1995) The long-term effects of municipal discharges from urban areas on the marine environment: a review. In: Bellan-Santini D, Bonin G, Eming CC, editors. *Functioning and dynamics of natural and perturbed ecosystems*. Paris: Lavoisier. pp 701-743.
52. Tegner MJ, Dayton PK (1977) Sea urchin recruitment patterns and implications of commercial fishing. *Science* 196(4287): 324-326.
53. Sloan NA, Lauridsen CP, Harbo RM (1987) Recruitment characteristics of the commercially harvested red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* in Southern British Columbia, Canada. *Fish Res* 5(1): 55-69.
54. Nishizaki MT, Ackerman JD (2007) Juvenile–adult associations in sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. droebachiensis*): protection from predation and hydrodynamics in *S. franciscanus*. *Mar Biol* 151: 135-145.
55. Ouréns O, Freire J, Vilar JA, Fernández L (2014) Influence of habitat and population density on recruitment and spatial dynamics of the sea urchin *Paracentrotus lividus* : implications for harvest refugia. *ICES Journal Mar Sci Adv Access* 71(5): 1064-1072.

Experimental larval releasing of *Paracentrotus lividus* juveniles in an exploited French Mediterranean coast.

Couvray S.^{1,2} ; Miard, T.², Martin Y.², Grillasca J.P.¹, Bonnefont J.L.², Coupé S.¹

Journal of Shellfish Research: accepté

¹ Université de Toulon, Laboratoire PROTEE, EA 3819, 83957 La Garde, France

² Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez – Le Brusuc, 83140 Six-Fours-les-Plages, France

Corresponding authors: Sylvain Couvray / Stéphane Coupé

Mail: sylvain.couvray@institut-paul-ricard.org / stephane.coupe@univ-tln.fr

Keywords: *Paracentrotus lividus*; stock enhancement; genetic diversity; larval rearing; parentage analysis; sea urchin; north-western Mediterranean sea, reseeded.

Abstract

During the past forty years, natural stocks of the edible sea urchins *Paracentrotus lividus* fell sharply in many sites of the French Mediterranean coast. Despite current management measures, the resource remains at low density levels, challenging commercial fishermen and managers concerns. Experimental reseeded of depleted populations with juvenile sea urchins were conducted in 2011, to assess the feasibility, and the impact on both the population structure and genetic diversity. Aquaculture techniques have specifically been developed to hatchery-produce 250,000 juveniles for each releasing experiments. Two years after juvenile releases, small urchins were recaptured and genetically tested to assess whether they were produced at the hatchery or naturally recruited. Small urchins from the hatchery were recaptured at 2 out of 5 sites, representing up to 12% of the total recaptured urchins. The demographic structure of the populations did not change significantly. As well, the genetic analysis performed using six microsatellite loci revealed genetically homogeneous populations. Genetic diversities were apparently not impacted by the introduction of the juveniles from the hatchery. Reseeding might thus be considered as a potential tool to restock depleted populations in areas where natural recruitment appears insufficient. Implications of such a management tool are discussed in the context of resource conservation and fisheries sustaining.

Introduction

Among worldwide exploited marine species, sea urchins have experienced important demographic erosion, while there is a growing demand. World production of sea urchins peaked in 1995 with 120 306 t landed. Since this peak, most of the fisheries have declined considerably and are likely to be over-fished (Andrew et al. 2002). In 2011, landing data was only around 66 000 tons (FAO 2014). The available landings data highlights that this phenomenon affects worldwide areas, any exploited species and all the producing countries, with the exception of emerging producers who are just beginning to exploit their resources (FAO 2014). Noteworthy, the landed sea urchins come almost exclusively from the capture in the natural environment, the methods of aquaculture in enclosed environments currently remaining marginal and stammering.

On the French coasts, the two main production areas are the Atlantic coast of Brittany and the Mediterranean coast. On the Atlantic coast of Brittany, the resource of *Paracentrotus lividus* has been exhausted since the early 1970s and despite a total fishing ban on this area, the natural stocks are still unable to naturally recover (Allain 1975; Andrew et al. 2002; FAO 2014). On the Mediterranean coast, the phenomenon follows the same trend as on the Atlantic coast and seems to accelerate (Andrew et al. 2002; FAO 2014). Our field observations also show a sharp decline in numbers in all classes of size (Bachet et al. 2012; Couvray et al. 2014). Though, urchin fisheries are highly regulated by the limitation of fishing periods, banning the use of fishing gears such as dredges, fishing, snorkeling duty (SCUBA allowed for professional fishermen of the Department of Bouches-du-Rhône), a minimum size of captured individuals (test diameter > 5cm) and a limited catch for non-professional fishermen. Besides the professional and recreational harvesting, urchin densities are also influenced by the effect of global changes, of which the anthropic pollution, the habitat transformation and diseases (Boudouresque et al. 1980; Harmelin et al. 1981; Régis et al. 1985; Azzolina 1987; Asnaghi et al. 2013).

The observed fall of populations raises both ecological and economical concerns, and underlines the needs of more efficient managements (Andrew et al. 2002) to reach sustainable resources and improved fisheries. These likely benefits from a more drastic control of catches and a better protection and restoration of natural habitats, but with variable and potentially delayed success. Aquaculture-based fisheries also contribute to the development of sustainable fisheries, as it brings the possibility to restock or enhance exploited natural resources (Blankenship and Leber 1995; Bell et al. 2008; Juinio-Meñez et al. 2008a; Juinio-Meñez et al. 2008b; Lorenzen et al. 2013; Agatsuma 2013). Though, many reported enhancement projects presented, if any, limited or weakly demonstrated success, potentially because environmental factors determining enhancement success were incompletely considered (Blaxter 2000; Bell, 2006; Molony et al. 2005, Agatsuma 2013; Yokota 2002). Specifically on Sea urchin, since 1970's most of enhancement programs were performed in Asia (*i.e.* Japan, Philippines and South-Korea) (Andrew et al. 2002; Agatsuma 2013). Japan's sea urchin fishery enhancement programs are the largest of the world. Some programs appeared successful for instance to help to stabilize the declining stocks for *Strongylocentrotus intermedius* and increase catches for *Strongylocentrotus Nudus* in some localities (Agatsuma 2013). Besides these results, Yokota (2002) reported a loss of genetic diversity of *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin population, induced by the release of individuals produced in aquaculture, from a too low number of spawners, which had deleterious effects on natural populations. In Philippines, for sea urchin *Tripneustes gratilla*, it has been shown that reseedling may be a cost effective and efficient option for the replenishment of spawning stock in the case of heavily depopulated populations, which enables efficient larval production and promotes recruitment. Coupled with other resource management actions (marine protected area, catching regulation) reseedling gave a new dynamism to local productivity of urchin stocks (Juinio-Meñez et al. 2008a; Juinio-Meñez et al. 2008b). Nevertheless, in others cases, economic returns are still not guaranteed even when enhancement program effectively increased population densities (Agatsuma 2013).

In stock enhancement programs, the genetic component is of major importance, as it may have adverse effects on populations. A decrease in the natural genetic variation negatively influence the adaptability to fluctuating environmental conditions, the resistance to diseases, and more globally reduce fitness which often lead to wild populations decline (Frankham 2005; Le Vay et al. 2007; Hara et al. 2008). For these reasons, marine stock enhancement is often controversial. The risk is to

significantly lower the level of within- and among-population genetic diversity, inadvertently by using an inadequate number of progenitors, or promoting inbreeding, and reduce the genetically effective population size (Lorenzen et al. 2010).

Scientifically recognized guidelines, pertinent to genetic considerations, help to design effective and responsible stock enhancement programs (Blankenship and Leber 1995; Lorenzen et al. 2010). Before any enhancement project, the receiving population should be demographically and genetically analyzed and monitored after (Cross, 2000; Ward 2006; Taniguchi 2004; Bell et al., 2005). The knowledge of the receiving populations must help assess the carrying capacity of the environment (Le Vay et al. 2007), the most appropriate release conditions (season, area) and the most efficient size of released individuals (Blaxter 2000). As well, the analysis of the genetic structure of populations, even across small geographical scale (Hutchinson et al., 2001; Bravington and Ward, 2004), is a key point to prevent from detrimental genetic changes that would negatively impact the natural stock persistence and sustainable fisheries (Ryman and Utter, 1987; Carvalho, 1993; Hallerman, 2003; Hutchinson et al., 2003). Indeed, the genetic diversity should be maintained to allow populations to adapt to the natural environmental fluctuations, all the more in the context of global changes (Reisenbichler, 1997). It is recommended that a minimum of 50 spawners should preferentially be taken directly from the wild population to be enhanced and with equal numbers of males and females. This procedure likely minimizes loss of diversity (reduce loss of rare alleles) to avoid bottleneck effects in already small populations (Ward 2006; Le Vay et al. 2007). So, the progeny would likely be representative of their wild conspecifics considering morphology, ecology and behavior, and surviving rate (Stoner, 1994; Stoner and Davis, 1994; Tsukamoto et al., 1999; Kellison et al., 2000; Brown and Day, 2002; Davis et al., 2005; Kitada et al. 2009).

Though, in many case it is difficult to consider the guidelines as a whole because of costs and practical hinders (Le Vay et al. 2007), the results and impacts of enhancement programs should be evaluated and long-time monitored (Blankenship and Leber 1995; Taniguchi, 2004; Bell et al., 2006). In this aim, molecular biology brings the possibility to perform analysis of genetic fluctuations, population assignments or reproductive fitness (Araki and Schmid, 2010). For instance, a set of 5-10 highly polymorphic microsatellite markers is suitable for analyzing the genetic diversity of wild populations and to evaluate the success and impact of restocking programs with a good range of confidence and at an acceptable cost (Dantas et al. 2013; Gardner et al. 2013).

In the Mediterranean basin *P. lividus* is one of the main grazer, thus a key regulator of some phytobenthic communities. As a consequence, fluctuations in both population density and demographic composition of this keystone species likely impact infralittoral ecosystems (Verlaque 1984; Azzolina et al. 1985; Palacin et al. 1998; Bonaviri et al. 2012). Like the majority of shallow-water marine species *P. lividus* is a benthopelagic organism and population are genetically homogenous at local and medium scale (Pedrotti and Fenaux 1992; Swearer et al. 2002; Duran et al. 2004; Calderon et al. 2012).

In the area of Toulon (Var department, France – mediterranean eastern French coast) there are growing concerns about the demographic decline of *P. lividus* population. Although there are evidences of the presence of larval pools that encompass the area, populations densities remains at very low level (Bachet et al. 2012; Couvray et al. 2014). The recruitment and survival of juveniles is low and seems insufficient to maintain sustainable stocks with actual fishing pressure (Couvray et al. 2014). Here, we report the results of a scientifically based, pilot-scale, stock enhancement program.

Materials and methods

Production of P. lividus juveniles

Spawners used for the production of juveniles were wild individuals collected around the island of Embiez (Var – France) (Figure 1), during the legal harvesting period. Gametes of 50 spawner urchins were collected in sterile vials of 50 mL. Sperms were collected dry and oocytes were sieved through a 100 µm mesh filter and collected in filtered seawater (FSW). The fertilization was performed in 1 L of FSW by mixing the oocytes with 1 mL of mixed sperm. Fertilization was assessed one hour after the gametes mixing. Larval rearing was carried out in 80 L cylindroconical tanks. The FSW consisted in natural seawater filtered successively through sand filters (mechanical and biological), cartridge filters mesh 50 µm then 5 µm and the UV filter. The FSW is maintained at $18 \pm 1^\circ\text{C}$ throughout the breeding and the salinity of 38 as regularly checked. The stability of the physico-chemical parameters was ensured by a daily complete renewal of the FSW. The initial density was 3 eggs.mL^{-1} . The larvae are fed twice daily with a mixture of three strains of phytoplankton (*Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* and *Isochrysis galbana*) since they reached the pluteus four arms stage. The daily intake of phytoplankton in early breeding was $1.10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ and adjusted during the breeding as a function of survival and larval growth. Competent larvae were obtained after 17 to 19 days. When 70 % of the larval pool reached the competence stage, larvae were transferred into 100 µm mesh pouches, where they had performed their metamorphosis. A week from the beginning of metamorphosis, the post-larvae reached the juvenile stage, measured 1 mm diameter, and were able to feed with food laid on the substrate.

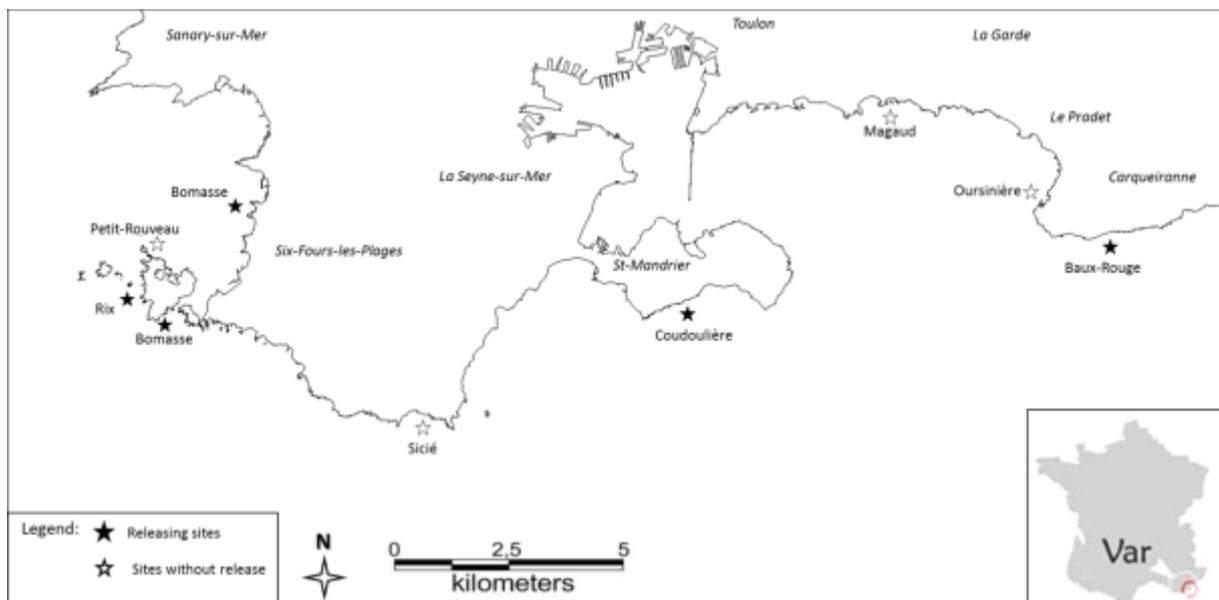


Figure 1: Sites on the Toulon area, considered in the enhancement experiment of *Paracentrotus lividus* populations.

Releasing sites

Five sites were selected along the coast of Toulon (Var departement, France) (Figure 1) considering suitable habitats, and available food and shelters for juveniles, in order to optimize the survival odds. The fluctuations of population densities were also assessed for each of these sites.

Rayolet

The Rayolet site is very heterogeneous, characterized by *Posidonia oceanica* seabed on rocks, rock slabs covered with photophilous algae, some areas of gravel and sand specks. In creeks, between 0.5 m and 2 m deep, substratum is mainly composed of small-sized boulders covered with algae photophilous. Their sizes and shapes are suitable to serve as hiding places for small urchins. Rocky area and *Posidonia oceanica* seagrass is quite narrow between the shore and a sandy bottom at from 4 m depth. This site is mainly exposed to the Mistral.

Rix

Rix is a very heterogeneous site, mainly characterized by a facies rocks photophilous algae (boulders, pebbles, presence of droopy, slabs and scree), but also small areas of gravel and sparse meadows. From 6 m deep, rocky areas are replaced by a dense *Posidonia oceanica* seagrass with a few patches of sand. The site is mainly exposed to the Mistral.

Bomasse

Bomasse is mainly characterized by falling blocks and rocky, some areas of gravel and sparse *Posidonia oceanica* seagrass meadows. It is mostly a facies rocks photophilous algae gradually replaced (between 4 and 6 m deep) by a *Posidonia oceanica* meadow dense with some sandy spots and some boulders. The site is exposed to phenomena largades (south swell) occasionally causing reversals boulders at the bottom of shallow bay.

Coudoulière

This area consists mainly of rocky scree photophilous algae. The slope is steep. On the first two meters deep algal development is low, due to strong hydrodynamic exposure. Then, blocks, slabs and pebbles were covered with photophilous algae and *Posidonia oceanica*.

Baux Rouges

This site is very similar to Coudoulière with a high exposure to waves which frequently returns pebbles on the two first meters depth.

Each site appears a natural nursery, as smaller individuals than 1 cm in diameter are found hidden under stones. Hinder, physical characteristics and algal covering confer suitability to the recruitment of juvenile sea urchins.

Releasing modality

For each site, 250 000 sea urchins were released at the juvenile life-stage, when they were about 1 mm in diameter. A first releasing operation was performed at Coudoulière in 2010. The four other sites were supplied in 2011. Juveniles were transported from the hatchery to the release sites in the pouches in which they previously metamorphosed. The pouches were contained in pails of 80 L of seawater aerated with bubblers are transported by boat on releasing sites. On site, transport is then provided by a scuba diver to the selected place as the most suitable for juveniles implantation due to the available caches and access to food. Juveniles are then spilled out the pouch, close to the bottom in the crevices of rocks to limit fishes predation.

Genotyping

Fifty adult urchins of 8 sites among which the 5 experimental sites were sampled for genotyping, before the larval release. A year after the releasing of juveniles, at least 100 small urchins (test

diameter smaller than 1 cm) were collected on the experimental sites. Individualized hatchery-produced larvae were also sampled.

Genomic DNA of adult and juvenile urchins was purified from spines as previously described (Coupé et al., 2011). DNA were also purified from individualized larvae using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), following manufacturer's instructions. Concentrations and purities were assessed by a spectrophotometer analysis at 260 and 280 nm (Nanodrop 1000, Amersham). All individuals were genotyped using six microsatellite loci (Calderon et al., 2009a). Three multiplexed-PCR amplifications were performed in a final volume of 15 µL containing 1 µL of DNA template, 1.5 µL of 10X PCR buffer (5PRIME, Dutscher, France), 0.1 µL of each primer (Eurogentec), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (Amersham, Orsay, France), and 0,6 U of Taq DNA polymerase (5PRIME, Dutscher, France). Forward primers were fluorescently labelled. Primer combinations were as follow (fluorescent label): PI_L (ATTO-565) and PI_28 (Draggonfly Orange), PI_Hist (6-FAM) and PI_T (VIC), PI_B (PET), PI_C (Ned). PCR were carried out with an initial denaturation for 3 mn at 94 °C, followed by 35 cycles of denaturation for 50 s at 94 °C, hybridation for 50 s at either 53 °C (PI_L + PI_28 and PI_B + PI_C) or 58 °C (PI_Hist + PI_T), elongation for 50 s at 72 °C, and final elongation step for 5 mn at 72 °C. Fragments were sized by capillary electrophoresis on a 3730XL genetic analyser (Applied Biosystems), using the Genscan 600LIZ (Applied Biosystems) as an internal size standard. Peaks were assigned with STRand 2.2.30©.

Statistical analyses

The Microsatellite Tools (Excel software) and CERVUS 3.0 software was used to organize the microsatellite data. Alleles per locus (Na), their frequencies, both observed and expected heterozygosities (HO and HE respectively), Hardy-Weinberg equilibrium and the genetic differentiation (FST) were calculated using Arlequin 3.5© (Excoffier et al. 2005). Allelic richness and deficit of heterozygotes within populations (FIS) was calculated using FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001).

Frequencies of Null alleles were estimated with CERVUS 3.0 software. The CERVUS 3.0 software was also used to test whether sampled urchins were produced by broodstock from the hatchery or recruited naturally (Kalinowski et al. 2007). Parental assignment tests were set up to reach confidence thresholds of 80 % and 95 % (p=0.05).

Results

Assessment of releasing success

The genetic analysis evidenced the presence of small urchins originating from the broodstock of the hatchery in Rayolet and Bomasse. In Rayolet, 3 urchins were assigned to the hatchery with 95 % confidence, which represent 2 % of the recaptured urchins. In Bomasse, 13 urchins were assigned to the hatchery, with a relaxed confidence of 80 %, and represent 12 % of the recaptured urchins (Table 1).

Tableau 1: Parental assignment of individuals sampled one year after releases.

Site	Level	Confidence (%)	Critical LOD	Assignements Observed	Assignment rate observed
Rayolet	Strict	95	4.67	3	2%
	Relaxed	80	1.5	4	3%
	Unsigned			152	97%
	Total			156	100%
Site	Level	Confidence (%)	Critical LOD	Assignements Observed	Assignment rate observed
Bomasse	Strict	95	4.67	0	0%
	Relaxed	80	1.5	13	12%
	Unsigned			94	88%
	Total			107	100%

For sites Rix, Coudoulière and Baux Rouges, no recaptured individual has been assigned as originating from the broodstock of the hatchery.

Impact on the genetic diversity

The number of alleles detected is of the same order of magnitude for each of the 6 loci, comprised between 31 alleles for PI_Hist to 43 alleles for PI_T. Allelic richness calculated for a minimum sample size of 11 individuals is very similar between stations and between years whatever the locus, with the exception of two values: allelic richness for Rix in 2011 and Trou de l'Or in 2012 were respectively 8.602 and 6.913 for Pliv_B (Table 2).

Table 2: Number of alleles, allelic richness and Fis calculated with FSTAT ; H_o and H_e calculated with MSTool for samples of 2012 with and without individuals from the hatchery for the five sites where the released occurred.

Tableau 2: Number of alleles, allelic richness and Fis calculated with FSTAT ; HO and HE calculated with MSTool for samples of 2012 with and without individuals from the hatchery for the five sites where the released occurred.

Locus	Parameter	Bom 2011 (N = 19)	Cou 2011 (N = 49)	Mag 2011 (N = 48)	Our 2011 (N = 23)	Rix 2011 (N = 24)	SaM 2011 (N = 21)	Tro 2011 (N = 37)	All 2011 (N = 221)	BaR 2012 (N = 35)	Bom 2012 (N = 94)	Cou 2012 (N = 113)	Rix 2012 (N = 80)	SaM 2012 (N = 74)	Tro 2012 (N = 14)	All 2012 (N = 410)	All 2011 and 2012 (N = 631)
28	No. Of alleles	19	26	23	18	21	20	20	29	24	32	17	26	31	14	36	37
	Allelic richness	16.218	14.605	14.156	13.25	14.214	14.416	12.952	28.837	14.599	14.582	13.924	13.741	14.793	12.997	33.337	33.06
	HO	0.714	0.833	0.805	0.870	0.875	0.450	0.784	0.781	0.706	0.652	0.714	0.701	0.743	0.615	0.697	0.727
	HE	0.971	0.957	0.954	0.946	0.955	0.956	0.944	0.954	0.958	0.955	0.951	0.950	0.958	0.951	0.955	0.955
	F(Null)	0.135	0.064	0.078	0.032	0.033	0.352	0.085	0.099	0.144	0.186	0.139	0.148	0.123	0.199	0.156	0.135
	FIS	0.272**	0.130**	0.158**	0.082	0.085	0.536**	0.172**	0.182**	0.266**	0.318**	0.251**	0.263**	0.225**	0.362**	0.27**	0.238**
	HW (p-value)	0.000	0.082	0.002	0.084	0.147	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	No. Of alleles	12	26	17	16	11	19	18	32	19.000	16	23	26	21	7	37	42
	Allelic richness	10.253	14.777	10.741	12.530	8.602	13.957	12.540	31.637	12.043	10.411	11.542	12.011	11.953	6.913	30.493	35.232
	HO	0.500	0.605	0.511	0.400	0.364	0.500	0.471	0.495	0.457	0.581	0.626	0.588	0.557	0.333	0.569	0.542
	HE	0.921	0.958	0.908	0.931	0.855	0.935	0.949	0.935	0.930	0.910	0.923	0.923	0.923	0.923	0.923	0.944
	F(Null)	0.242	0.219	0.280	0.391	0.396	0.301	0.326	0.316	0.336	0.215	0.189	0.221	0.248	0.425	0.237	0.271
	FIS	0.466**	0.371**	0.440**	0.577**	0.581**	0.479**	0.500**	0.482**	0.512**	0.364**	0.321**	0.365**	0.401**	0.624**	0.383**	0.426**
	HW (p-value)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	No. Of alleles	13	17	21	15	16	15	20	29	15.000	20	30	28	27	13	37	37
	Allelic richness	11.111	10.920	12.512	11.69	11.805	11.268	11.982	27.838	10.214	10.729	10.969	12.034	12.285	11.413	32.793	31.234
	HO	0.941	0.978	0.979	0.957	1.000	0.905	0.892	0.953	0.800	0.872	0.788	0.797	0.932	0.786	0.831	0.877
	HE	0.923	0.904	0.933	0.928	0.929	0.918	0.896	0.923	0.901	0.904	0.909	0.922	0.927	0.915	0.914	0.924
	F(Null)	0.025	0.047	-0.030	-0.028	-0.049	-0.006	-0.004	-0.018	0.053	0.009	0.071	0.070	-0.007	0.056	0.047	0.026
	FIS	-0.020	-0.083*	-0.050	-0.032	-0.078	0.014	0.005	0.000	0.113	0.035	0.134**	0.136**	-0.006	0.146	0.09**	0.051**
	HW (p-value)	0.254	0.939	0.092	0.574	0.656	0.157	0.596	0.057	0.475	0.482	0.009	0.017	0.649	0.148	0.005	0.006
Hist	No. Of alleles	14	25	25	24	19	19	24	30	24.000	30	30	27	29	15	33	35
	Allelic richness	13.100	14.135	13.662	15.339	13.150	14.127	14.473	29.685	13.419	13.694	12.584	13.649	14.217	12.984	30.604	30.716
	HO	0.846	0.909	0.867	0.957	1.000	0.905	0.811	0.894	1.000	0.904	0.883	0.911	0.972	0.929	0.921	0.912
	HE	0.951	0.947	0.947	0.960	0.933	0.956	0.955	0.950	0.940	0.946	0.930	0.922	0.951	0.939	0.943	0.945
	F(Null)	0.042	0.014	0.040	-0.010	-0.049	0.014	0.075	0.029	0.040	0.021	0.025	0.017	-0.015	-0.013	0.011	0.018
	FIS	0.114	0.040	0.086*	0.004	-0.074	0.055	0.153**	0.060**	-0.065	0.045	0.051*	0.038	-0.022	0.012	0.023	0.036**
	HW (p-value)	0.256	0.668	0.251	0.861	0.501	0.245	0.009	0.243	1.000	0.509	0.074	0.143	0.503	0.453	0.041	0.020
L	No. Of alleles	14	20	18	16	13	11	20	30	15.000	24	24	25	29	12	38	42
	Allelic richness	13.478	13.031	12.052	11.981	10.056	10.216	12.675	30.000	10.557	13.311	13.462	13.165	13.619	12.000	33.887	33.419
	HO	0.333	0.306	0.316	0.429	0.364	0.299	0.242	0.299	0.323	0.349	0.344	0.377	0.290	0.273	0.336	0.323
	HE	0.957	0.943	0.932	0.926	0.906	0.885	0.934	0.945	0.908	0.946	0.947	0.922	0.943	0.931	0.945	0.946
	F(Null)	0.469	0.505	0.487	0.363	0.423	0.855	0.583	0.518	0.469	0.459	0.463	0.425	0.529	0.533	0.475	0.490
	FIS	0.662**	0.679**	0.664**	0.543**	0.604**	0.927**	0.743**	0.684**	0.649**	0.632**	0.639**	0.601**	0.694**	0.717**	0.645**	0.658**
	HW (p-value)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T	No. Of alleles	11	21	26	20	17	14	22	34	20	26	31	27	26	13	42	49
	Allelic richness	10.083	12.764	13.296	13.912	12.437	10.647	12.455	32.863	12.512	12.629	12.440	13.375	12.208	11.554	33.159	33.389
	HO	0.786	0.909	0.909	0.870	0.913	0.850	0.919	0.893	0.914	0.860	0.813	0.873	0.761	0.786	0.834	0.854
	HE	0.915	0.939	0.933	0.953	0.936	0.908	0.926	0.935	0.934	0.934	0.933	0.922	0.928	0.918	0.936	0.937
	F(Null)	0.059	0.011	0.009	0.036	0.003	0.018	-0.003	0.022	0.001	0.038	0.066	0.037	0.095	0.060	0.057	0.046
	FIS	0.146	0.033	0.026	0.089	0.025	0.065	0.008	0.046*	0.021	0.079*	0.130**	0.076**	0.182*	0.149	0.109**	0.088**
	HW (p-value)	0.433	0.841	0.605	0.148	0.899	0.719	0.970	0.737	0.145	0.008	0.018	0.148	0.046	0.332	0.000	0.000
All	No. Of alleles	13.833±2.787	22.500±3.728	21.667±3.670	18.167±3.371	16.167±3.710	16.333±3.559	20.667±2.066	30.667±1.966	19.500±4.037	24.667±6.022	27.500±3.391	26.500±1.049	27.167±3.448	12.333±2.805	37.167±2.927	40.333±5.125
	HO	0.687±0.228	0.757±0.256	0.731±0.260	0.747±0.261	0.753±0.305	0.613±0.336	0.686±0.270	0.719±0.263	0.700±0.264	0.703±0.217	0.695±0.193	0.922±0.922	0.709±0.254	0.620±0.266	0.698±0.216	0.706±0.231
	HE	0.941±0.022	0.941±0.019	0.934±0.016	0.940±0.015	0.919±0.035	0.928±0.030	0.932±0.020	0.944±0.012	0.928±0.021	0.933±0.021	0.932±0.016	0.922±0.922	0.939±0.014	0.919±0.031	0.936±0.015	0.942±0.010
	FIS	0.277**	0.198**	0.220**	0.210**	0.185**	0.347**	0.266**	0.238**	0.249**	0.247**	0.256**	0.246**	0.246**	0.335**	0.254**	0.251**
	FIS	0.277**	0.198**	0.220**	0.210**	0.185**	0.347**	0.266**	0.238**	0.249**	0.247**	0.256**	0.246**	0.246**	0.335**	0.254**	0.251**

FIS: inbreeding coefficient (FSTAT). *: P < 0.05; **: P < 0.01; ****: P < 0.001.

HO; HE; H-WE (p-value): Arlequin

Allelic Richness (FSTAT) per locus and population is based on min. sample size of: 11 diploid individuals for each population of 2011 and 2012.

177 diploid individuals for All populations combined in 2011, 2012, and combined 2011 and 2012.

Considering all microsatellite loci, we evidenced that all populations exhibit a global heterozygosity deficit of similar level ($0.185^* < F_{IS} < 0.347^{**}$). This deficit of heterozygosity is likely attributable to Pliv_B and Pliv_L loci, for which the observed and expected heterozygosities were highly different and deviate to Hardy-Weinberg equilibrium. Pliv_28 contributing to this results in a lesser extent (Table 3).

Tableau 3: Fst values for sample of 2012, for the sites where the released occurred. Nat: sample with wild individuals only; Tot: sample with wild individuals and assigned from the hatchery.

	BaR 2012	Bom 2011	Bom 2012	Ray 2011	Ray 2012	Mag 2011	Our 2011	Rix 2011	Rix 2012	Cou2011	Cou 2012	Tro 2011	Tro 2012
BaR 2012	-												
Bom 2011	0.009	-											
Bom 2012	0.009*	0.006	-										
Ray 2011	0.011***	0.003	0.011*	-									
Ray 2012	0.006	0.005	0.003	0.013***	-								
Mag 2011	0.017***	0.011*	0.021***	0.009*	0.019***	-							
Our 2011	0.013	0.013*	0.009	0.008	0.015***	0.013**	-						
Rix 2011	0.013*	0.010	0.009	0.013**	0.010	0.022***	0.012*	-					
Rix 2012	0.008*	0.004	0.002	0.008***	0.003	0.017***	0.012***	0.009*	-				
Cou2011	0.019*	0.015	0.018**	0.012	0.015*	0.016***	0.015	0.016	0.011	-			
Cou 2012	0.009*	0.009**	0.003	0.013***	0.004	0.019***	0.010*	0.008	0.002	0.014*	-		
Tro 2011	0.006	0.008	0.004	0.008	0.008	0.015***	0.014**	0.012*	0.006*	0.011	0.008**	-	
Tro 2012	0.015	0.012	0.013	0.024**	0.012	0.036***	0.023	0.019	0.010	0.03*	0.013	0.023*	-

Deficit in heterozygosity is particularly high for loci and samples that show a high frequency of estimated null alleles. For loci PI_C, PI_Hist and PI_T, observed heterozygosity were in Hardy-Weinber equilibrium except for Rayolet and Rix in 2011 for PI_C; Trou de l'Or in 2011 for PI_Hist and Bomasse, Rayelet and Saint-Mandrier in 2012 for PI_T.

The low values of Fst (< 0.05) indicates an absence of genetic differentiation between the studied populations, reflecting that among-population variations accounts for the global genetic variability. Comparison for each site between the two years studied does not reveal any variation of genetic structure over time. Moreover, for the sites where urchins from the hatchery have been recaptured, these parameters were not significantly modified after the larval release (Table 3), even for Bomasse where 12 % of the small urchins originated from the hatchery.

Discussion

Here, we demonstrated that the release of *P. lividus* juveniles performed on the Mediterranean coast, is possible for reseeding purposes, with some potential success, and with no apparent consequences on the genetic diversity at the population level. This study was performed following most of the previously published guidelines (Lorenzen et al., 2010) to prevent from potential modifications of the initial genetic diversity, and any possible perturbations of the ecosystem associated with *P. lividus* populations. For the later point, the number of released 1 mm-juveniles (i.e 250 000) was thought relevant to assess their survival, with a limited risk of inducing an over-population in case of exceptional survival rate.

No genetic differentiations have been evidenced between populations before the releasing events, which is consistent with the small geographic scale of this study. Moreover, there were no genetic differences at each releasing site between the years encompassing the larval release, and no differences between populations after the release. This strongly suggests that release experiments had no impact on the genetic structure, both spatially and temporarily.

Urchins were genotyped thanks to previously described microsatellite loci (Calderon et al., 2009a). In order to save costs, loci were amplified in multiplexed-PCR. For some samples, true peaks were hardly defined, because we had more than two peaks of similar intensity, or two true peaks of quite

different intensities. This may be explained by inadequate multiplexed-PCR conditions for these samples, which represented a limited number of the total samples. The values of population genetics parameters (among and between the five populations of the study) obtained with the multiplexed-PCR conditions, were in agreement with previously reported similar studies (Calderon et al., 2009a, b). This last result is consistent with both the dispersive larval stage and the spatial proximity of the populations of this study. Three microsatellite loci were slightly informative because they presented high proportion of homozygous, likely reflecting null alleles, and a Hardy-Weinberg disequilibrium. Actually, we believe that that Hardy-Weinberg deviation is weak or non-significant, since the other 3 loci correctly amplified and didn't present any Hardy-Weinberg disequilibrium (Pemberton et al. 1995). Though the analysis has been performed with a limited number of microsatellite loci, we could benefit from their high level of polymorphism as well as the high number of sampled individuals.

For *P. lividus*, we believe that new, supplementary, microsatellites worth to be develop. These should be easier to specifically amplify, and with a limited number of null alleles. As well, the recent high resolution melting PCR should be assessed for genotyping. Such development will likely significantly save costs and time of genetic analysis, and would enable more complete and detailed analysis, such as control of larval pools or broodstock selection. Considering the limited zone of larval releasing, the recaptured urchins in Rayolet and Bomasse represent a significant percentage of the total recruits. Though the survival rate of the released juveniles was not assessed, our results highlight that the larval release may be particularly efficient, and may have potential consequences on the genetic diversity and population densities (*i.e.* over-population), if the number of released juveniles is not appropriate to the receiving site. The sampling has been performed a year after the release, thus we can expect that the urchins will likely grow until they are adults and contribute to the production of new generations. In future studies, the survival rate of release individuals should be performed.

In Rayolet and Bomasse, a hundred of small urchins have been recaptured over the zone the juveniles have been released, and urchins were easy to harvest. It is possible that a fraction of the juvenile pool has been dispersed at some remote and peripheral zones that were not considered during recapture. Although we didn't recapture urchins coming from the hatchery at Rix, Saint-Mandrier and Coudoulière sites, this doesn't mean that some have not survived. The particular topography of those sites likely explains our results. Small urchins were particularly difficult to find over the releasing zone, thus peripheral zones were explored. There, the small urchins harvested more likely recruited naturally. Future recapture campaign considering bigger urchins would refine the results presented here, even on the sites where releasing appeared unsuccessful.

Finally, the impact of the releasing thus appeared limited, without apparent modifications of *P. lividus* population structure, nor genetic changes, likely because the experiment has been performed at a pilot scale. A massive release of millions juveniles over a large area would have unpredictable consequences. The sea urchin *P. lividus* is key species in the regulation of benthic macrophyte communities and associated ecosystem. High abundance of *P. lividus* impact the structure and ecosystem productivity (Fanelli et al. 1999), and as a consequence other exploited biological resources, as reported in Greece by fishermen that have complained of an over-population of sea urchins (Le Direac'h et al. 1987). Current management tools, such as fishing cantonments or catches regulation, should be considered as first intention (Rogers et al. 2010), potentially supplemented by enhancement programs. For instance, the level of recruitment and the survival rate during the first year positively depends on the adults density. Fishing cantonments and catches limitation would thus naturally sustain a productive population without enhancement program. Future pilot-scale releasing

experiments should be performed to better assess the relative contribution of enhancement programs to the current management tools. It will also be necessary to compare the release efficiencies of juveniles versus older urchins (i.e. 1 year-old), regarding final profitability, in the context of both conservation and fisheries sustainability, in the area of Toulon.

Acknowledgments

This study was financially supported by the community of agglomeration Toulon Provence Méditerranée (TPM).

References

Allain, J.Y. 1975. Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea) soumises à la pêche sur les côtes nord de Bretagne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 39 (2): 171-212.

Andrew, N.L., Agatsuma, Y., Ballesteros, E., Bazhin, A.H., Creaser, E.P., Barnes, D.K.A., Botsford, L.W., *et al.* 2002. Statut and management of world sea urchin fisheries. *Oceanography and Marine Biology*, 40: 343-425.

Araki H., and Schmid, C. 2010. Is hatchery stocking a help or harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture*, 308: S2-S11.

Asnaghi, V., Chiantore, M., Mangialajo, L., Gazeau, F., Francour, P., Alliouane, S., and Gattuso, J.P. e61978.

Azzolina, J.F., 2013. Cascading effects of ocean acidification in a rocky subtidal community. *PLoS ONE*, 8 (4): Boudouresque, C.F., and Nedelec. H. 1985. Dynamique des populations de *Paracentrotus lividus* dans la baie de Port-Cros (Var): données préliminaires. *Scientific reports of Port-Cros national park*, 11: 61-81.

Azzolina, J.F. 1987. Evolution à long terme des populations de l'oursin Comestible *Paracentrotus lividus* dans la baie de Port-Cros (Var, France). *In* Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, C.F. BOUDOURESQUE edit. Marseille, France. GIS Posidonie publication: 257-269.

Agatsuma, Y. 2013. Stock Enhancement. *In*: Development in aquaculture and fisheries science. Third edn, pp. 213-224. Ed. by John M. Lawrence. 550 pp.

Bachet, F., Monin, M., Bretton, O., Cadville, B., and Agriél, M. 2012. Suivi de l'évolution des populations d'oursins comestibles (*Paracentrotus lividus*) sur la côte Bleue - Résultats des comptages en octobre 2012. Rapport Parc Marin de la Côte Bleue et Comité Régional des pêches Maritimes PACA. 18 pp.

Bell, J.D., Rothlisberg, P.C., Munro, J.L., Loneragan, N.R., Nash, W.J., Ward, R.D., and Andrew, N.L. 2006. Restocking and stock enhancement of marine invertebrate fisheries. *Advances in Marine Biology*, Vol. 49. Ed. by Southward A.J., Young C.M. and Fuiman. Elsevier, L.A. 392 pp.

Bell, J.D., Leber, K.M., Blankenship, H.L., Loneragan, N.R., and Masuda, R. 2008. A New Era for Restocking, Stock Enhancement and Sea Ranching of Coastal Fisheries Resources. *Reviews in Fisheries Science*, 16 (1-3): 1-9.

Blankenship, H.L., and Leber, K.M., 1995. A responsible approach to marine stock enhancement. *American Fisheries Society Symposium*, 15: 167-175.

Blaxter, J.H.S. 2000. The enhancement of marine fish stocks. *Advances in Marine Biology*, 38: 1-54.

Bonaviri, C., Gianguzza, P., Pipitone, C., and Hereu, B. 2012. Micropredation on sea urchins as a potential stabilizing process for rocky reefs. *Journal of Sea Research*, 73: 18-23.

Boudouresque, C.F., Nedelec, H., and Shepherd, S. A. 1980. The decline of a population of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the bay of Port-Cros (Var, France). *Scientific reports of Port-Cros national park, Fr.*, 6: 243-251.

Bravington, M.V., and Ward, R.D., 2004. Microsatellite DNA markers: evaluating their potential for estimating the proportion of hatchery-reared offspring in a stock enhancement programme. *Molecular Ecology*, 13 : 1287–1297.

Brown, C., and Day, R.L. 2002. The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology. *Fish and Fisheries*, 3: 79-94.

Calderon, I., Turon, X., and Pascual, M. 2009a. Isolation of nine nuclear microsatellites in the common Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck). *Molecular Ecology Resources*, 9 (4): 1145-1147.

Calderon, I., Palacin, C., and Turon, X. 2009b. Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Molecular Ecology*, 18: 3036-3049.

Calderon, I., Pita, L., Brusciotti, S., Palacin, C., and Turon, X. 2012. Time and space: genetic structure of the cohorts of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in Western Mediterranean. *Marine Biology*, 159: 189-197.

Carvalho, G.R. 1993. Evolutionary aspects of fish distributions: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*, 43 (Suppl. A), 53–73.

Coupé, S., Couvray, S., Tarnowska, K., Simide, R., Hachfi, L., Pierre, S., Gaillard, *et al.* 2011. *In situ* spine sampling and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) PCRs proved relevant methods for molecular studies on the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 409: 310-314.

Couvray, S., Coupé S., Miard T., Simide R., Martin Y., Grillasca J.P., Bonnefont J.L. 2014. Monitoring of population density of exploited edible sea urchin (*Paracentrotus lividus*) in the coastal area of Toulon agglomeration (Mediterranean French coast). *Fisheries Science*, (in press).

Dantas, H.L., dos Santos Neti, M.A., de Oliveira, K.K.C., Severi, W., Diniz, F.M., and Coimbra, M.R.M. 2013. Genetic Diversity of Captive and Wild Threatened Catfish *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco River. *Reviews in Fisheries Science*, 21 (3-4): 237-346.

Davis, J.L.D., Eckert-Mills, M.G., Young-Williams, A.C., Hines, A.H., and Zohar, Y. 2005. Morphological conditioning of a hatchery-raised invertebrate, *Callinectes sapidus*, to improve field survivorship after release. *Aquaculture* 243, 147–158.

Duran, S., Palacin, C., Becerro, M.A., Turon, X., and Giribert, G. 2004. Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology*, 13: 3317-3328.

Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.

FAO, Fisheries and Aquaculture Department - Capture Fisheries Statistics. 2014, <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/fr>

Fanelli, G., Piraino, S., Esposito, L., and Boero, F. 1999. Opposite roles of urchins and starfishes in marine benthic communities. In, *Echinoderm Research 1998*, pp. 453-457. Ed. Candia Carnevali & Bonasoro. Taylor & Francis, Balkema, Rotterdam: 580 pp.

Frankham, R. 2005. Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 750-755.

Gardner, M.J., Cottingham, A., Hesp, S.A., Chaplin, J.A., Jenkins, G.I., Phillips, N.M., and Potter, I.C. 2013. Biological and Genetic Characteristics of Restocked and Wild *Acanthopagrus butcheri* (Sparidae) in a Southwestern Australian Estuary. *Reviews in Fisheries Science*, 21 (3-4): 441-453.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

Hara, M., Onoue, S., and Taniguchi, N., 2008. Assessing the Impact of Releasing Exogenous Hatchery-Reared Juveniles of Pacific Abalone, *Haliotis discus*. *Reviews in Fisheries Science*, 16 (1-3): 278-284.

Harmelin, J.G., Bouchon, C., Hong, J.S., 1981. Impact de la pollution sur la distribution des échinodermes des substrats durs en Provence (Méditerranée Nord-Occidentale). *Téthys*, 10 (1): 13-36.

Hutchinson, W., Carvalho, G.R., and Rogers, S.I. 2001. Marked genetic structuring in localised populations of cod (*Gadus morhua*) within the North Sea and adjoining waters, as revealed by microsatellites. *Marine Ecology Progress Series*, 223 : 251-260.

Juinio-Meñez, M.A., Pastor, D., and Bangi, H.G., 2008a. Enhancing the recovery of depleted *Tripneustes gratilla* stocks through grow-out culture and restocking. *Reviews in Fisheries Science*, 16 (1-3): 35-43.

Juinio-Meñez, M.A., Pastor, D., and Bangi, H.G., 2008b. Indications of Recruitment Enhancement in the Sea Urchin *Tripneustes gratilla* Due to Stock Restoration Efforts. *In Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium*. Ft. Lauderdale, Florida, pp. 1024-1028.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L., and Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16 (5): 1099-1106.

Kitada, S., Shishidou, H., Sugaya, T., Kitakado, T., and Kishino, H. 2009. Genetic effects of long-term stock enhancement programs. *Aquaculture*, 290: 69-79.

Le Direac'h, J.P., Boudouresque, C.F., Antolic, B., Kokatas, A., Panayotidis, P., Pancucci, A., Semroud, R., et al. 1987. Rapport sur l'exploitation des oursins en Méditerranée. *In Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*, pp. 329-334. Ed. by C.F. Boudouresque. GIS Posidonie publ., Marseille, Fr. 433 pp.

Le Vay, L., Carvalho, G.R., Quintio, E.T., Lebata, J.H., Ut, V.N., and Fushimi, H. 2007. Quality of hatchery-reared juveniles for marine fisheries stock enhancement. *Aquaculture*, 268: 169-180.

Lorenzen, K., Kennen, M. L., and Blankenship, H.L. 2010. Responsible Approach to Marine Stock Enhancement: An Update. *Reviews in Fisheries Science*, 18 (2): 189-210.

Lorenzen, K., Agnalt, A.L., Blankenship, H.L., Hines, A.H., Leber, K.M., Loneragan, N.R., and Taylor, M.T. 2013. Evolving context and maturing science: Aquaculture-based enhancement and restoration enter the marine fisheries management toolbox. *Reviews in Fisheries Science*, 21 (3-4): 213-221.

Molony, B.W., Lenanton, R., Jackson, G., and Norriss, J. 2005. Stock enhancement as a fisheries management tool. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13 (4): 409-432.

Palacin, C., Giribert, G., Carner, S., Dantart, L., and Turon, X. 1998. Low densities of sea urchins influence the structure of algal assemblages in the western Mediterranean. *Journal of Sea Research*, 39: 281-290.

Pedrotti M.L., and Fenaux, L. 1992. Dispersal of echinoderm larvae in a geographical area marked by upwelling (Ligurian Sea, NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, 86: 217-227.

Pemberton, J.M., Slate, J., Bancroft, D.R., Barrett, J.A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4 (2): 249-252.

Régis, M.B., Pérès, J.M., and Gras, G. 1985. Données préliminaires sur l'exploitation de la ressource: *Paracentrotus lividus* (Lmck) dans le Quartier Maritime de Marseille. *Vie Marine*, 7: 41-60.

Rogers, M.W., Allen, M.S, Brown, P., Hunt, T., Fulton, W., Ingram, B.A. 2010. A simulation model to explore the relative value of stock enhancement versus harvest regulations for fishery sustainability. *Ecological Modelling*, 221: 919-926.

Stoner, A.W. 1994. Significance of habitat and stock pre-testing for enhancement of natural fisheries: experimental analyses with Queen conch *Strombus gigas*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25 : 155–165.

Swearer, S.E., Shima, J.S., Hellberg, M.E., Thorrold, S.R., Jones, G.P., Robertson, D.R., Morgan, S.G., *et al.* 2002. Evidence of self-recruitment in demersal marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70 (1): 251-271.

Verlaque, M. 1984. Biologie des juvéniles de l'oursin herbivore *Paracentrotus lividus* (Lamarck): sélectivité du broutage et impact de l'espèce sur les communautés algales de substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France). *Botanica Marina*, 27: 401-424.

Ward, R.D. 2006. The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research*, 80: 9-18.

Yokota, Y. 2002. Fishery and consumption of the sea urchin in Japan. *In* The sea urchin: from basic biology to aquaculture, pp. 129-138. Ed. by Yukio Yokota, Matranga, and Zuzana Smolenicka, Swets & Zeitlinger. Lisse, The Netherlands. 231 pp.

Pollution, pêche et modifications d'habitats : quelles conséquences sur les ressources marines littorales ?

Pollution, fishing and habitat changes:
what impact on coastal marine resources?

Sylvain Couvray *, Yvan Martin, Caroline Lecalard,
Elodie Rouanet, Jean-Luc Bonnefont

Institut océanographique Paul Ricard. 83140 Six-Fours-les-plages. France.

* Corresponding author: sylvain.couvray@institut-paul-ricard.org

Résumé

Couvray S., Y. Martin, C. Lecalard, E. Rouanet,
J.L. Bonnefont – Pollution, pêche et modifications d'habitats :
quelles conséquences sur les ressources marines littorales ?
Mar. Life, 17 : 47-54.

En vue d'évaluer la contribution respective de la pollution chimique et de la pêche dans l'abondance, la structure et la diversité des peuplements de l'ichtyofaune considérée comme une ressource halieutique locale d'importance, nous avons réalisé des inventaires sur des petits fonds en différentes stations plus ou moins impactées par ces facteurs dans la rade de Toulon (Var, Méditerranée française) et dans des zones proches (Les Embiez, zone du Cap Sicié).

Les résultats mettent plutôt en exergue l'importance de la qualité des biotopes sur la diversité des populations et surtout celle de la pêche sur l'abondance et la taille des espèces recensées, minimisant les effets éventuels de la pollution par rapport à ces deux facteurs dans les stations étudiées.

MOTS CLÉS :

ichtyofaune ; pollution ; pêche ; anthropisation littorale.

Abstract

Couvray S., Y. Martin, C. Lecalard, E. Rouanet,
J.L. Bonnefont – [Pollution, fishing and habitat changes: what
impact on coastal marine resources?] *Mar. Life*, 17 : 47-54.

In order to evaluate the respective contribution of chemical pollution and fishing on the abundance, structure and diversity of the littoral ichthyofauna, we carried out inventories on fish assemblages in various coastal sites impacted to varying degrees by these factors, in the vicinity of Toulon and Embiez Island (Var, French Mediterranean).

The results highlight the importance of the quality of biotopes for the diversity of fish assemblages and evidence the role of fishing activities in determining the abundance and size of listed fish species, minimizing the possible effects of pollution compared to the impact of these two factors in the studied sites.

KEY WORDS:

ichthyofauna; pollution; fishing; littoral anthropisation.

Effect of a Glyphosate-Based Herbicide on Gene Expressions of the Cytokines Interleukin-1 β and Interleukin-10 and of Heme Oxygenase-1 in European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L.

Simone Richard · Nathalie Prévot-D'Alvise ·
Robert Bunet · Rémy Simide · Sylvain Couvray ·
Stéphane Coupé · Joël Paul Grillasca

Received: 27 June 2013 / Accepted: 11 December 2013 / Published online: 10 January 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Glyphosate-based herbicides are the most frequently used herbicides in the world. We evaluated the effect of Roundup 360 SL on the expression of interleukin-1 β (*il-1 β*), interleukin-10 (*il-10*) and heme-oxygenase-1 (*ho-1*) in the gills, intestines and spleen of young European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), aged 8 mo. A group of fish was exposed to 647 mg/L of Roundup for 96 h. This treatment did not alter gene expression levels of *il-1 β* and *il-10* cytokine in the intestines, but significantly lowered both levels in the gills ($p = 0.02$ and $p = 0.04$ respectively). Expression levels of *ho-1* were increased significantly in the three organs of fish from the treated group (the gills $p = 0.04$, the intestines $p = 0.004$ and the spleen $p < 0.001$). These changes may in turn negatively impact the immune system of European sea bass exposed to Roundup.

Keywords Roundup · Gene expression · Cytokine · Heme-oxygenase-1 · *Dicentrarchus labrax*

Roundup Ultra 360 SL is a broad spectrum, post-emergence herbicide marketed by the Monsanto group. The

active substance in Roundup is glyphosate (*N*-(phosphonomethyl)glycine). This herbicide is the most commonly used herbicide worldwide, not only for agricultural purposes and individual household usage, but also in the maintenance of urban and industrial spaces. The introduction of commercial transgenic glyphosate-resistant crops has resulted in an increased use of Roundup Ultra 360 SL during the last decade. Glyphosate inhibits 5-enolpyruvylshikimate, an enzyme involved in the metabolic pathway of shikimic acid, which is the precursor of aromatic amino acids (Baylis 2000). Due to its specific action on plants, glyphosate is considered to be less toxic than other herbicides since the biosynthetic pathway of amino acid production by 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase is absent in animals and humans. Nonetheless, *in vitro* studies have shown a toxic action on human cells (Richard et al. 2005). Further, additives found in commercial formulations are essential for the effectiveness of glyphosate, and also pose a risk. For example, the polyoxyethylene amine surfactant present in Roundup is more toxic than glyphosate itself for human placental cells (Richard et al. 2005).

A portion of the herbicide that is applied to cropland is found in the runoff which eventually flows into the sea. Glyphosate concentration in some estuaries and coastal waters can reach 34 $\mu\text{g/L}$ (Villeneuve et al. 2011). Their presence in seawater can increase the prevalence and the extent of sanitary problems in marine fish farms which are mostly located by the coast (Kreutz et al. 2011). Studies on the effect of Roundup on seawater fish are still limited (Le Mer et al. 2013) compared to the much more abundant research on its effect on freshwater fish. In the latter, a number of physiological parameters such as lactate, glycogen, proteins and ammonia are modified during experimental exposure to Roundup (Gluszczak et al. 2007). A

Simone Richard and Nathalie Prévot-D'Alvise have contributed equally to this project and should be considered co-first authors.

S. Richard (✉) · N. Prévot-D'Alvise · R. Bunet · R. Simide ·
S. Couvray · S. Coupé · J. P. Grillasca
EB2M-PROTEE, EA 3819, Université de Toulon,
83957 La Garde, France
e-mail: srichard@univ-tln.fr

S. Couvray
Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez, Le Brusac,
83140 Six Fours Les Plages, France



EFFECT OF WATER TEMPERATURE INCREASE ON HO-1 EXPRESSION IN EUROPEAN SEA BASS (*Dicentrarchus labrax* L.) TISSUES

L. HACHFI¹, R. SIMIDE¹, S. RICHARD¹, S. COUVRAY^{1,2}, S. COUPE^{1,4}, S. GAILLARD^{1,4}, S. PIERRE³, J.P. GRILLASCA^{1,3,4} AND N. PREVOT-D'ALVISE¹*

¹ Équipe de Biologie Moléculaire Marine - PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France

² Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez- Le Brus, 83140 Six Fours Les Plages, France

³ AquaBioMass – 1025 Chemin du Naï, 83136 Méounes les Montrieux, France

⁴ BioTechServices, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France

Abstract

One of the most pertinent environmental factors influencing the marine organism life is temperature. It has been demonstrated that an increase of temperature is able to induce the synthesis of heat shock proteins (HSP). In this study we investigated the expression of HO-1 mRNA, also referred to as HSP32, in different tissues of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at several time points after increased temperature exposure (from 12°C to 30°C). Our results showed that HO-1 was not expressed in gills, heart, muscle and brain while it was expressed at a basal level in intestine. In liver, spleen and kidneys, HO-1 expression was influenced by temperature increases. In the spleen, we found a significant decrease of the HO-1 expression at the end of 4 weeks. In kidneys a very fast collapse of HO-1 expression level was recorded reaching null value as soon as one hour after exposure to 30°C. In liver, HO-1 expression increased from one hour of exposure to 30°C confirming HO-1 involvement to heat shock response in this organ. This increasing trend reached a 4.5-fold higher value than the initial level after 4 weeks.

Key words: *Dicentrarchus labrax*, gene expression, heme oxygenase-1, temperature increase, Heat Shock Protein 32.

Article information

Received on June 24, 2012

Accepted on September 7, 2012

* Corresponding author

Tel: + 33 (0) 4 94142670

Fax: + 33 (0) 4 94142045

E-mail: nathalie.prevot@univ-tln.fr

INTRODUCTION

One of the most pertinent environmental factors influencing the marine organism life is temperature (15). With the global warming and the worldwide decline of fishery stocks, increasing interest is accorded to study the effects of temperature increase on physiological and biochemical responses of fishes (8,11,19,20). Temperature exceeding the tolerance range can disrupt growth and reproduction of fish as well as larval development (27,30) and is considered as a real stress for organisms. Indeed an increase of normal growing temperature of 4 to 8°C is able to induce the synthesis of stress proteins (7). Classically named as heat shock proteins (HSP), their synthesis has been shown to be the first response to a large number of non-physiological stressors other than heat such as heavy metals, toxic chemicals, UV-light, etc... These proteins are synthesized to protect organisms from environmental stressors in order to maintain homeostasis and insure cell survival even if some display basal synthesis levels in normal unstressful conditions (17,34). This mechanism, commonly named stress adaptation or tolerance, is supposed to minimize the response of the organism to further exposures to the same stimulus (34). Genes coding for HSP represent an early biomarker of stress exposure in ecotoxicological studies (17). HSP are commonly classified by their molecular weight HSP25, HSP32, HSP60, HSP70 etc...(34).

Heme oxygenase-1 (HO-1), also referred to as heat shock protein (HSP32) is one of the three isoforms (in addition to HO-2 and HO-3) of the heme oxygenase enzyme (HO) responsible for the heme degradation into biliverdin (a cytoprotective antioxidant), carbon monoxide (a sig-

naling gas) and iron. Biliverdin and its products prevent cells from oxidative damages (13,24,34). However, extensive research have demonstrated that HO-1 induction may have both antioxidant and pro-oxidant activities related to iron release (28). Immunomodulatory as well as anti-inflammatory and anti-apoptotic properties have also been revealed (4,5). Unlike HO-2 and HO-3 isoforms which are constitutively expressed in cells under normal conditions, the HO-1 isoform has been demonstrated to be inducible as an adaptative cellular defense against various stressors (1) such as heat shock, UVA radiation, hydrogen peroxide, sodium arsenite, heavy metals, endotoxin, etc... These stressors were reported to induce HO-1 expression (17 and references therein). Moreover, HO-1 plays a relevant role in cytoprotective process (34).

The European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linne 1785) is one of the major species bred in aquaculture and is naturally present in the Mediterranean sea where temperature varies from 10°C to 28°C along the year (19). Growth and metabolism are dependent on water temperature (8 and references therein). Optimal growth temperature has been set between 22 and 25°C, whereas growth seems to stop at 11-15°C. Temperatures lower than 2°C and higher than 32°C are lethal to sea bass. Temperature interacts not only with biological factors but also with external ones like oxygen and salinity (18 and references therein). Other effects of non-optimal temperature, such as spleen contraction, increase in the erythrocyte number, hyperglycaemia, increase in leucocrit and swelling of erythrocytes reflecting an hypoxic state were observed (11). Since European sea bass represents a great commercial interest, it is relevant to study the impact of environmental variations that may



EFFECTS OF WATER TEMPERATURE INCREASE AND HEAVY METALS CONTAMINATION ON WAP65 GENE EXPRESSION IN SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*) LIVER

S. PIERRE^{1,*}, K. TARNOWSKA^{1,*}, L. HACHFI¹, S. COUPÉ¹, R. SIMIDE¹, S. COUVRAY^{1,2},
C. GARNIER³, M. GRIMALDI⁴, S. RICHARD¹, S. GAILLARD¹, N. PRÉVOT-D'ALVISE¹ AND
J. P. GRILLASCA¹ *

¹ Équipe de Biologie Moléculaire Marine - PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France.

² Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez- Le Brus, 83140 Six Fours Les Plages, France.

³ Équipe CAPTE - PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France.

⁴ Équipe ISO - PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France.

Abstract

It has been previously demonstrated that "Warm temperature Acclimation-related 65kD Protein" (WAP65) is involved in temperature acclimation, response to intoxication and infection, as well as in development. The expression of wap65-1 was investigated in the liver of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during exposure to the increased temperature (from 12 °C to 30 °C) and during intoxication with four heavy metals: lead, cadmium, copper and zinc. Post temperature increase wap65 expression was highest after one hour at 30 °C. After 1 to 4 weeks at 30 °C wap65 transcript levels did not differ from the 12°C control group, similar to observations regarding the heat shock protein, hsp70. Upregulation of wap65 was detected after treatment (intoxication) with cadmium (0.5 µg/l). In contrast, a slight, but significant down regulation of wap65 was seen after copper (5 µg/l) intoxication. These data indicate that functional analyses of WAP65 are needed to understand the differential regulation of this gene by metals. The role of WAP65 may be similar to that of HSP70, which has generalized functions in responding to certain stressors and maintaining normal cell physiology.

Key words: *Dicentrarchus labrax*, gene expression, hsp70, RNA, wap65, Warm Temperature Acclimation-related.

Article information's

Received on September 14, 2011

Accepted on October 18, 2011

Corresponding author

Professor J. P. Grillasca
Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France Tel: +33 (0) 4 94142401
Fax: +33 (0) 4 94142045
E-mail: grillasca@univ-tln.fr

* The first two authors contributed equally to this project and should be considered co-first authors.

Abbreviations: ATP: adenosine triphosphate; Cd: cadmium; Co: cobalt; Cu: copper; DPASV: Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry; GST: glutathione S-transferase; HDPE: high-density polyethylene; Hg: mercury; HSP: heat shock protein; MT: metallothionein; Ni: nickel; PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon; Pb: lead; PCB: polychlorobiphenyl; PCR: Polymerase Chain Reaction; TBT: tributyltin; UV: ultraviolet; WAP65: Warm temperature Acclimation-related 65kD Protein; Zn: zinc.

Copyright © 2011 Cellular & Molecular Biology

INTRODUCTION

Changes in marine environmental conditions include both natural events, e.g. temperature fluctuations (long-term such as global warming, and short-term seasonal variations), and anthropogenic actions such as chemical contamination. Among pollutants, metals are of a great importance. Their sources in aquatic environment are various, but significant contributions are man-made. Metals concentrations in marine environments are often relatively high, because their elimination in wastewater treatment plants is often limited (4).

Due to environmental changes, multiple dynamic equilibrium regulation mechanisms in marine organisms are aimed at maintaining efficient and optimal behavior in new environmental conditions (reestablishing homeostasis). Therefore, a variety of responses on cellular and molecular levels occurs. Natural

<http://www.cellmolbiol.com>

Rapports scientifiques

LELONG P., **COUVRAY S.**, MIARD T., REBILLARD D., KIRCHHOFER D., DEHAIL M., BONNEFONT J.-L. (2014).- Étude et suivi biologique d'une petite calanque marseillaise : la calanque de Podestat – Rapport annuel 2013. Contrat EDF – Institut océanographique Paul Ricard. 17 pp.

LELONG P., **COUVRAY S.**, MIARD T., REBILLARD D., BONNEFONT J.-L. (2014). Inventaire de la faune ichthyologique des fonds marins de l'ouest toulonnais. Rapport annuel 2013. Contrat TPM - CG83 – Institut océanographique Paul Ricard. 23 pp.

COUVRAY S., COUPÉ S., MIARD T., KIRCHHOFER D., GRILLASCA J.-P., MARTIN Y., BONNEFONT J.-L. (2013). Evaluation des opérations de lâchers expérimentaux de juvéniles d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus*. Décembre 2013. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 35 pp.

COUVRAY S., MIARD T., COUPÉ S., GRILLASCA J.-P., MARTIN Y., BONNEFONT J.-L. (2013). Suivi des populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* dans l'aire toulonnaise – Campagnes de 2013. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 22 pp.

KIRCHHOFER D., **COUVRAY S.**, MIARD T., DEHAIL M., AUBLANC P., BONNEFONT J.-L. (2013). Protocole expérimental de production de juvéniles d'oursins *Paracentrotus lividus*. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 16 pp.

MIARD T., **COUVRAY S.**, AUBLANC P., MAIRE E., DEHAIL M., KIRCHHOFER D., BONNEFONT J.-L., 2013. Projet oursins du soleil – Bilan expérimental. Institut Océanographique Paul Ricard : 29 pp.

LELONG P., **COUVRAY S.**, MIARD T., REBILLARD D., BONNEFONT J.-L. (2012). Inventaire de la faune ichthyologique des fonds marins de l'ouest toulonnais – État initial. Contrat TPM - CG83 – Institut océanographique Paul Ricard. 25 pp.

MIARD T., **COUVRAY S.**, BONNEFONT J.-L. Affinage d'oursins : synthèse bibliographique. (2012). Comité Local des Pêches Maritimes et des Elevages Marins du Var / Fonds Européen pour la pêche – Institut Océanographique Paul Ricard. 19 pp.

COUVRAY S., MIARD T., COUPÉ S., BONNEFONT J.-L., GRILLASCA J.-P., MARTIN Y. (2012). Suivi des populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* dans l'aire toulonnaise – Campagne de Septembre - Octobre 2012. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 21 pp.

LELONG P., ROBILLON C., **COUVRAY S.**, MIARD T., REBILLARD D., BONNEFONT J.L., (2012) - Étude et suivi biologique d'une petite calanque marseillaise : la calanque de Podestat - État initial. Contrat EDF – Institut oceanographique Paul Ricard. 45 pp.

COUVRAY S., MIARD T., COUPÉ S., BONNEFONT J.-L., GRILLASCA J.-P., MARTIN Y. (2012). Suivi des populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* dans l'aire toulonnaise – Campagne de Mai 2012. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 21 pp.

COUVRAY S., ROUANET E., MIARD T., COUPÉ S., BONNEFONT J.-L., GRILLASCA J.-P., MARTIN Y. (2012). Suivi des populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* dans l'aire toulonnaise – Campagne d'Octobre - Novembre 2011. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 22 pp.

LELONG P., BONNEFONT J.-L., **COUVRAY S.**, MARTIN Y., MIARD T. (2011). Inventaire de la faune ichtyologique des fonds marins de l'ouest toulonnais. Rapport préliminaire, décembre 2011. Commande : Conseil Général du Var, Direction de l'Environnement – Institut Océanographique Paul Ricard. 20 pp.

COUVRAY S., ROUANET E., BONNEFONT J.-L., MARTIN Y. (2011) Etude de l'impact des installations d'élevage de la Ferme Marine de Campomoro sur la qualité du milieu marin. Institut Océanographique Paul Ricard. 19 pp.

COUVRAY S., ROUANET E., COUPÉ S., BONNEFONT J.-L., GRILLASCA J.-P., MARTIN Y. (2011). Mise en place d'un suivi des populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* dans l'aire toulonnaise – Campagne d'Avril 2011. Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée – Institut Océanographique Paul Ricard : 22 pp.

Colloques

Présentations orales

COUVRAY S. Evolution et suivi de la ressource en oursins comestibles. Journées – débats « Marseille et la Méditerranée ». Marseille, 26-27 Septembre 2013.

COUVRAY S. L'oursin *Paracentrotus lividus*, une ressource naturelle en déclin. Les axes de recherche pour une gestion durable. 5^{ème} Journées Scientifiques Euroméditerranéennes 10 mars 2011.