



HAL
open science

Etude génétique des populations de grandes nacres, *Pinna nobilis*, en Occitanie : identification de priorités de conservation dans un contexte de pandémie

Claire Peyran

► To cite this version:

Claire Peyran. Etude génétique des populations de grandes nacres, *Pinna nobilis*, en Occitanie : identification de priorités de conservation dans un contexte de pandémie. Biodiversité. Sorbonne Université, 2021. Français. <NNT : 2021SORUS454>. <tel-03728197>

HAL Id: tel-03728197

<https://theses.hal.science/tel-03728197v1>

Submitted on 20 Jul 2022

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

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



HAL Authorization

Sorbonne Université

Ecole doctorale 129 – Sciences de l’Environnement

USR 3278 – Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l’Environnement

Etude génétique des populations de grandes nacres,

***Pinna nobilis*, en Occitanie**

*Identification de priorités de conservation dans un contexte
de pandémie*

Par Claire Peyran

Thèse de doctorat de Biologie marine et génétique des populations

Dirigée par Serge Planes

Présentée et soutenue publiquement le 16 Juillet 2021

Devant un jury composé de :

Emilie Boissin, Ingénieur de recherche, Docteur

Eric Thiébaud, Professeur

José Rafael García-March, Professeur

Maite Vázquez-Luis, Chargé de recherche

Nardo Vicente, Professeur émérite

Robert Bunet, Directeur de recherche

Serge Planes, Directeur de recherche

Sophie Arnaud-Haond, Directrice de recherche

Co-encadrante

Examineur

Rapporteur

Examinatrice

Invité d’honneur

Examineur

Directeur de thèse

Rapporteur

« La beauté réside dans les yeux de celui qui regarde. »

Oscar Wilde

« Dans l'histoire de l'évolution, la vie renverse toutes les barrières. La vie prend le large, la vie conquiert de nouveaux territoires. C'est parfois ardu, parfois dangereux, mais la vie trouve toujours un moyen. »

Jurassic Park, Michaël Crichton

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	1
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES SUPPLEMENTARY INFORMATION	8
REMERCIEMENTS	9
DÉFINITIONS.....	11
INTRODUCTION GENERALE.....	15
1. DÉCLIN DES ESPÈCES ET GÉNÉTIQUE DE LA CONSERVATION	17
2. LA VIE DANS UN SYSTÈME FRAGMENTÉ : IMPORTANCE DE LA CONNECTIVITÉ ET DE LA DISPERSION LARVAIRE	19
3. LE MODÈLE D'ÉTUDE : LA GRANDE NACRE DE MÉDITERRANÉE, <i>PINNA NOBILIS</i> (LINNAEUS, 1758)	23
3.1. <i>Biologie et écologie</i>	23
3.2. <i>Cycle de reproduction</i>	24
3.3. <i>Histoire démographique et structure génétique</i>	25
3.4. <i>Une espèce au bord de l'extinction</i>	26
3.5. <i>Un modèle d'étude idéal</i>	30
4. OBJECTIFS ET CONTENU DE LA THÈSE	31
CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DE LA DISTRIBUTION DES POPULATIONS DE GRANDES NACRES LE LONG DU LITTORAL OCCITAN ET DESCRIPTION DES HABITATS.....	35
1. CONTEXTE.....	37
2. PUBLICATION ASSOCIÉE.....	38
3. ABSTRACT	41
4. INTRODUCTION	42
5. MATERIALS AND METHODS.....	44
5.1. <i>Study area</i>	44
5.2. <i>Prospection and exploration of the field</i>	44
5.3. <i>Estimation of density and population size in each locality</i>	45
5.4. <i>Size estimation</i>	45
5.5. <i>Statistical analysis</i>	46
6. RESULTS	46
6.1. <i>Surface of potential habitat</i>	46
6.2. <i>Population density</i>	50

6. 3.	<i>Population size estimation</i>	50
6. 4.	<i>Size distribution and maturity</i>	50
6. 5.	<i>Characteristics of the habitats colonized by P. nobilis</i>	53
7.	DISCUSSION	55
7. 1.	<i>Importance of lagoons</i>	56
7. 2.	<i>Characterization of the habitats colonized by P. nobilis</i>	57
7. 3.	<i>Perspectives for conservation</i>	59
8.	SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	62

CHAPITRE 2 :_DEVELOPPEMENT ET TEST DE 26 NOUVEAUX MARQUEURS MICROSATELLITES POLYMORPHIQUES..... 65

1.	CONTEXTE.....	67
2.	PUBLICATION ASSOCIÉE :.....	68
3.	ABSTRACT.....	70
4.	INTRODUCTION	71
5.	MATERIALS AND METHODS.....	73
6.	RESULTS AND DISCUSSION.....	74
7.	SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	82

CHAPITRE 3 :_CARACTERISATION DE LA STRUCTURE GENETIQUE DE L'ESPECE LE LONG DU LITTORAL OCCITAN, EN INCLUANT LES POPULATIONS LAGUNAIRES 89

1.	CONTEXTE.....	91
2.	PUBLICATION ASSOCIÉE.....	92
3.	ABSTRACT.....	95
4.	INTRODUCTION	96
5.	MATERIALS AND METHODS.....	99
5. 1.	<i>Sampling</i>	99
5. 2.	<i>Size estimation</i>	102
5. 3.	<i>Molecular analyses</i>	102
5. 4.	<i>Data analysis</i>	103
6.	RESULTS	105
6. 1.	<i>Genetic diversity</i>	105
6. 2.	<i>Genetic differentiation</i>	106
6. 3.	<i>Relatedness</i>	108
6. 4.	<i>Size classes</i>	109
7.	DISCUSSION	110
7. 1.	<i>Genetic diversity and relatedness</i>	111
7. 2.	<i>Regional patterns of dispersal</i>	113
7. 3.	<i>Implication for conservation</i>	114

8.	SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	116
CHAPITRE 4: DYNAMIQUE DEMOGRAPHIQUE, FONCTIONNEMENT ET STRATEGIE DE REPRODUCTION		
D'UNE POPULATION 125		
1.	CONTEXTE.....	127
2.	PUBLICATION ASSOCIÉE.....	128
3.	ABSTRACT :.....	131
4.	INTRODUCTION.....	132
5.	MATERIALS AND METHODS.....	134
5. 1.	<i>Study location and sample collection.....</i>	<i>134</i>
5. 2.	<i>Size and sexual maturity stage estimation</i>	<i>135</i>
5. 3.	<i>Molecular analysis</i>	<i>136</i>
5. 4.	<i>Data analysis.....</i>	<i>136</i>
6.	RESULTS.....	138
6. 1.	<i>Sampling effort and recaptures</i>	<i>138</i>
6. 2.	<i>Genetic variability among years</i>	<i>138</i>
6. 3.	<i>Family structure</i>	<i>140</i>
7.	DISCUSSION.....	142
7. 1.	<i>Temporal dynamic within the population.....</i>	<i>142</i>
7. 2.	<i>Reproductive system and maintenance of the population</i>	<i>143</i>
7. 3.	<i>Family structure</i>	<i>145</i>
7. 4.	<i>Implication for conservation</i>	<i>146</i>
8.	SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	148
CONCLUSION GENERALE :..... 151		
1.	RÉSULTATS PRINCIPAUX.....	153
1. 1.	<i>Une espèce avec une forte capacité d'adaptation.....</i>	<i>153</i>
1. 2.	<i>Importance des lagunes dans le fonctionnement de l'espèce.....</i>	<i>155</i>
2. 1. a.	<i>Des réservoirs pour les dernières populations denses.....</i>	<i>155</i>
2. 1. b.	<i>Un important patrimoine génétique encore préservé.....</i>	<i>156</i>
2. 1. c.	<i>Une contribution incertaine des populations lagunaires au maintien de l'espèce sur la côte.....</i>	<i>157</i>
2. 1. d.	<i>Des habitats instables</i>	<i>159</i>
1. 3.	<i>Implications pour la conservation.....</i>	<i>162</i>
3. 1. a.	<i>Définition d'un état de référence</i>	<i>162</i>
3. 1. b.	<i>Quel futur pour l'espèce ?</i>	<i>162</i>
3. 1. c.	<i>Recommandations pour la conservation</i>	<i>164</i>
2.	PERSPECTIVES.....	169
2. 1.	<i>Fonctionnement de l'espèce sur le littoral Occitan.....</i>	<i>169</i>
2. 2.	<i>Evaluation de l'impact de la disparition de Pinna nobilis sur le milieu</i>	<i>171</i>
2. 3.	<i>Sauvegarde et restauration des populations de Pinna nobilis</i>	<i>173</i>

3. CONCLUSION	179
REFERENCES	181
ANNEXES	215
ANNEXE 1	217
ANNEXE 2	219
ANNEXE 3	221

Liste des figures

FIGURE 1 : SCHEMA REPRESENTANT LE CONCEPT DE METAPOPOPULATION. LA METAPOPOPULATION EST CONSTITUEE D'UN ENSEMBLE DE POPULATIONS LOCALES QUI ONT CHACUNE LEUR PROPRE DYNAMIQUE ET QUI ECHANGENT DES INDIVIDUS VIA LA DISPERSION LARVAIRE.....	20
FIGURE 2 : DEUX GRANDES NACRES EN BORDURE D'HERBIER DE POSIDONIES © G. IWANKOW.....	23
FIGURE 3 : CYCLE DE VIE DES GRANDES NACRES. AU MOMENT DE LA REPRODUCTION LA FECONDATION EST EXTERNE ET DONNE UN ŒUF QUI SE TRANSFORME EN LARVE TROCHOPHORE PUIS EN LARVE VELIGERE. CETTE PHASE LARVAIRE EST PELAGIQUE ET DURE JUSQU'AU RECRUTEMENT, QUAND L'INDIVIDU S'INSTALLE DANS UN HABITAT OU IL VA SE SEDENTARISER ET GRANDIR JUSQU'A DEVENIR ADULTE.....	25
FIGURE 4: MICROGRAPHIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UNE SPORE DU PARASITE HAPLOSPORIDIUM PINNAE (CATANESE ET AL., 2018).....	27
FIGURE 5 : EVOLUTION DE LA MORTALITE CAUSEES PAR LE PARASITE HAPLOSPORIDIUM PINNAE SUR LES POPULATIONS DE GRANDES NACRES A TRAVERS LA MER MEDITERRANEE AU PRINTEMPS 2018 (A) ET AU PRINTEMPS 2019 (B). ALORS QUE LA MORTALITE ETAIT PRINCIPALEMENT RESTREINTE AU BASSIN OUEST EN 2018, ELLE S'EST PROPAGEE A TRAVERS TOUTE LA MER MEDITERRANEE EN 2019. D'APRES DONNEES IUCN.	29
FIGURE 6 : MAP OF THE STUDY AREA SHOWING ALL THE PROSPECTED SITES, THE RESPECTIVE ESTIMATED ABUNDANCES OF FAN MUSSELS AND THE AREAS WHERE THE SPECIES WAS ABSENT.	49
FIGURE 7 : TOTAL LENGTH DISTRIBUTION OF LIVING FAN MUSSELS WITHIN EACH SAMPLED SITES.....	52
FIGURE 8 : FACTOR ANALYSIS OF MIXED DATA (FAMD) SHOWING SAMPLED SITES AND VARIABLES INVOLVED IN THE ANALYSIS. MODALITIES OF QUALITATIVE VARIABLES ARE REPRESENTED IN BLACK, QUANTITATIVE VARIABLES ARE REPRESENTED IN THE CORRELATION CIRCLE AND COLORS CORRESPOND TO THE 3 DIFFERENT TYPE OF HABITAT.....	54
FIGURE 9 : LOCATION OF 16 SAMPLED SITES FOR PINNA NOBILIS IN THE GULF OF LION, NORTH-WESTERN MEDITERRANEAN SEA. THIS MAP WAS CREATED USING R 4.0.3 (HTTPS://WWW.R-PROJECT.ORG/) USING COASTLINE AND SURFACE WATER DATA PROVIDED BY HTTPS://WWW.DATA.GOUV.FR/FR/	100
FIGURE 10 : MULTIDIMENSIONAL SCALING (MDS) BASED ON NEI'S GENETIC DISTANCES AMONG THE 8 LOCALITIES WHERE PINNA NOBILIS INDIVIDUALS WERE COLLECTED.	107
FIGURE 11 : PERCENTAGE (PR_{xy}) OF PINNA NOBILIS INDIVIDUALS SHARING AT LEAST ONE COMMON PARENT (I.E PERCENTAGE OF RELATIONS WITH $R_{xy} > 0.25$) CALCULATED FOR EACH LOCALITY AND FOR ALL SAMPLED INDIVIDUALS MIXED. BASED ON QUELLER AND GOODNIGHT (1989) R_{xy} INDEX FOR RELATEDNESS.....	108
FIGURE 12 : RIDGELINE PLOT SHOWING THE SIZE DENSITY DISTRIBUTION OF PINNA NOBILIS INDIVIDUALS SAMPLED IN EACH LOCALITY. MEAN SIZES IN EACH LOCALITY ARE REPRESENTED BY SOLID LINES. ARROWS REPRESENT THE RANGE OF THE SIZE GROUPS IDENTIFIED IN PORT-ST-LOUIS, THAU AND AYROLLE.....	109
FIGURE 13: EXEMPLE DE CONFIGURATION D'UN CLUSTER FAMILIAL RECONSTRUIT PAR L'ALGORITHME DE COLONY. MEME SI LES INDIVIDUS O1 ET O3 NE SONT PAS DIRECTEMENT RELIES VIA LEURS PARENTS, ILS LE SONT VIA L'INDIVIDU O2 AVEC QUI ILS PARTAGENT CHACUN UN PARENT (M1 ET F2 RESPECTIVEMENT). COLONY PERMET D'OBTENIR UNE PROBABILITE POUR L'ENSEMBLE DE LA CONFIGURATION DU CLUSTER (P_c) AINSI QUE POUR CHACUNE DES RELATIONS ESTIMEES (P_1 A P_6).....	128

FIGURE 14 : LOCATION OF ALL THE PINNA NOBILIS INDIVIDUALS SAMPLED IN PEYREFITE BAY DURING THE THREE FIELDWORK CAMPAIGNS.	135
FIGURE 15 : REPRESENTATION OF THE FAMILY STRUCTURE HIGHLIGHTED WITHIN THE FAN MUSSEL POPULATION IN THE BAY OF PEYREFITE, BASED ON COLONY PARENTAGE ANALYSIS. (A) NUMBER OF INDIVIDUALS PER FAMILY CLUSTER THAT HAVE AT LEAST A 95 % PROBABILITY OF GROUPING TOGETHER. (B) NUMBER OF INDIVIDUALS INVOLVED IN 1, 2, 3 OR 4 HALF-SIB RELATIONSHIPS WITH A PROBABILITY UP TO 95 %. (C) REPRESENTATION OF THE HALF-SIB RELATIONS WITH A PROBABILITY OF AT LEAST 95 % AND DISPLAYED IN COLOR IF THE CLUSTER OF BELONGING HAS A PROBABILITY UP TO 95 % OR IN GREY IF THE CLUSTER OF BELONGING HAS A PROBABILITY LOWER THAN 95 %. CLUSTERS 15 AND 26 ARE NOT DISPLAYED AS ALL INCLUDED INDIVIDUALS WERE LINKED BY RELATIONSHIPS WITH PROBABILITY LOWER THAN 95 %.....	141
FIGURE 16 ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TYPES DE SUBSTRATS COLONISES PAR PINNA NOBILIS. VASE (A), SABLE GROSSIER (B), SABLE FIN (C), SANS HERBIER (D) OU AVEC HERBIER (E).....	154
FIGURE 17 ILLUSTRATION DE L'ASSOCIATION ENTRE PINNA NOBILIS ET LES DEUX ESPECES COMMENSALES PONTONIA PINNOPHYLAX ET NEPINNOTHERES PINNOTHERES, INDIQUEES PAR LES FLECHES ROUGES. (A) INDIVIDUS DE P. PINNOPHYLAX ET (B) P. PINNOPHYLAX ET N. PINNOTHERES COEXISTANT AU SEIN DE LA MEME GRANDE NACRE (TRIGOS AND VICENTE, 2019).....	172
FIGURE 18: PHOTOS DE (A) PINNA NOBILIS, (B) PINNA RUDIS AINSI QUE DES TROIS HYBRIDES IDENTIFIES GENETIQUEMENT (C, D ET E). VAZQUEZ-LUIS ET AL. (2021)	178

Liste des tableaux

TABLE 1 : CHARACTERISTICS OF SAMPLED SITES: TYPE OF HABITAT, SURFACE OF POTENTIAL HABITAT, PERCENTAGE OF POTENTIAL HABITAT WITHIN THE LOCALITY, NUMBER OF TRANSECTS PROSPECTED, MEAN DEPTH OF INDIVIDUALS WITHIN A SITE, TYPE OF SUBSTRATE, VEGETATION IF PRESENT, DENSITY AND ESTIMATED ABUNDANCE CALCULATED FOR EACH SITE WITH CONFIDENCE INTERVAL AT 95 % IN THE GULF OF LION	48
TABLE 2 : MEAN DENSITY (\pm STANDARD DEVIATION) OF LIVING FAN MUSSELS (INDIVIDUALS/100 M ²) DEPENDING ON THE TYPE OF HABITAT AND DEPENDING ON THE PRESENCE OR ABSENCE OF VEGETATION. THE STAR INDICATES A COMPARISON THAT WAS SIGNIFICANT AFTER KRUSKAL-WALLIS' TEST (P-VALUE = 0.014).....	55
TABLE 3 : CHARACTERIZATION OF THE 37 MICROSATELLITE LOCI USED FOR THIS STUDY. T _A , PRIMER ANNEALING TEMPERATURE; N NUMBER OF INDIVIDUALS WITH RELIABLE AMPLIFICATION; N _A NUMBER OF ALLELES; H _O OBSERVED HETEROZYGOSITY; H _E EXPECTED HETEROZYGOSITY; F _{IS} INBREEDING COEFFICIENT.....	76
TABLE 4 : CROSS-SPECIES AMPLIFICATION OF THE OPTIMIZED LOCI FOR FOUR SPECIES OF PINNA (P. CARNEA, P. MURICATA, P. RUGOSA, P. RUDIS) AND SIZE RANGE; N: NUMBER OF INDIVIDUALS SHOWING CLEAR AMPLIFICATION PROFILE/NUMBER OF INDIVIDUALS TESTED; NA: NUMBER OF ALLELES PER LOCUS.....	79
TABLE 5 : COLLECTION INFORMATION FOR THE 16 SAMPLING SITES IN THE GULF OF LION (NORTH-WESTERN MEDITERRANEAN SEA) WHERE THE 960 PINNA NOBILIS INDIVIDUALS WERE COLLECTED FOR THIS STUDY.	101
TABLE 6 : SUMMARY STATISTICS OF GENETIC DIVERSITY INDICES OF PINNA NOBILIS IN EACH LOCALITY. N: NUMBER OF INDIVIDUALS SAMPLED; NA: MEAN NUMBER OF ALLELES; AP: NUMBER OF PRIVATE ALLELES; AR: STANDARDIZED ALLELIC RICHNESS; APR: STANDARDIZED PRIVATE ALLELE RICHNESS; HO: OBSERVED HETEROZYGOSITY; HE: EXPECTED HETEROZYGOSITY AND FIS: INBREEDING COEFFICIENT.....	106
TABLE 7 : F _{ST} VALUES OF PAIRWISE COMPARISONS (ROBERTSON AND HILL ESTIMATOR FOR F _{ST} , 1984 CORRECTED BY RAUFASTE & BONHOMME, 2000) BETWEEN THE 8 LOCALITIES WHERE PINNA NOBILIS SPECIMENS WERE COLLECTED.	107
TABLE 8 : SUMMARY STATISTICS FOR THE TWO SIZE CLASSES IN AYROLLE, THAU AND PORT-ST-LOUIS. N, THE NUMBER OF INDIVIDUALS IN THE SIZE CLASSES; NA, THE MEAN NUMBER OF ALLELES; HO, THE OBSERVED HETEROZYGOSITY; HE, THE EXPECTED HETEROZYGOSITY; FIS, THE INBREEDING COEFFICIENT; F _{ST} VALUES OF PAIRWISE COMPARISONS BETWEEN SIZE CLASSES AND PR _{xy} , THE PERCENTAGE OF INDIVIDUALS SHARING AT LEAST ONE COMMON PARENT (I.E. PERCENTAGE OF RELATIONS WITH R _{xy} > 0.25) WITHIN THE TWO SIZE GROUPS AND CONSIDERING THE TWO SIZE GROUPS MIXED (IN BOLD).	110
TABLE 9 : SAMPLING EFFORT FOR EACH YEAR AND TOTAL NUMBER OF PINNA NOBILIS JUVENILES, ADULTS AND INDIVIDUALS THAT WERE NOT MEASURED (NA) FOR EACH FIELDWORK CAMPAIGN. NUMBERS IN BOLD INDICATE THE NUMBER OF NEW INDIVIDUALS SAMPLED DURING THE YEAR AND NUMBERS BETWEEN BRACKETS REFER TO INDIVIDUALS SAMPLED DURING THE PREVIOUS YEARS.	138
TABLE 10 : SUMMARY STATISTICS OF GENETIC DIVERSITY INDICES OF PINNA NOBILIS FOR EACH YEAR. N: NUMBER OF INDIVIDUALS SAMPLED; NA _{TOT} : TOTAL NUMBER OF ALLELES; NA: MEAN NUMBER OF ALLELES; AR: STANDARDIZED ALLELIC RICHNESS; AP _{TOT} : TOTAL NUMBER OF PRIVATE ALLELES; AP: MEAN NUMBER OF PRIVATE ALLELES; APR: STANDARDIZED PRIVATE ALLELE RICHNESS; HO: OBSERVED HETEROZYGOSITY; HE: EXPECTED HETEROZYGOSITY; HNB: UNBIASED EXPECTED HETEROZYGOSITY AND FIS: INBREEDING COEFFICIENT.....	139

TABLE 11 : F_{ST} VALUES OF PAIRWISE COMPARISONS (ROBERTSON AND HILL ESTIMATOR FOR F_{ST} , 1984 CORRECTED BY RAUFASTE & BONHOMME, 2000) BETWEEN THE 3 YEARS OF FIELDWORK CAMPAIGNS DURING WHICH PINNA NOBILIS SPECIMENS WERE COLLECTED.	139
TABLE 12 TABLE 4: COMPOSITION OF THE 11 CLUSTERS	140

Liste des Supplementary information

FIGURE S 1 : CLUSTER ANALYSIS OBTAINED FROM THE BAYESIAN-BASED METHOD IMPLEMENTED IN STRUCTURE v2.3.4 (PRITCHARD ET AL., 2000) SHOWING THE MOST LIKELY NUMBER OF CLUSTERS (K) PRESENT IN P. NOBILIS POPULATIONS ACROSS THE GULF OF LION RESULTING FROM THE APPLICATION OF THE METHOD DESCRIBED BY (A) EVANNO ET AL. (2005) AND (B) BY PUECHMAILLE (2016)	120
FIGURE S 2 : RELATIONSHIP BETWEEN THE PERCENTAGES OF RELATED INDIVIDUALS AND THE NUMBER OF SAMPLED INDIVIDUALS MODELED FOR EACH LOCALITY	121
TABLE S 1 : RESULTS OF THE FACTORIAL ANALYSIS OF MIXED DATA FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DATAS. Cos^2 REFERS TO THE QUALITY OF THE REPRESENTATION. CTR REFERS TO THE CONTRIBUTION TO THE CONSTRUCTION OF EACH DIMENSION. V-TEST REFERS TO THE SIGNIFICATIVITY OF VARIABLES. IF A MODALITY IS $-2 < \text{V-TEST} < 2$, ITS COORDONNATE IS NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM 0 ON THIS AXIS.....	62
TABLE S 2 : LIST OF SAMPLES USED IN THE STUDY TO OPTIMIZE PCR AMPLIFICATION AND CROSS-SPECIES AMPLIFICATION TESTS ..	82
TABLE S 3 : LINKAGE DISEQUILIBRIUM BETWEEN ALL PAIRS OF LOCI. * SIGNIFICANT VALUES AFTER SEQUENTIAL BONFERRONI CORRECTION.	87
TABLE S 4 : CHARACTERIZATION OF THE 22 MICROSATELLITE LOCI USED FOR THIS STUDY. T_A : PRIMER ANNEALING TEMPERATURE; N : NUMBER OF INDIVIDUALS WITH RELIABLE AMPLIFICATION; NA : NUMBER OF ALLELES; H_O : OBSERVED HETEROZYGOSITY; H_E : EXPECTED HETEROZYGOSITY; F_{IS} : INBREEDING COEFFICIENT.....	116
TABLE S 5 : F_{ST} VALUES OF PAIRWISE COMPARISONS BETWEEN SAMPLED SITES (ROBERTSON AND HILL ESTIMATOR FOR F_{ST} , 1984 CORRECTED BY RAUFASTE & BONHOMME, 2000).....	118
TABLE S 6 : AMOVA ANALYSIS OF GENETIC VARIANCES WITHIN AND AMONG LOCALITIES THROUGH THE GULF OF LION. LEVEL OF SIGNIFICANCE IS BASED ON 10 000 ITERATIONS.	119
TABLE S 7 : AMOVA ANALYSIS OF GENETIC VARIANCES WITHIN AND AMONG LOCALITIES AND TYPE OF HABITAT THROUGH THE GULF OF LION. LEVEL OF SIGNIFICANCE IS BASED ON 10 000 ITERATIONS.....	119
TABLE S 8 : PERCENTAGE OF RELATED INDIVIDUALS, SHARING AT LEAST ONE COMMON PARENT (I.E. $R_{xy} > 0.25$) CALCULATED FOR EACH SAMPLED SITE. BASED ON QUELLER AND GOODNIGHT (1989) INDEX R_{XY} FOR RELATEDNESS.....	122

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Sophie Arnaud-Haond et à Jose Rafael García-March d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que Maite Vázquez-Luis, Robert Bunet et Eric Thiébaud d'avoir accepté d'en être les examinateurs. Un grand merci également à Nardo Vicente d'avoir assisté à cette thèse, en tant qu'invité d'honneur, et pour avoir partagé avec nous son expertise et sa passion pour la grande nacre de Méditerranée.

Je souhaite ensuite exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse, Serge Planes, sans qui tout ce travail n'aurait pas eu lieu. Merci de m'avoir accordé ta confiance, dès mon stage de Master 2 et pour la thèse ensuite, alors que je n'avais aucune idée de ce qu'était une grande nacre ni un marqueur microsatellite. Merci de m'avoir guidée tout au long de cette aventure et d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions (même si elles n'étaient peut-être pas toujours très intelligentes ;)). Cette thèse m'a permis d'apprendre énormément, à la fois sur les plans scientifique et humain. Un grand merci pour tout ça.

Je tiens également à remercier sincèrement Emilie Boissin pour son implication et sa disponibilité tout au long de cette thèse. Merci infiniment pour ton aide et tous tes précieux conseils, depuis mon stage et tout au long de cette thèse. Merci également pour ton soutien et tes encouragements. Je te souhaite le meilleur et que tous tes projets se concrétisent.

Merci à Guillaume, Eli et Titouan, la « Pinna team », pour m'avoir aidé à réaliser l'échantillonnage pour ma thèse. Merci pour tous les bons moments passés sur le terrain. Ce fut une expérience enrichissante qui ressemblait tantôt à des vacances à la mer, tantôt à un stage de survie en conditions extrêmes.

Je tiens à remercier plus particulièrement Titouan, le stagiaire en or. Je te remercie de t'être engagé dans « l'aventure nacre » et de m'avoir accompagné pendant ces 3 ans. Merci également pour toutes les sorties terrains qui m'ont permis de quitter un peu l'ordinateur pour aller me rouler dans la vase et dans l'eau (froide). Ne vous inquiétez pas nous sommes des professionnels !

Je souhaite remercier chaleureusement Nathalie Tolou qui a été la première à m'accueillir au CRIOBE. Merci pour ta patience lorsque tu m'as formé à la biologie moléculaire et surtout à GeneMapper ! Un grand merci également pour ta gentillesse et ta bonne humeur

constante qui m'ont été d'une grande aide pendant ma thèse. Je te souhaite plein de bonheur avec ta famille qui s'agrandit.

Je tiens également à remercier tout le personnel du laboratoire pour leur accueil et leur aide tout au long de ma thèse. Un grand merci à Peter pour le soutien informatique. Merci à Fabien pour toutes les discussions, tous tes conseils et tous les moments de convivialité !

Merci également à Jeanine d'avoir pris le temps de relire et de corriger toutes mes publications en anglais, pour la bonne humeur et pour nous trainer à chaque fois à la fête de la science, parce qu'en vrai c'était pas si terrible !

Evidemment je remercie tous les doctorants du CRIOBE et tous les copains sans qui ma vie à Perpignan aurait été bien morne. Merci à Charles (notre moniteur de colonie de vacances), Nina (Awesome Nina !), Nina P, Jerem', Jeremy, Chloé, Hendrikje, Kim, Violaine, Victor, Gonzalo. Un merci spécial à Jason, merci pour tout ton soutien et tes encouragements et merci de rayonner autant. J'ai hâte que tu sois président de la Polynésie. Un grand merci aussi Céline, Clara et Titouan, merci pour votre aide que ce soit pour le travail ou en dehors et merci pour tous les moments passés ensemble... p'tite bière ce soir ;) ? Merci également à tous les stagiaires qui sont passés par le bureau, la liste est trop longue et à tous ceux que j'ai oublié... je vous aime quand même ! Merci aussi à tous les copains de Bordeaux, celle du Canada, celui de Montp..Mayotte et ceux de partout ailleurs qui m'ont soutenu depuis le début.

Enfin, un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu, pour absolument tout dans la vie, et tout au long de mes études qui m'ont menées jusqu'ici. Je suis très contente et reconnaissante de l'éducation et de l'exemple que vous m'avez offert ainsi que la façon dont vous l'avez fait.

Et t'inquiète pas papa, il n'est pas encore trop tard pour que je devienne astronaute ;)

Définitions

Allèle nul : allèle qui ne s'amplifie pas, ou très peu, lors de la PCR, de façon à ce qu'il soit indétectable (Dakin and Avise, 2004).

Auto-recrutement : correspond à la proportion de larves qui recrutent dans la population où se trouvent leurs parents.

Connectivité : correspond à la mesure dans laquelle des populations, communautés, écosystèmes ou des habitats spatialement distincts sont liés par des échanges de gènes via la dispersion larvaire (Warner and Cowen, 2002).

Dépression de consanguinité : réduction de la fitness des individus issus de croisements consanguins par rapports aux autres individus (Hedrick and Kalinowski, 2000).

Dérive génétique : variation génétique aléatoire d'une génération à l'autre.

Dispersion larvaire : mouvement des individus depuis leur lieu de naissance vers leur lieu d'installation (Pineda et al., 2007).

Diversité génétique : mesure de la variabilité génétique au sein d'une population (Hughes et al., 2008).

Installation : L'installation correspond à la fin de la vie larvaire pélagique, lorsque l'organisme choisi un substrat pour s'y installer de façon plus ou moins définitive. Ce processus s'accompagne généralement d'une métamorphose (Connell, 1985).

Lagune côtières : Les lagunes côtières sont des masses d'eau saumâtres ou marines séparées de la mer par une barrière physique qui peut être un récif, un banc de sable, etc. Suivant l'étendue de la barrière elles peuvent être partiellement ou totalement fermée mais la plupart sont reliées à la mer, au moins par intermittence (Kennish and Paerl, 2010).

Lido : Le lido correspond au cordon littoral fermant la lagune.

Métopopulation : Le terme métopopulation a été formalisé pour la première fois par Richard Levins (Levins, 1970, 1969) et désigne un système constitué d'un ensemble de populations locales distinctes dont chacune a sa propre dynamique et ayant une probabilité de s'éteindre. Ce concept a été généralisé et comprend maintenant tous les systèmes où l'espace est discret et où les processus écologiques ont lieu à deux échelles : l'échelle locale

et l'échelle de la métapopulation. Il est donc possible de parler de métapopulation dès qu'il y a des échanges entre des populations qui se reproduisent localement et de façon indépendante, sans qu'il y ait nécessairement d'extinction (Hanski, 1998; Kritzer and Sale, 2004).

Population locale : correspond à une zone circonscrite contenant des adultes qui se reproduisent dans cette zone (Warner et Cowen 2002).

Recrutement : Le recrutement comprend la phase d'installation et implique que l'individu a survécu une petite période de temps. Les nouvelles recrues sont donc les individus qui ont survécu à la phase d'installation. Les deux termes sont souvent confondus car la différence entre les deux est subtile et souvent débattue (Connell, 1985). Le recrutement ici discuté est différent du recrutement au sens halieutique qui correspond à l'entrée des juvéniles dans les stocks de pêche.

Résilience : La résilience correspond à la quantité de perturbation à laquelle un écosystème ou une population peut résister sans basculer dans un autre état, c'est-à-dire sans changer sa structure ou son organisation (Gunderson, 2000)

Organisme Génétiquement Modifié (OGM) : Il s'agit d'un organisme dont une ou plusieurs caractéristiques ont été modifiées par ingénierie génétique, ce qui contraste avec les techniques classiques de sélection par croisement naturel (Redford et al., 2019).

INTRODUCTION GENERALE



1. Déclin des espèces et génétique de la conservation

La biologie de la conservation est la science qui étudie la biodiversité, aux niveaux génétique, spécifique et écosystémique ainsi que les dynamiques d'extinctions dans le but de les enrayer (Delord, 2010). Elle émerge du constat fait par les naturalistes de l'accélération de l'érosion de la biodiversité. Les scientifiques sont conscients et alertent depuis de nombreuses années sur la nécessité de préserver la nature et dès 1911, Alfred Russel Wallace soutient déjà que le déclin des espèces est causé principalement par les activités anthropiques. Cependant, ce n'est qu'à partir des années 60-70 que l'idée d'une science à la fois synthétique, holiste et multidisciplinaire se développe (Soulé, 1985). En 1978, Michael Soulé organise la première conférence internationale de biologie de la conservation où il propose une nouvelle approche pour sauver les formes de vie des extinctions induites par les activités humaines et définit ainsi les fondements de cette nouvelle discipline. Il s'agit d'une discipline de crise dont la principale mission est de juger de l'état de la nature et de réfléchir aux solutions à mettre en œuvre pour remédier à cette situation et préserver les espèces et la biodiversité en général (Soulé, 1985). De nombreux travaux et des revues spécialisées, telles que *Biological Conservation*, vont voir le jour de façon à développer ses propres théories de façon à ce que la biologie de la conservation devienne une discipline scientifique à part entière.

Malgré cette prise de conscience et l'essor de la biologie de la conservation, les pressions subies par la biodiversité ne cessent de s'intensifier. Les paléontologues définissent une extinction de masse lorsque la Terre voit disparaître les trois quarts des espèces qui la colonisent, sur une courte période à l'échelle des temps géologiques (Barnosky et al., 2011; Twitchett, 2006). Au cours de l'histoire de la Terre, cinq extinctions massives ont eu lieu, dont la dernière a causé l'extinction de la plupart des dinosaures à la fin du Crétacé, il y a environ 66 millions d'années (Jablonski, 1989). Ces extinctions ont été déclenchées par des événements catastrophiques telles que des collisions d'astéroïdes, de fortes activités volcaniques, des changements brusques de températures et de climat, etc. Aujourd'hui, le taux d'extinction serait 100 à 1000 fois supérieur à celui du passé, avant l'apparition de l'homme et son développement industriel, et touche, de façon imprévisible, une multitude de groupes taxonomiques et d'habitats différents (Ceballos et al., 2017; Dirzo and Raven, 2003; Jablonski, 1989). Beaucoup de scientifiques suggèrent donc qu'une sixième extinction

de masse est en cours (Barnosky et al., 2011; Cafaro, 2015; Wake and Vredenburg, 2008), principalement induite par les activités anthropiques, de façon directe, par la réduction des habitats, la surexploitation, la pollution, l'introduction d'espèces invasives, la propagation de pathogènes, etc., ou indirecte à travers le changement climatique (Baillie et al., 2004; Ceballos et al., 2015; Hoffmann et al., 2010; Pievani, 2014). L'extinction d'une espèce n'est généralement pas immédiate et se traduit par le déclin progressif de ses populations conduisant à la perte de diversité génétique (Ceballos et al., 2017).

Dans ce contexte, la génétique des populations s'est révélée être un puissant outil pour aider à l'évaluation de l'état de santé des espèces et à la mise en place de stratégie de conservation adaptée (Desalle and Amato, 2017, 2004; Lande, 1988; Ouborg, 2010). La diversité génétique peut s'apparenter à un proxy du niveau de risque d'extinction pour une espèce. Une diversité génétique élevée permet la pérennité des écosystèmes car elle détermine la résilience et la capacité d'une population à s'adapter en cas de perturbations ou de changements environnementaux (Ehlers et al., 2008; Hughes et al., 2008; Hughes and Stachowicz, 2004). Bien qu'en milieu naturel, l'ensemble des rôles et fonctions de la diversité génétique ne soit pas encore connus, il a été démontré que le niveau de diversité génétique au sein d'une espèce pouvait avoir des conséquences écologiques aussi bien au niveau des populations que des communautés ou des écosystèmes (Hughes et al., 2008). Le maintien d'un fort taux de diversité génétique est donc l'un des principaux objectifs de la biologie de la conservation. Apporter des connaissances sur le niveau et la répartition de la diversité génétique au sein des populations d'une espèce donnée, ainsi que sur les processus qui permettent son maintien, est donc désormais crucial pour concevoir des stratégies de conservation (Baillie et al., 2004). Ainsi, la génétique de la conservation permet d'avoir une compréhension plus fiable et plus précise des processus qui impactent la stabilité des populations comme la pression de consanguinité qui tend à réduire la variabilité génétique (discuté dans Charlesworth and Willis, 2009), la structuration génétique d'une espèce qui permet de définir des unités de conservation (Ardren et al., 2011; Höglund et al., 2011; May et al., 2011), la taille efficace de population qui permet de maintenir un certain niveau de diversité génétique (Charlesworth, 2009; Gasca-pineda et al., 2013), etc. Plus généralement, la génétique des populations permet donc d'identifier les priorités de conservation qui sont nécessaires à la mise en place d'actions de management plus efficaces et plus immédiates (Desalle and Amato, 2004).

2. La vie dans un système fragmenté : importance de la connectivité et de la dispersion larvaire

Les systèmes marins côtiers sont généralement discontinus et constitués d'une mosaïque d'habitats et de paysages sous-marins différents, créant ainsi des distributions parfois très fragmentées chez les espèces qui les colonisent. Les organismes marins côtiers sont, pour la plupart, caractérisés par un mode de vie sédentaire ou par des capacités de mouvements réduites. Ainsi, la majorité des espèces marines côtières, des macroalgues aux invertébrés, en passant par certaines poissons, ont un cycle de vie divisé en deux grandes phases (Cowen and Sponaugle, 2009; Young, 1990). La phase de vie adulte est généralement consignée à un espace de vie réduit et les organismes sont peu mobiles, voire fixés, limitant ainsi leur capacité de fuite en cas de perturbation de l'habitat. Au contraire, les jeunes stades de vie comprennent généralement une phase larvaire pélagique qui permet la *dispersion larvaire*, c'est-à-dire, le mouvement des larves depuis leur lieu de naissance vers leur lieu de *recrutement*, où l'organisme vivra sa vie d'adulte (Selkoe et al., 2006). Cette phase représente la principale opportunité de mouvement car l'organisme pourra être transporté au gré des courants sur de grandes distances et détermine donc le niveau de *connectivité* entre les populations (Warner and Cowen, 2002). Les espèces marines côtières sont donc généralement structurées en *métapopulations* (Hanski, 1998; Levins, 1970, 1969) formant ainsi un réseau de populations locales constituées d'adultes sédentaires colonisant des parcelles d'habitat qui sont connectées uniquement par les migrations lors de la phase larvaire pélagique (**Figure 1**; Cowen and Sponaugle, 2009; Hastings and Botsford, 2006; Kritzer and Sale, 2004).

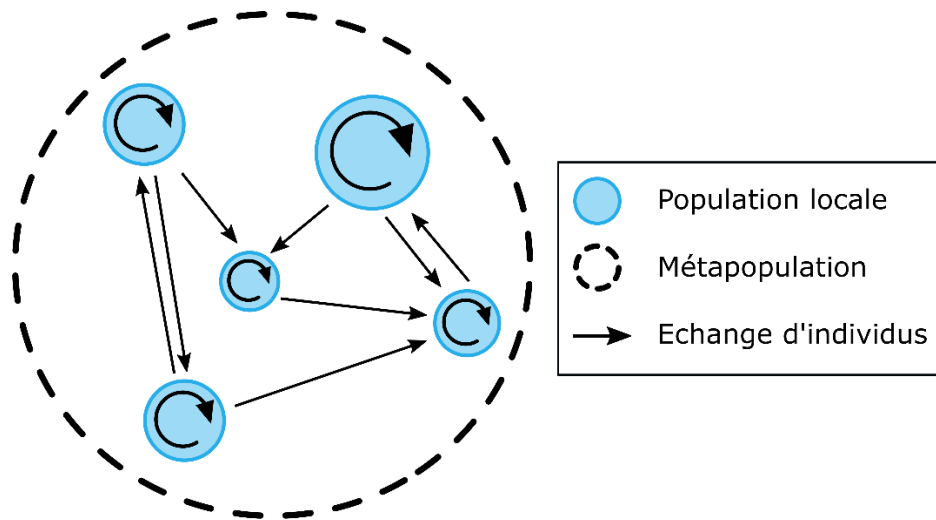


Figure 1 : Schéma représentant le concept de métapopulation. La métapopulation est constituée d'un ensemble de populations locales qui ont chacune leur propre dynamique et qui échangent des individus via la dispersion larvaire.

La connectivité, c'est-à-dire la mesure dans laquelle des populations, des communautés, des écosystèmes ou des habitats spatialement distincts sont liés par des échanges de gènes via la dispersion larvaire est un processus écologique fondamental, en particulier dans les systèmes fragmentés (Balbar and Metaxas, 2019; Cowen and Sponaugle, 2009; Ronce, 2007; Saunders et al., 2016). Le degré de connectivité entre populations a un impact direct sur la survie locale au travers des processus de repeuplement (Saenz-Agudelo et al., 2011), permet le maintien d'un haut niveau de diversité génétique (Almany et al., 2009), contrôle la distribution et l'abondance locale des espèces (Lowe and Allendorf, 2010; Strathmann et al., 2002) et détermine donc leur persistance et leur résilience en cas de perturbation locale (Cowen and Sponaugle, 2009; Selkoe et al., 2006). Sur le long terme, la connectivité et les patrons de dispersion impactent également la structure génétique des populations (Weersing and Toonen, 2009) avec des effets qui peuvent être à la fois positifs, avec, par exemple, la réduction des effets de la dérive génétique ou de la consanguinité, mais également négatifs en limitant l'adaptation locale (i.e. la sélection locale des allèles les mieux adaptés) (Marko and Hart, 2018).

Cependant, l'étude de la dispersion larvaire reste un des grands défis de l'écologie marine pour comprendre les dynamiques de populations. A cause de leur petite taille et de leur fort taux de mortalité, les larves sont quasiment impossibles à suivre. De plus, du fait de leur faible capacité natatoire, les larves étaient généralement considérées comme des particules

passives pouvant être emportées sur de grandes distances par les courants marins. L'étude de la dispersion larvaire a donc plutôt été appréhendée via des modèles et des simulations hydrodynamiques (décrites dans Swearer et al., 2019), ou via des études de la microchimie de l'otolithe chez les poissons (Elsdon et al., 2008) mais rarement par des mesures directes. Ces études ont contribué à la conception d'un paradigme dans lequel les milieux marins sont des systèmes très ouverts et où les flux de gènes y sont très importants, créant peu de différenciation entre les populations (Selkoe et al., 2006). La distance de dispersion d'une espèce était donc, pendant longtemps, considérée comme proportionnelle à la durée de sa phase larvaire. Grâce aux nouvelles technologies d'analyses moléculaires, il est désormais possible d'estimer de façon directe le niveau de connectivité et les patrons de dispersion larvaire (Manel et al., 2003; Marko and Hart, 2018). De nombreuses études ont démontré que de grandes proportions de larves ne dispersaient pas mais recrutaient à proximité de leur lieu de naissance (Almany et al., 2007; Carreras-Carbonell et al., 2007; Christie et al., 2010; Díaz-Viloria et al., 2013; Dubé et al., 2020; Jones et al., 2005; Puckett et al., 2014; Salles et al., 2015; Swearer et al., 2002). De plus en plus d'études mettent en évidence des structures génétiques à plus petite échelle, démontrant donc que les populations marines ne sont pas si ouvertes que ça (Cowen and Sponaugle, 2009) et que, malgré leurs faibles capacités natatoires, les larves sont capables d'adapter leur comportement et d'influencer leur distance de dispersion. Ainsi, North et al. (2008) et Gary et al. (2020) ont montré qu'en variant uniquement la profondeur de flottaison en fonction des courants, les larves pouvaient significativement réduire leur distance de dispersion. Il a également été montré que, sous certaines conditions, elles pouvaient être maintenues en petits groupes agrégés dans la colonne d'eau, pendant plusieurs jours, voire semaines (Natunewicz et al., 2001). De cette façon, des larves provenant de la même population et du même épisode de reproduction peuvent se retrouver agrégées dans la colonne d'eau et disperser ensembles formant ainsi des nuages de larves apparentées faisant parties de la même fratrie. A ce moment-là, la redistribution des larves dans les populations n'est pas aléatoire et peut créer de la structuration génétique à petite échelle par des effets de famille (Iacchei et al., 2013; Ledoux et al., 2010; Morales-González et al., 2019; Selkoe et al., 2006; Veliz et al., 2006). Cet effet peut également être exacerbé par la sélection par l'environnement et par les fortes variations de succès reproducteur (i.e. le nombre de descendants fourni à la génération suivante par un individu) entre les adultes au sein d'une population (Eckert, 2003). Le succès

reproducteur dépend d'un grand nombre de paramètres (correspondance entre la reproduction et les conditions océanographiques, fécondation, développement larvaire, recrutement, prédation, etc.) et les chances de « matcher » avec tous ces paramètres s'apparentent à celles d'un tirage au sort (Hedgercock et al., 2007; Hedgercock and Pudovkin, 2011). Les « gagnants » de ce tirage au sort représentent une faible proportion des reproducteurs potentiels et la taille efficace de la nouvelle cohorte est bien plus petite que la taille totale de la population parentale (Selkoe et al., 2006), créant ainsi des différenciations génétiques à petite échelle.

Avoir une distance de dispersion faible, voire une proportion importante d'*auto-recrutement*, c'est-à-dire la proportion de larves qui recrutent dans la population où se trouvent leurs parents, peut présenter plusieurs bénéfices pour la population locale. La phase de dispersion larvaire est une phase critique où le taux de mortalité est particulièrement important (Ellien et al., 2004; Graham et al., 2008; Rumrill, 1990). Rester à proximité de la population parentale limite donc le risque lié à la dispersion sur de longues distances. De plus, pour les espèces vivant dans un milieu fragmenté et ayant une distribution discontinue, la probabilité de trouver un habitat favorable pour recruter est susceptible de diminuer lorsque les larves dispersent trop loin de la population parentale (Swearer et al., 2002). Cependant, chez le poisson clown, la survie est meilleure chez les individus immigrants que chez les auto-recrutants (Salles, 2016). Dans un contexte de fort auto-recrutement, une telle survie différentielle permet de favoriser les gènes venant d'autres populations et favorise donc les mélanges génétiques. Il est possible que les larves provenant de populations lointaines soient passées par plus d'épreuves lors de la phase larvaire et donc qu'elles soient plus compétitives. Les flux de gènes permettent donc de régénérer le potentiel d'adaptation des populations en maintenant une diversité génétique forte mais contrecarrent l'adaptation locale des populations en homogénéisant leur fond génétique (Salles, 2016). La connectivité et les patrons de dispersion larvaire sont donc des processus clés qui structurent les espèces et déterminent leur persistance et leur évolution. Comprendre les dynamiques de dispersion est donc crucial pour la mise en place des stratégies de conservation adaptées (Crooks and Sanjayan, 2010), particulièrement dans le contexte actuel où les habitats sont de plus en plus fragmentés (Airoldi and Beck, 2007) et où l'isolement des populations peut conduire à leur extinction locale (Harrison, 1991).

Ainsi, bien que les échelles spatiales de dispersion larvaire soient encore très discutées, elles semblent varier le long d'un continuum, avec des populations très fermées et des populations très connectées, et dépendent des caractéristiques de l'espèce, des conditions océanographiques du système et de l'échelle considérée (Mora and Sale, 2002). Cependant, cette information est essentielle car le degré de connectivité entre les différentes zones géographiques détermine les échelles de gestion pour la conservation (Planes et al., 2009).

3. Le modèle d'étude : la grande nacre de Méditerranée, *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758)

3.1. Biologie et écologie

La grande nacre, *Pinna nobilis* (Figure 2), est une espèce emblématique et endémique de la mer Méditerranée. Il s'agit du plus grand coquillage de la mer Méditerranée et le deuxième dans le monde, après le bénitier, *Tridacna gigas* (Linnaeus, 1758), puisque sa coquille peut atteindre jusqu'à 1,2 m. Elle vit enfoncée verticalement, grâce à son byssus, jusqu'au tiers de sa hauteur dans les substrats meubles (vase, sable ou graviers) et est souvent associée aux herbiers de phanérogames (*Posidonia oceanica*, *Zostera marina*, *Zostera noltii* ou *Cymodocea nodosa*). L'espèce colonise généralement la zone subtidale, jusqu'à 30 m de profondeur, car au-delà, le développement de l'herbier est limité par la faible intensité lumineuse et la transparence de l'eau. Du fait de cette association, sa répartition est généralement discontinue et agrégative. Cette association n'est cependant pas obligatoire et des populations denses ont été observées sur des substrats vaseux dépourvus de végétation (Katsanevakis, 2006), dans les lagunes par exemple, ou dans des habitats plus dégradés comme les ports.



Figure 2 : Deux grandes nacres en bordure d'herbier de Posidonies © G. Iwankow

En tant qu'organisme suspensivore, *P. nobilis* joue un rôle écologique important en filtrant de grandes quantités de débris et de matière organique en suspension (Davenport et al.,

2011; Trigos et al., 2014a), participant ainsi au recyclage de la matière organique et au maintien de la clarté de l'eau. Même si son taux de filtration n'est pas connu, Strayer et al. (1999) estiment que certaines populations de bivalves sont capables de filtrer, chaque jour, la totalité de la colonne d'eau. Une population dense de grandes nacres peut participer à maintenir une bonne qualité de l'eau dans le milieu. De plus, la grande coquille des nacres est colonisée par une multitude d'organismes épibiontes car elle apporte un substrat dur dans des habitats majoritairement constitués de substrat meuble, ce qui contribue à augmenter, localement, la complexité de l'habitat et la biodiversité (Giacobbe, 2002; Rabaoui et al., 2009).

3. 2. Cycle de reproduction

Les grandes nacres de Méditerranée sont des organismes hermaphrodites successifs à maturation asynchrone (De Gaulejac, 1995). Les gonades mâles et femelles sont présentes chez un même individu, mais avec des stades de développement décalés, évitant ainsi l'autofécondation. La gamétogénèse a lieu de Mars à Juin et est suivie d'une succession d'émissions des gamètes et de gamétogénèses rapides de Juin à Août (De Gaulejac, 1995). Il est généralement admis que les grandes nacres ont un mode de reproduction avec une fécondation externe. Cependant, leur cycle de reproduction reste mal connu et certains auteurs ont observé des événements de fécondations internes avec les femelles qui maintenaient les œufs dans leur cavité palléale (Trigos et al., 2018). Après la fécondation, les œufs se transforment en larves trochophores, puis en larves véligères pélagiques (**Figure 3**). Chez *P. nobilis*, le stade larvaire durerait de 5 à 10 jours pendant lesquels les larves sont dispersées au gré des courants (Butler et al., 1993), cependant, peu de choses sont connues sur leur capacité de dispersion. Ainsi, une étude récente a montré que la phase larvaire pélagique pourrait être en fait de plus de 20 jours (Trigos et al., 2018). A la fin de la phase larvaire, la larve subit une métamorphose puis s'ancre dans le sol pour continuer sa croissance jusqu'à la phase adulte (IOPR, 2003). Les taux de recrutement sont très variables dans le temps et dans l'espace (González-Wangüemert et al., 2014), comme chez la plupart des mollusques bivalves, avec l'existence d'années exceptionnelles qui jouent un rôle clé dans la dynamique de l'espèce (Beukema et al., 2001; Miyawaki and Sekiguchi, 2000).

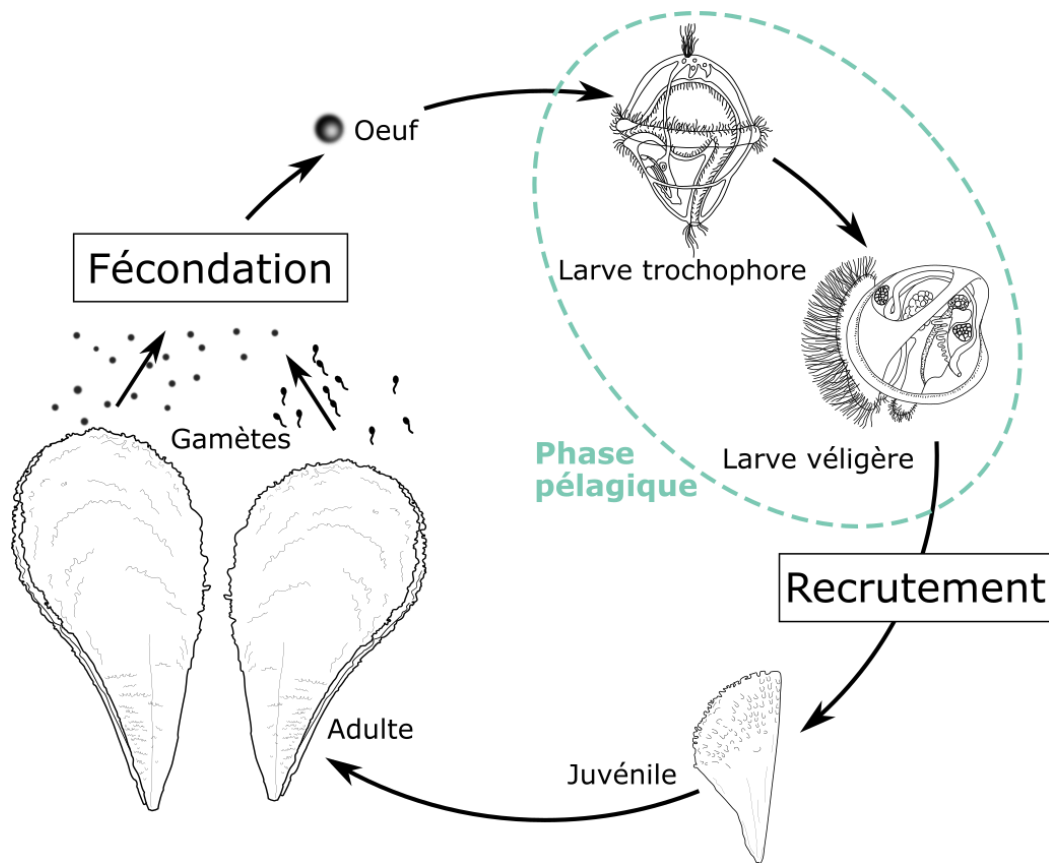


Figure 3 : Cycle de vie des grandes nacres. Au moment de la reproduction la fécondation est externe et donne un œuf qui se transforme en larve trochophore puis en larve véligère. Cette phase larvaire est pélagique et dure jusqu'au recrutement, quand l'individu s'installe dans un habitat où il va se sédentariser et grandir jusqu'à devenir adulte.

3. 3. Histoire démographique et structure génétique

Malgré son statut d'espèce protégée, peu d'études se sont intéressées à la génétique des populations de grandes nacres. Quelques travaux, basés sur des marqueurs mitochondriaux (COI et 16S) ou nucléaires (18S et 28S), ont été réalisés en Grèce (Katsares et al., 2008), en Tunisie (Rabaoui et al., 2011) et en Sardaigne, Corse et Italie, en incluant également les séquences des deux précédentes études (Sanna et al., 2014, 2013). Ces études ont toutes révélé une grande diversité d'haplotypes. Les auteurs mettent en évidence des phases d'expansion et de contraction des populations de grandes nacres, liées aux fluctuations du niveau de la mer au cours du Pléistocène et qui ont progressivement conduit à l'isolation de certains bassins Méditerranéens. Ils font également l'hypothèse d'une origine commune de toutes les populations, suivis d'une expansion vers l'Est, par le biais des courants marins (courant Algérien), et d'un ou plusieurs effets fondateurs conduisant à une diversité plus

faible et à des haplotypes privés dans les populations de Tunisie et de la mer Egée. Sur la base de leurs études génétiques, ils identifient trois grandes régions génétiquement différenciées : (1) l'Ouest de la mer Méditerranée et la mer Ionienne, (2) la mer Adriatique et (3) la mer Egée et les côtes tunisiennes.

Cependant, ces études utilisent des marqueurs dont la résolution ne permet pas d'étudier les dynamiques contemporaines de l'espèce. Seules deux études récentes ont évalué la connectivité entre les populations de grandes nacres en utilisant un set de 10 marqueurs microsatellites (González-Wangüemert et al., 2014). Ainsi, González-Wangüemert et al. (2019) et Wesselmann et al. (2018) ont étudié les patrons de dispersion larvaire, respectivement entre les populations des îles Baléares et entre la côte espagnole, les îles Baléares et Banyuls-sur-mer (France), en couplant des analyses génétiques et des modélisations de la courantologie. Ces deux études ont montré un fort niveau de connectivité entre les sites, influencée par les courants marins, avec des populations sources qui exportent beaucoup de larves et des populations puits qui sont maintenues essentiellement grâce aux apports de larves des populations voisines.

3. 4. Une espèce au bord de l'extinction

L'espèce a longtemps été exploitée, depuis l'antiquité jusqu'au XIXème siècle, pour la consommation, la fabrication de soie marine à partir de son byssus et de boutons ou de bijoux à partir de la nacre de sa coquille. Il paraîtrait même que la Toison d'Or de Jason aurait en fait été tissée à partir de byssus de grandes nacres. Il en est même fait mention dans le livre *Vingt mille lieues sous les mers* de Jules Verne où le Dr Pierre Aronnax évoque souvent ses vêtements de byssus et où il décrit « [...] *qu'ils étaient fabriqués avec les filaments lustrés et soyeux qui rattachent aux rochers les « jambonneaux, » sortes de coquilles très abondantes sur les rivages de la Méditerranée. Autrefois, on en faisait de belles étoffes, des bas, des gants, car ils étaient à la fois très moelleux et très chauds.* ».

Aujourd'hui encore, les pressions que subissent les populations sont très importantes notamment à cause des activités anthropiques (ancrage des bateaux, pollutions, réduction et fragmentation de son habitat). Toutes ces pressions ont contribué au déclin des populations de *P. nobilis* (Öndes et al., 2020). Pour pallier à ce déclin, des mesures de protection ont été mises en place et la Directive Européenne Habitat Faune-Flore n°92/43/CEE définit *P. nobilis* comme espèce animale d'intérêt communautaire depuis le 21

mai 1992. Ces mesures de protection se sont révélées efficaces puisqu'au cours des dernières décennies, l'espèce s'est pérennisée. De nouvelles populations denses ont également émergées dans des habitats parfois très anthropisés, comme les ports ou les lagunes, et se sont développées de façon surprenantes alors que l'espèce est considérée comme un bio-indicateur de la qualité des eaux côtières, donc sensible aux perturbations (IOPR, 2003).

Cependant, la grande nacre fait aujourd'hui face à une crise majeure qui menace sa survie car, depuis Octobre 2016, des mortalités de masse sont signalées sur ses populations. Ces mortalités sont attribuées à un protozoaire parasite, nouvellement décrit, *Haplosporidium pinnae* (Figure 4), qui touche principalement les glandes digestives de l'animal (Catanese et al., 2018). L'origine de ce parasite est inconnue mais il est probable qu'il s'agisse d'une espèce introduite accidentellement en Méditerranée, peut-être par des eaux de ballast. De plus, la faible variabilité génétique de ses séquences d'ADN ribosomiques, analysée lors des premières mortalités de masse en 2016, suggère une arrivée récente de l'espèce, ce qui est cohérent avec les évènements de mortalité de masse sans précédents depuis 2016 (Catanese et al., 2018).

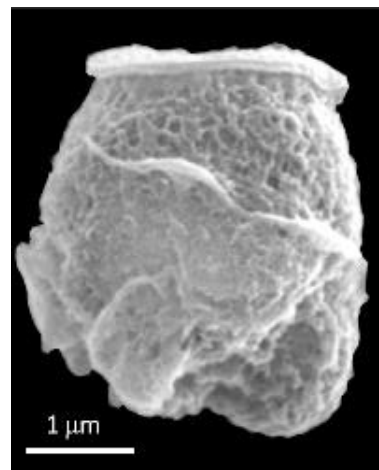


Figure 4: Micrographie électronique à balayage d'une spore du parasite *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al., 2018).

Même si l'implication de ce parasite n'est pas remise en question, les causes exactes de l'épidémie restent mal comprises. Ainsi, Scarpa et al. (2020) font l'hypothèse d'une maladie multifactorielle, avec un pathogène non spécifique, car il aurait été identifié chez des palourdes prélevées en 2014, donc bien avant les premiers évènements de mortalité de masse observés chez *P. nobilis*. D'autres études rapportent la présence d'une bactérie du genre *Mycobacterium* chez les individus morts au cours des épisodes de mortalité massive et l'identifient comme principal agent infectieux responsable de l'épidémie, notamment le long de la côte Tyrrhénienne, en Italie (Carella et al., 2019), ou de co-infection, avec les deux pathogènes, comme dans le Golfe de Thermaikos en Grèce (Lattos et al., 2020) ou en Croatie (Čižmek et al., 2020; Šarić et al., 2020). Au contraire, Catanese et al. (2018) et Grau et al. (2021) identifient *H. pinnae* comme étant l'unique pathogène responsable et nécessaire au déclenchement des épisodes de mortalités de masse.

Les premiers signes de mortalités ont été observés au Sud-Est de l'Espagne (Vázquez-Luis et al., 2017) et l'épidémie s'est désormais propagée à travers toute la Méditerranée, probablement *via* les courants marins (Cabanellas-Reboredo et al., 2019). Aujourd'hui, toutes les populations infectées ont été décimées (**Figure 5**). Il s'agit d'une situation sans précédent, que ce soit par le taux de mortalité particulièrement élevé (près de 100 %) ou la vitesse de propagation (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; García-March et al., 2020b; Scarpa et al., 2020), qui pourrait conduire à l'extinction de l'espèce. Pour faire face à cette situation, le statut de l'espèce a été réévalué et elle est désormais considérée comme « en danger critique d'extinction », ce qui correspond au plus haut niveau de menace sur la liste rouge de l'IUCN (Kersting et al., 2019).

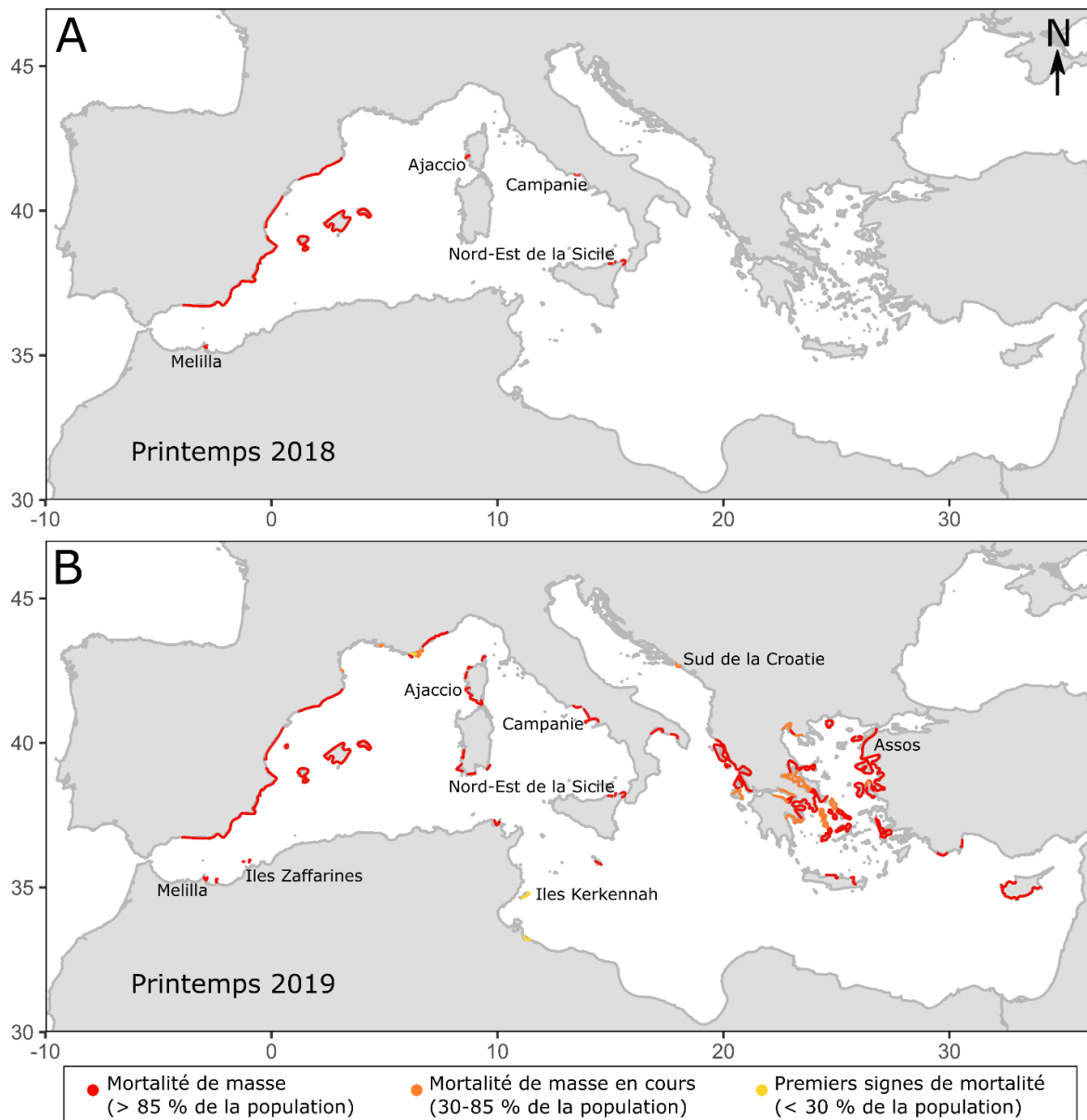


Figure 5 : Evolution de la mortalité causées par le parasite *Haplosporidium pinnae* sur les populations de grandes nacres à travers la mer Méditerranée au printemps 2018 (A) et au printemps 2019 (B). Alors que la mortalité était principalement restreinte au bassin Ouest en 2018, elle s'est propagée à travers toute la mer Méditerranée en 2019. D'après données IUCN.

Malgré cette situation alarmante, un espoir subsiste pour l'espèce car quelques populations semblent survivre et ne semblent pas, ou peu, affectées par le parasite, notamment dans les habitats lagunaires en Espagne dans la baie des Alfacs et à Mar Menor (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; Catanese et al., 2018). Même si les raisons de cette résistance sont mal connues, elles pourraient être liées aux conditions de salinités dans ces

milieux car la baie des Alfacs est soumise à de fortes entrées d'eau douce par la rivière Ebro qui diminuent fortement la salinité alors qu'au contraire, à Mar Menor, la salinité peut être très élevée et atteindre jusqu'à 42 – 46 (Pérez-Ruzafa et al., 2005). Ainsi, le parasite semble mal tolérer les salinités qui s'écartent trop de celles de la mer. Alors que l'espèce est au bord de l'extinction, ces milieux pourraient donc représenter des habitats refuges pour les grandes nacres et il est nécessaire d'acquérir des connaissances sur sa distribution et ses exigences écologiques afin d'envisager de mettre en place des stratégies de conservation et des plans de sauvegarde adaptés.

3. 5. Un modèle d'étude idéal

L'espèce est actuellement au bord de l'extinction et il y a un réel besoin d'apporter des connaissances sur le fonctionnement et la dynamique de l'espèce qui permettront de mettre en place des plans de sauvegarde efficaces. Cependant, en dehors de la nécessité d'apporter des connaissances pour sa conservation, les caractéristiques biologiques de l'espèce en font un modèle d'étude particulièrement intéressant et pratique pour les études scientifiques. Un bon modèle biologique doit permettre de réduire la complexité des situations naturelles. Les grandes nacres vivent dans des milieux peu profonds, donc relativement accessibles, et leur grande taille rend la détection des individus plus facile. Ses caractéristiques biologiques et son mode de vie sédentaire en fait un organisme de choix pour étudier les dynamiques de populations puisqu'il est possible d'identifier, de géo-référencer et d'échantillonner chaque individu, de façon non létale, afin de réaliser des suivis temporels à l'échelle individuelle. Sa distribution à la fois sur la côte et dans les milieux lagunaires en fait un organisme particulièrement intéressant pour étudier la connectivité mer-lagune, qui reste à ce jour peu documentée. De plus, son mode de vie typique des organismes côtiers ayant un cycle de vie en deux phases rend les résultats obtenus, au cours de cette thèse, généralisables aux espèces similaires.

4. Objectifs et contenu de la thèse

Malgré son statut d'espèce protégée, la grande nacre de Méditerranée reste mal connue. Dans le contexte actuel où l'espèce est touchée par une pandémie, il y a un réel besoin de comprendre le fonctionnement de l'espèce afin de mettre en place des stratégies de conservation adaptées. En se focalisant sur les populations de grandes nacres du littoral Occitan, l'objectif de cette thèse est d'apporter des connaissances à la fois sur la biologie et l'écologie de l'espèce mais aussi sur son fonctionnement et les processus qui permettent le maintien de ses populations. Ces connaissances permettront de définir des priorités de conservation, voire d'identifier de potentiels habitats refuges, qui seront indispensables pour la mise en place de plans de sauvegarde et pour envisager des possibilités de repeuplement. Pour répondre à cet objectif, la thèse a été découpée en 4 chapitres :

Chapitre 1 : Caractérisation de la distribution des populations de grandes nacres le long du littoral Occitan et description des habitats.

Avant d'envisager de mettre en place un plan de sauvegarde, il est nécessaire de connaître la distribution de l'espèce ainsi que les types d'habitat qu'elle colonise. Récemment, des populations denses ont été signalées dans les lagunes le long du littoral Occitan. Ces zones peuvent représenter de potentiels habitats refuges pour l'espèce car, en Espagne, ce sont les seuls milieux où les nacres ne semblent pas affectées par le parasite. L'objectif de ce premier chapitre est donc de mettre en évidence la distribution spatiale de l'espèce, en incluant les habitats lagunaires, et de caractériser chaque population identifiée en terme de densité, de structure de taille et de type d'habitat. Enfin, une estimation de la taille de chaque population et de la totalité du stock de grandes nacres présentes sur le littoral Occitan, avant les premiers signes de mortalité dans cette zone, a été réalisée. Les résultats de cette partie ont également été essentiels à la mise en place du plan d'échantillonnage nécessaire pour réaliser les analyses génétiques du chapitre 3.

Chapitre 2 : Développement et test de 26 nouveaux marqueurs microsatellites polymorphiques.

Peu d'études génétiques ont été réalisées sur les grandes nacres et la plupart sont basées sur des marqueurs mitochondriaux (COI et 16S) ou nucléaires (18S et 28S) mais leur résolution ne permet pas d'étudier les dynamiques contemporaines de l'espèce. Les

marqueurs microsatellites sont de petites séquences courtes, situées dans la partie non codante de l'ADN, très fréquentes et beaucoup plus polymorphes, permettant ainsi d'obtenir un génotype unique pour chaque individu. Jusqu'à présent, seuls 10 marqueurs microsatellites existaient, et plusieurs d'entre eux ont montré des défauts d'amplification (i.e. allèles nuls). Cette première partie est donc consacrée au développement et au test de 26 nouveaux marqueurs microsatellites qui serviront aux analyses génétiques réalisées dans les chapitres 3 et 4, ci-après décrits.

Chapitre 3 : Caractérisation de la structure génétique de l'espèce le long du littoral Occitan, en incluant les populations lagunaires.

L'étude réalisée dans le chapitre 1 a montré que près de 90 % des grandes nacres du littoral Occitan sont situées dans les lagunes, ce qui représente un espoir pour l'espèce puisque ces zones demeurent, jusqu'à présent, peu touchées par le parasite. Cependant, les lagunes sont des milieux qui peuvent être très instables, ce qui rend incertaine la pérennité des populations colonisant ces milieux. De plus, ces lagunes rendent la distribution de l'espèce particulièrement fragmentée, ce qui pourrait conduire à l'isolement des populations. En utilisant les nouveaux marqueurs génétiques développés dans le chapitre 2 et sur la base de la distribution spatiale mise en évidence dans le chapitre 1, l'objectif de cette troisième partie est d'apporter des connaissances sur le fonctionnement et les patrons de dispersion de l'espèce. La diversité génétique a donc été évaluée pour chacune des principales agrégations de grandes nacres et suivant les différents types d'habitat. La structure génétique des populations a également été estimée afin de déterminer si la fragmentation de l'habitat tend à créer des différenciations génétiques entre les populations à travers le littoral Occitan.

Chapitre 4 : Dynamique démographique, fonctionnement et stratégie de reproduction d'une population

L'étude réalisée dans le chapitre 3 a mis en évidence l'homogénéité génétique des grandes nacres sur le littoral Occitan, ce qui implique un certain niveau de connectivité entre les populations. En se focalisant sur la population de la baie de Peyrefite, l'objectif de cette quatrième partie est de déterminer la dynamique démographique et les processus de repeuplement de l'espèce. Un échantillonnage de la population a été réalisé au cours de 3 campagnes et, grâce à des analyses de parenté, les contributions de l'autorecrutement et

des apports de larves provenant de populations voisines au maintien de la population ont été estimées. Ces analyses ont également mis en évidence la structuration familiale au sein de la baie afin de mieux comprendre les stratégies de recrutement des larves et les variations de succès reproducteur.

CHAPITRE 1 :

CARACTERISATION DE LA DISTRIBUTION DES POPULATIONS DE GRANDES NACRES LE LONG DU LITTORAL OCCITAN ET DESCRIPTION DES HABITATS



1. Contexte

La grande nacre est généralement considérée comme une espèce côtière, inféodée aux herbiers de posidonies. Cependant, cette association n'est pas stricte car des populations denses ont été observées dans des habitats dépourvus de végétation, par exemple dans le Golfe d'Oristano en Sardaigne (Addis et al., 2009) et dans le lac de Vouliagmeni en Grèce (Katsanevakis, 2006). Récemment des populations de grandes nacres ont été signalées dans les lagunes le long de la côte occitane.

En Espagne, les suivis des mortalités, réalisés sur l'ensemble de la côte, semblent montrer que les populations lagunaires sont peu affectées par le parasite, notamment dans la baie des Alfacs et à Mar Menor (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; Catanese et al., 2018). Le littoral occitan pourrait donc représenter une opportunité particulière pour la conservation de l'espèce car il est constitué d'un nombre particulièrement élevé de lagunes (Mouillot et al., 2005) qui pourraient servir d'habitat refuge à l'espèce. Alors que la quasi-totalité des populations situées en mer, sur la côte occitane, ont été décimées par le parasite entre 2018 et 2019, les populations dans les lagunes semblent peu affectées. Cependant, la distribution spatiale et la taille des populations n'avait jamais été évaluée auparavant. Avant de mettre en place des mesures de conservation, il est indispensable d'avoir des connaissances de base sur la distribution, les exigences écologiques de l'espèce et la taille de ses populations.

Ce premier chapitre contribue à l'amélioration des connaissances sur la distribution spatiale des populations de grandes nacres sur le littoral occitan, en incluant les habitats lagunaires, avant les premiers signes de mortalité due à la pandémie, et détermine les types d'habitats colonisés par l'espèce. Sur la base des densités calculées grâce à des données de terrains, nous avons également réalisé une estimation de la taille de chacune des populations afin d'évaluer le stock de grandes nacres présentes sur le littoral. Les résultats de ce chapitre serviront de base pour identifier les principaux sites d'échantillonnage pour réaliser les analyses génétiques du chapitre 3.

2. Publication associée

Les résultats de ce chapitre font l'objet d'une publication soumise dans la revue *Endangered Species Research*.

Peyran, C., Morage, T., Nebot-Colomer, E., Iwankow, G., Planes, S., 2021 On the brink of extinction: unexpected residual habitats raise hope for the survival of the fan mussel, *Pinna nobilis*, along the Occitan coast (north-western Mediterranean Sea). Submitted.

On the brink of extinction: unexpected residual habitats raise hope for the survival of the fan mussel, *Pinna nobilis*, along the Occitan coast (north-western Mediterranean Sea).

Claire Peyran¹, Titouan Morage¹, Elisabet Nebot-Colomer^{1,3}, Guillaume Iwankow¹, Serge Planes^{1,2}

¹ PSL Research University: EPHE - UPVD - CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

² Laboratoire d'Excellence « CORAIL »,

³ Instituto Español de Oceanografía (IEO). Centro Oceanográfico de Baleares. Muelle de Poniente s/n, 6 07015. Palma de Mallorca, Spain

Corresponding author: claire.peyran@gmail.com

Author contributions

S.P. designed the study, T.M., E.N.C., G.I. and C.P. performed the fieldwork, C.P. did data analyses and drafted the paper, C.P. and S.P. contributed to data interpretation and reviewed the paper.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This research was funded by the Occitanie Region, the General Council of Pyrénées-Orientales and the French Ministry for Ecological Transition. C. Peyran was supported by a PhD scholarship granted by Sorbonne University. We are grateful for the support of the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) Occitanie and all of the ports involved in the study: the ports of Sète, Port-la-Nouvelle, Port-

Vendres and Frontignan. We also thank the staff from the Cerbère-Banyuls Natural Marine Reserve and the Agathoise Coast Marine Protected Area for their collaboration and permission to work within their protected areas.

3. Abstract

In 2019, the status of the Mediterranean fan mussel was elevated to “critically endangered” on the IUCN red list, in response to the ongoing pandemic caused by the parasite *H. pinnae*, which has decimated their population. Identifying habitats which could serve as refuges, free from the parasite, are critical to the survival of this species. In this framework, the distribution of *P. nobilis* was investigated along the Occitan coast because of the presence of a unique lagoonal system that may provide a potential refuge. Interviews with users and managers were conducted to identify target zones where the species was previously sighted. Next, *in situ* surveys were conducted to define the main aggregations of fan mussels and to characterize the habitat. Line transects were conducted to count and measure individuals to estimate density, abundance and size distribution. Population densities were variable, ranging from 0.63 ± 0.34 to 70.83 ± 14.96 individuals/100 m² which represents one of the highest densities reported in the Mediterranean Sea. The total abundance of fan mussels across the coast was extrapolated to 163 000 individuals, with 87 % located in Thau and Salses-Leucate, highlighting that these habitats are essential for the survival of the species. This study also revealed the diversity of habitats colonized by the species. In the context of the pandemic, only the lagoon populations remain unaffected and provide natural refuges for the species that has disappeared from all open water coastal habitats. The largest remaining populations of *P. nobilis* were found in Thau and Salses-Leucate lagoons. These areas should be declared as a conservation priority, as lagoons could turn to unfavorable conditions, leading to the collapse of the last *P. nobilis* populations.

Keywords: Habitat use; Size distribution; Abundance estimation; Population density; Conservation

4. Introduction

The fan mussel, *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758), is an endemic bivalve of the Mediterranean Sea which lives half-buried in soft-bottom substratum, generally associated with seagrass meadows (*Posidonia oceanica*, *Zostera marina*, *Zostera noltii* or *Cymodocea nodosa*). The species usually colonizes the subtidal area, up to 30 meters deep, as beyond this depth the meadow's development is limited by light and water transparency. Because of this association, the distribution of *P. nobilis* populations is usually aggregative and patchy. However, while this association is widely accepted, dense populations can also be found in muddy bottoms such as in lagoons (Katsanevakis, 2006) or even in degraded habitats such as harbors.

As a filter feeder, *P. nobilis* serves an important ecological role by removing large amounts of detritus and organic matter (Basso et al., 2015b), and thus helps to maintain the clarity of the water column and increases the rate at which organic matter is recycled (Trigos et al., 2014b). While its filtration rate is unknown, Strayer et al. (1999) estimated that some bivalve populations are able to filter 100 % of the entire water column per day. As *P. nobilis* are large bivalves, some with a total shell length of more than a meter, a dense population could have an important role in maintaining the quality of the environment. The large shells of *P. nobilis* are also colonized by a widely diverse epibiotic community, as they provide a hard substratum in soft-bottom areas which contribute to an increase in habitat complexity and local biodiversity (Giacobbe, 2002; Rabaoui et al., 2009).

From the Antiquity until the 19th century, *P. nobilis* was regularly exploited for several uses. The byssus was used as sea silk for the fabrication of luxury clothing and the nacre of the shell was used to make buttons and jewelry. Today, while no longer directly exploited, *P. nobilis* populations are still under high pressure, mainly due to human activities (anchoring, pollution, habitat reduction and fragmentation) which have led to the decline of the species (Öndes et al., 2020). As a consequence, since 1992, the fan mussel has been under strict protection, according to the European Council Directive 92/43/EEC (Annex IV), and several countries around the Mediterranean Sea have implemented national conservation plans.

Today, the species is facing a major ongoing crisis that threatens its survival. Since October 2016, mass mortalities have been observed for fan mussel populations, caused by the protozoan parasite newly described as *Haplosporidium pinnae*. First signs of the epidemic

were observed in southeast Spain (Vázquez-Luis et al., 2017) and it has now spread throughout the entire Mediterranean Sea (García-March et al., 2020b). To date, most of the infected populations have been devastated. This is an unprecedented disappearance of a marine species for which neither the mortality rates (around 100 %) nor the speed of propagation have ever been recorded (Cabanellas-Reboredo et al. 2019). This epidemic could, thus, lead to the extinction of the species since its distribution is restricted to the Mediterranean Sea. In response to this critical situation, the status of the species was reevaluated and was updated to “critically endangered” in the IUCN red list (Kersting et al., 2019). However, there are a few populations in the infected area that are still in good condition and remain less affected by the parasite (Alfacs Bay and Mar Menor, Spain).

Despite being a highly emblematic species and the urgent need for conservation, the ecology and biology of *P. nobilis* remain poorly documented. It is thus necessary to collect baseline knowledge about stock and natural distribution of the species such as the distribution and location of main populations, in order to implement effective protection strategies.

The Occitan coast, located in the northwestern part of the Mediterranean Sea, in the Gulf of Lion, is formed by a mosaic of different landscapes including rocky and sandy coasts and about 40 000 hectares of wetland, allowing the development of a high biodiversity. Further, while on average, lagoons make up 13% of coastlines around the world, they represent almost 50 % of the coastline of the Gulf of Lion (Mouillot et al 2005) and they may be considered as priority areas for *P. nobilis* conservation as lagoons are the only habitat where live populations of *P. nobilis* remain along the Spanish coastline. Recently, observations of fan mussels were noticed in Occitan’s lagoons. However, the distribution of populations of *P. nobilis* has never been fully investigated along the Occitan coast and within the many different habitat types found in the area. The main objectives of the present study were to (i) investigate the spatial distribution of the species, (ii) characterize the aggregations of fan mussels in terms of density, size structure and type of habitat, and, (iii) provide an estimate for the total number of fan mussels across the Occitan coast.

5. Materials and methods

5.1. Study area

The study was conducted in the Gulf of Lion, from the Spanish border to the Rhône delta, within the area defined as the Occitan coastline, including ports and lagoons (**Figure 6**). Based on a preliminary literature review and interviews of local users and managers, the study focused on the localities described in **Table 1** that were identified as places that *P. nobilis* was most likely to colonize. Three lagoons, with different morphological and physico-chemical characteristics, were selected. Salses-Leucate and Thau lagoons are among the largest lagoons in the Gulf of Lion and are respectively almost 2 and 4 m deep on average. Their water conditions are similar to seawater as they are highly connected to the sea through two channels (Grau des Pisses-Saumes in the South, Grau des Quilles in the center) and a port (Port de Sète in the North) in Thau, and through two channels that both cross a port in Salses-Leucate (Grau de Leucate with Port Leucate in the North and Grau de Saint-Ange with Port Barcarès in the South). Ayrolle is a much smaller lagoon with a very restricted influx of fresh water and an average depth of 0.75 m, but with a strong connection to the sea through a deeper channel. Almost the entire surface of the lagoon is covered by *Z. noltii*. Two localities, open to the sea, were included (Côte Rocheuse and Cap d'Agde). The Côte Rocheuse is characterized by small beaches and bays that alternate along a rocky coast. The type of substrate varies depending on the site but was mostly composed of sand, rocks or mat and all selected areas were covered by *P. oceanica*. All data from the Côte Rocheuse's were extracted from a previous study detailed in Iwankow (2015). In Cap d'Agde, the area was not homogeneous and one site (Brescou) was covered by a meadow and the other (Pinnasouk) was overrun by an invasive alga, *Caulerpa racemosa*. *P. nobilis* aggregations were also observed in small harbors (Frontignan, Port Ambonne), and thus these localities were also added to the study.

5.2. Prospection and exploration of the field

The main goal of the study was to characterize the distribution of *P. nobilis* aggregations along the Occitan coastline, within the context of the ongoing mass mortality, in order to define priority conservation zones. Since the study zone was very large (about 220 km of coastline), it was not possible to explore all of the area on SCUBA. To reduce the size of the search area, interviews with local users, both professional (fishermen, managers of ports or

marine protected areas), and recreational (divers, kite surfers, etc.) along the coastline were conducted, and coupled to the information of several unpublished documents such as management documents, impact studies or environmental surveys to identify target locations where the species had previously been reported.

Then, *in situ* visual searches were performed by random dives in the previously identified zones to verify outcomes of the interviews and finally, to find the areas colonized by *P. nobilis* and those where the species is totally absent. This step also allowed for the different types of habitat colonized by *P. nobilis* to be identified in order to pinpoint areas with similar characteristics that were not initially mentioned in the interviews.

In each area where fan mussels were observed, a zonation was defined according to the homogeneity of the habitat, based on aerial photos. Each zone was considered constant and homogeneous and was described by recording the following parameters: depth, type of substrate (coarse sand, fine sand or mud) and the presence/absence of sea-grass or/and algae with the identification of the species in case of presence. These areas were then considered as potential habitats for *P. nobilis* and targeted for a detailed screening by SCUBA diving.

5. 3. Estimation of density and population size in each locality

The density measurements were performed over a one-year period, between spring 2018 and spring 2019, where all previously described areas were surveyed in detail. Transect lines of 60 m long were randomly deployed within each targeted area of potential habitat and all individuals within 1 or 2 m from each side of the line were counted and measured (see section below), thus covering 120 or 240 m² depending on the water transparency. The number of transect lines varied depending on the size of the prospected zone, as the objective was to cover a minimum of 1 % of the surface of the potential habitat in each site. The mean density was expressed as the number of specimens/100 m² for each site and the population size (total abundance) was estimated by relating the mean density to the total surface of potential habitat at a given site.

5. 4. Size estimation

As fan mussels live half-buried in the sediment, it is not possible to directly measure the total length of the shell and as such, shell length was estimated following the same method

as described in Peyran et al. (2021). The maximum width, the minimum width and the unburied length were all measured as in García-March et al. (2002). The equation developed by De Gaulejac 1993 and detailed in Peyran et al. (2021a), was then used to estimate the total length.

The size of individuals was used to estimate their stage related to sexual maturity (i.e. separating immature juveniles from adults) following the methods described by Iwankow (2015) where growth models from different study sites were averaged and the different life stages of *P. nobilis* were deducted from this mean model. Sexual maturity coincides with a slow-down in growth, which happens when individuals reach about 24.5 cm in length. We used this value as a threshold and individuals below were considered as juveniles, and above, as adults. Then, Kersting and García-March (2017) showed that average recruit size ranged from 0.95 ± 0.49 cm to 4.15 ± 1.73 cm, thus individuals smaller than 6 cm (rarely observed as they are difficult to find in seagrass and algal beds) were considered as new recruits of the year.

5. 5. Statistical analysis

To look for similarities between sampled sites, a Factor Analysis of Mixed Data (FAMD) was carried out by using the FactoMineR package (Lê et al., 2008) implemented in R software. All parameters measured within sampled sites were used as active data, including the type of habitat (lagoon, open sea, port), mean depth, type of substrate (mud, sand, rock, shell sand, etc), presence or absence of vegetation, its cover (dense, exposed, scattered) and the species of vegetation present, density of fan mussels and their mean size. All of the data used are listed in table S1. Mean densities of fan mussels were also compared depending on the type of habitat (lagoon, open sea or port) and the presence or absence of vegetation using a non-parametric Kruskal-Wallis' test, after testing the heterogeneity of variances with Levene's test.

6. Results

6. 1. Surface of potential habitat

The surface of potential habitat which hosts fan mussels within a given locality varied among sites and the proportion ranged from 0.01 % in Cap d'Agde to 16.4 % in Frontignan

(Table 1). In Salses-Leucate and Thau lagoons, which are the two areas with largest abundances of *P. nobilis* individuals, the percentage of potential habitat was 1.1 % and 4.9 %, respectively, of the total lagoon area. In Salses-Leucate, almost all of the periphery was explored, except for some areas where diving was not possible because of the presence of oyster farms (Figure 6). However, the species was absent from all of the western prospected zones and the main aggregations were found nearby the channels connecting the lagoon to the sea (Grau de Leucate in the North and Grau de Saint Ange in the South). In Thau, the situation was similar to Salses-Leucate where all of the periphery of the lagoon was explored, and where the distribution of fan mussels was very heterogeneous as most of the individuals were found close to a connection with the sea (Grau des Quilles in the North, Grau des Pisses-Saumes in the south and the harbor at Port de Sète). *P. nobilis* was absent from most of the western part, except at Mèze where few individuals were observed. In the Ayrolle lagoon, most of the individuals were found in the channel connecting the lagoon to the sea, as all other areas of the lagoon were too shallow and likely dry during certain periods of the year. In Cap d'Agde, fan mussels were located in two main areas: Brescou, located next to a small island and Pinnasouk, a small isolated area in front of the entrance to the port. In Port Ambonne, individuals were observed in all un-dredged parts of the harbor. In Fontignan, individuals were mostly located in the channel connecting the port to the sea.

Table 1 : Characteristics of sampled sites: type of habitat, surface of potential habitat, percentage of potential habitat within the locality, number of transects prospected, mean depth of individuals within a site, type of substrate, vegetation if present, density and estimated abundance calculated for each site with confidence interval at 95 % in the Gulf of Lion

Locality	Site	Type of habitat	Surface of potential habitat (m ²)	Percentage of potential habitat	Number of transects	Mean depth (m)	Type of substrate	Vegetation	Density (individuals/100 m ²)	Estimated abundance
Côte Rocheuse	Cerbère	Open Sea	19 000	0.2 %	6	8.5	Rock + Meadow	<i>P. oceanica</i>	2.5 ± 1.82	482 ± 320
	Aloès	Open Sea	25 000	0.2 %	7	6.2	Sand + Meadow	<i>P. oceanica</i>	15 ± 5.84	3 706 ± 1 337
	Peyrefite	Open Sea	16 000	0.14 %	6	4.7	Sand + Meadow + Matte	<i>P. oceanica</i>	3.83 ± 1.70	632 ± 256
	Pin parasol	Open Sea	12 000	0.1 %	6	14.5	Sand + Meadow	<i>P. oceanica</i>	1.67 ± 2.12	197 ± 229
	Banyuls	Open Sea	5 000	0.05 %	6	5.0	Sand + Meadow + Matte	<i>P. oceanica</i>	4.33 ± 1.72	233 ± 85
	Fourrat	Open Sea	22 000	0.2 %	6	8.3	Rock + Meadow + Matte	<i>P. oceanica</i>	1.83 ± 1.02	401 ± 205
	Oli	Open Sea	2 000	0.02 %	6	5.7	Rock + Sand + Meadow	<i>P. oceanica</i>	1 ± 0.55	23 ± 11
	Le Racou	Open Sea	124 000	1.1 %	6	7.5	Sand + Meadow	<i>P. oceanica</i>	9.33 ± 5.25	11 605 ± 5 958
	<i>Total</i>	-	225 000	1.9 %	49	7.5	-	-	-	17 279 ± 8 401
Salses-Leucate	Lido port Leucate	Port	35 000	0.06 %	6	0.7	Mud + Meadow	<i>Z. noltii</i>	70.83 ± 14.96	24 792 ± 4 778
	Leucate Centre	Lagoon	6 000	0.01 %	8	1.1	Mud + Meadow	<i>Z. marina</i>	1.98 ± 2.74	119 ± 154
	Leucate Nord	Lagoon	400 000	0.7 %	17	0.9	Fine sand + Meadow	<i>Z. noltii</i> + <i>R. cirrhosa</i>	7.72 ± 4.16	30 882 ± 16 133
	Leucate Sud	Lagoon	170 000	0.3 %	14	1.7	Fine sand + Meadow	<i>Z. marina</i>	14.52 ± 9.92	24 690 ± 16 258
		<i>Total</i>	-	611 000	1.1 %	45	1.1	-	-	-
Ayrolle	Ayrolle	Lagoon	448 209	3.4 %	12	0.9	Shell mud + Meadow	<i>Z. noltii</i>	0.63 ± 0.34	2 801 ± 1 460
Cap d'Agde	Brescou	Open Sea	6 500	0.01 %	3	4.2	Sand + Matte	-	1.94 ± 1.67	126 ± 88
	Pinnasouk	Open Sea	2 000	0.003 %	2	3.9	Sand + Algae	<i>C. racemosa</i>	9.17 ± 1.15	183 ± 16
		<i>Total</i>	-	8 500	0.01 %	5	4.1	-	-	-
Port Ambonne	Port Ambonne	Port	8 500	13.1 %	13	2.1	Shell mud	-	1.22 ± 1.11	104 ± 90
	Port de Sète	Port	20 000	0.03 %	3	5.9	Shell sand	-	4.03 ± 9.67	806 ± 1 579
	Eaux Blanches	Lagoon	500 000	0.7 %	6	1.9	Mud + Meadow	<i>Z. marina</i>	2.64 ± 1.42	13 194 ± 6 471
	Grau des Quilles	Lagoon	25 000	0.03 %	5	2.2	Sand + Meadow	<i>Z. noltii</i>	10.17 ± 14.17	2 542 ± 3 169
Thau	Lido	Lagoon	3 174 605	4.2 %	25	1.9	Coarse sand + Meadow	<i>Z. noltii</i>	1.42 ± 1.05	44 974 ± 32 588
	Mèze	Lagoon	6 000	0.008 %	16	1.3	Shell sand + Meadow	<i>Z. noltii</i>	1.59 ± 1.29	95 ± 75
	Marseillan	Lagoon	5 000	0.007 %	2	2.9	Mud	-	7.29 ± 5.2	365 ± 184
		<i>Total</i>	-	3 730 605	4.9 %	57	2.7	-	-	-
Frontignan	Frontignan	Port	9 836	16.4 %	3	3.4	Shell mud	-	5.97 ± 1.76	587 ± 142

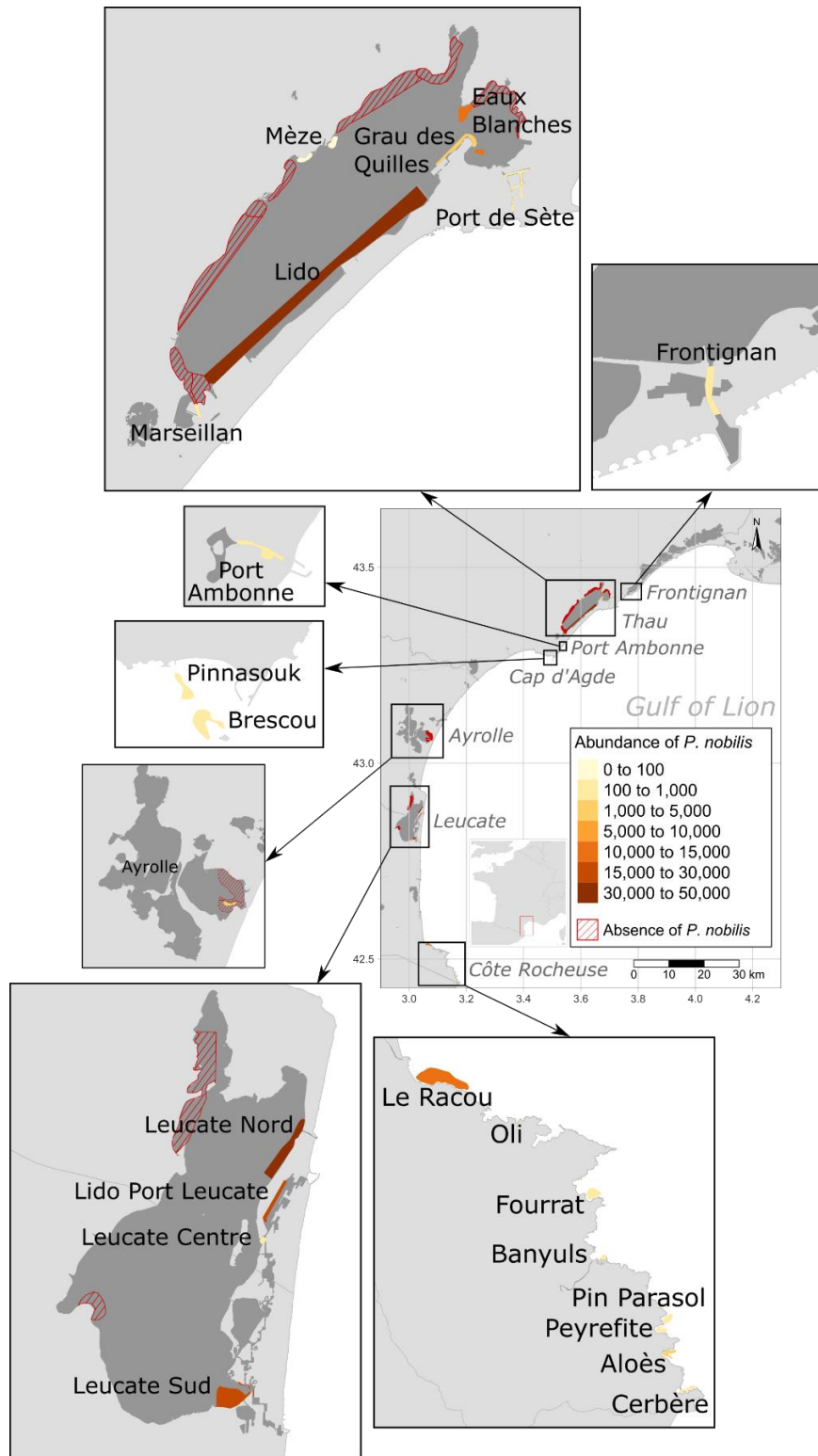


Figure 6 : Map of the study area showing all the prospected sites, the respective estimated abundances of fan mussels and the areas where the species was absent.

6. 2. Population density

A total of 1 852 living and 184 dead specimens (empty shells) were observed over 161 transect lines covering a surface of 30 280 m². Population density was highly variable depending on the sampled site, ranging from 0.63 ± 0.34 individuals/100 m² in Ayrolle to 70.83 ± 14.96 individuals/100 m² in Salses-Leucate at Lido port Leucate (**Table 1**). These two sites presented similar characteristics: both were very shallow (0.9 and 0.7 meters deep respectively), with similar types of substrate and both were covered by *Z. noltii*.

6. 3. Population size estimation

Abundance, within a given sampled site, was calculated as the product of the surface of potential habitat, based on aerial images, and the estimated population density. Local estimations were aggregated and yielded a total stock estimate of $163\,539 \pm 91\,586$ *P. nobilis* individuals for the Occitan coast (Table 1). The highest abundances were found in the two largest lagoons, Salses-Leucate and Thau, with $80\,483 \pm 37\,323$ and $61\,976 \pm 44\,066$ individuals, respectively, which thus represents 87 % of the total stock of fan mussels at the scale of the Occitan coast (**Table 1, Figure 6**). In Thau, the high total abundance is related to a large homogeneous area, the Lido, whereas, in Salses-Leucate, individuals were more evenly distributed throughout prospected sites. The lowest abundances were found in open sea sites, such as at Côte Rocheuse where 6 among 8 sites had abundances between 23 and 632 individuals, and in small ports such as in Port Ambonne and Frontignan with 104 and 587 specimens, respectively. These last sites provide small areas of potential habitat which limit the total abundance.

6. 4. Size distribution and maturity

Total shell length of living individuals ranged from 5.07 cm in Thau at the Lido to 68.50 cm in Leucate Sud (**Figure 7**), and the mean size per site ranged from 11.95 cm in the Côte Rocheuse, at Le Racou, to 45.8 cm in Port Ambonne. In total, across all sites surveyed *in situ*, 2 recruits, 567 juveniles and 1 642 adults were measured. As expected, because recruits are almost impossible to see in seagrass beds, only very few were counted. Size distribution was unimodal in most sites, and they were dominated only by adults or only by juveniles (**Figure 7**). However, several sites, Eaux Blanches at Thau, Leucate Nord at Salses-Leucate and Banyuls, Peyrefite and Cerbère at the Côte Rocheuse, showed a bimodal distribution. In

Sales-Leucate, all sampled sites were dominated by adults and only few juveniles were present in Leucate Nord and in Leucate Centre whereas in Thau, juveniles were dominant in almost all areas, except at Port de Sète and Marseillan. Juveniles were also more abundant than adults for all sites in Côte Rocheuse.

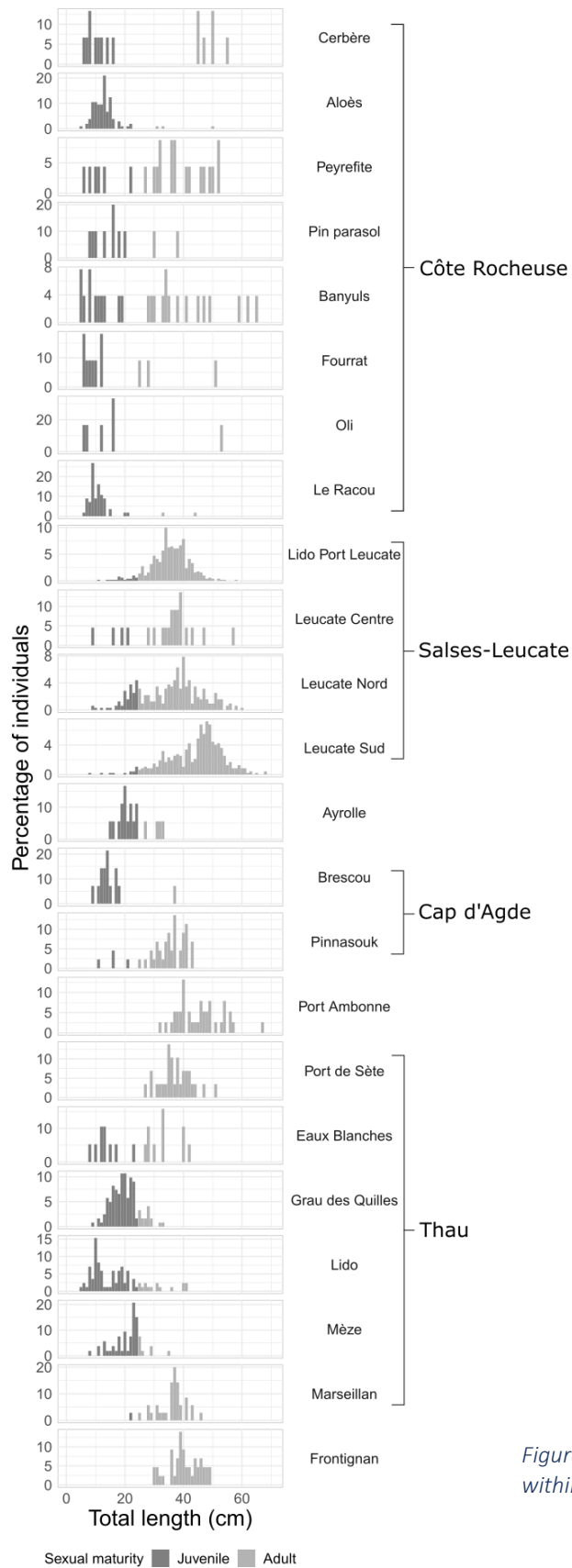


Figure 7 : Total length distribution of living fan mussels within each sampled sites

6. 5. Characteristics of the habitats colonized by *P. nobilis*

All observed individuals were located in shallow habitats with a mean depth ranging from 0.7 m in Salses-Leucate at Lido Port Leucate to 14.5 m in Côte Rocheuse at Pin Parasol (Table 1). Several types of soft substrate were encountered during the *in situ* surveys, from mud to rock (see Table 1), sometimes exposed, sometimes covered by meadows or algae. Among sampled sites, 18 were covered by vegetation, mostly phanerogams as only Pinnasouk at Cap d'Agde was covered by an invasive alga (*Caulerpa racemosa*), and 5 were bare sediment.

The results of the FAMD showed that, when considering the parameters measured in the present study, sampled sites were structured into 3 groups that are linked to habitat type (Figure 8). One group was almost entirely composed of sites located in the open sea, a second included the ports and Brescou (Cap d'Agde) and Marseillan (Thau) and the last one grouped lagoon sites with Pinnasouk (Cap d'Agde) and Lido port Leucate (Salses-Leucate). Mean depth and parameters associated with underwater vegetation cover (including the presence/absence, the species and its coverage) were the main variables which contributed to the clustering of sites with *P. nobilis* and most of their modalities presented a significant v-test (see Table S 1). In contrast, substrate type was weakly involved in clustering sites and showed low values of contribution and a non-significant v-test. Sites among the group of open sea sites and the group of lagoon sites were distributed along a depth gradient and the two groups were separated by the species of vegetation. The group with ports, Brescou and Marseillan was apart from the depth gradient and was characterized by bare sediments.

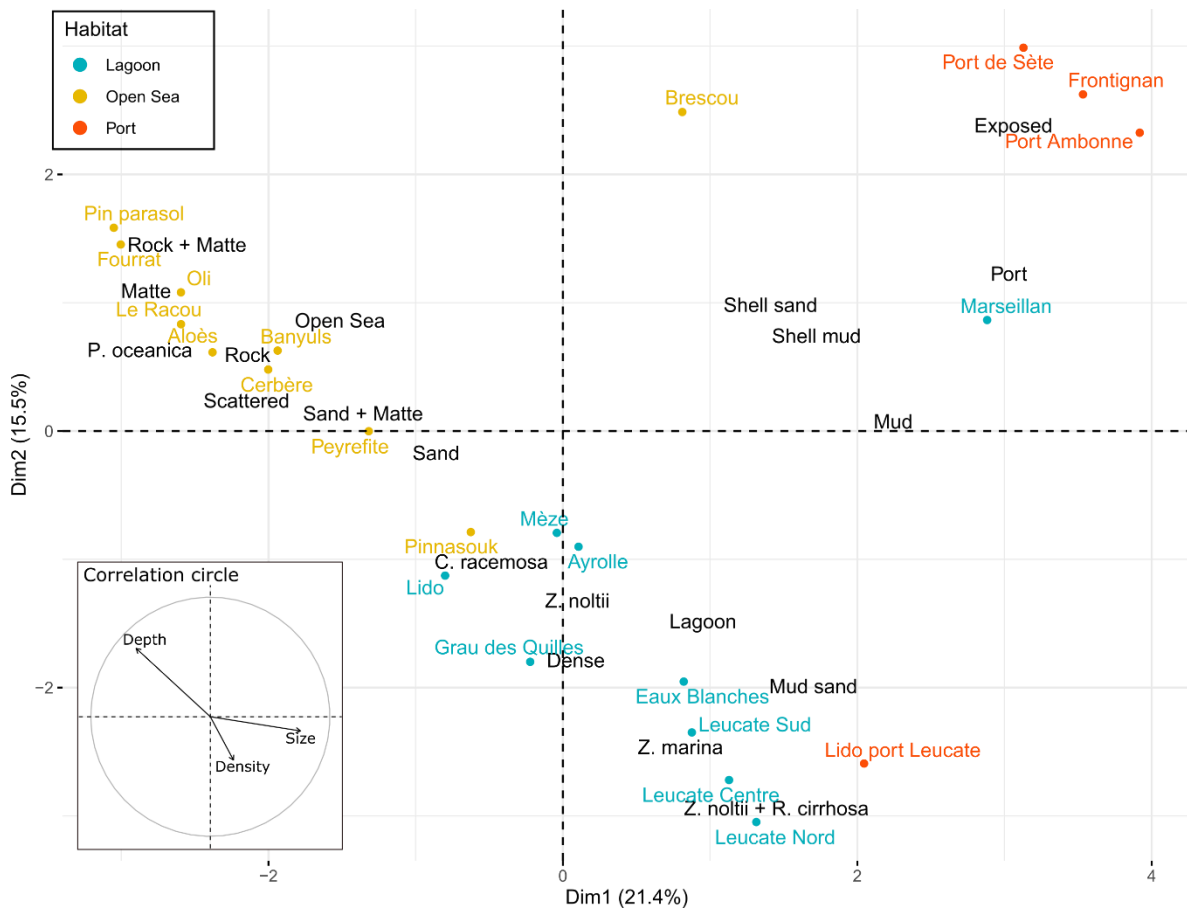


Figure 8 : Factor Analysis of Mixed Data (FAMD) showing sampled sites and variables involved in the analysis. Modalities of qualitative variables are represented in black, quantitative variables are represented in the correlation circle and colors correspond to the 3 different type of habitat

When comparing the type of habitat, mean population density was the highest in ports and the lowest in lagoons (Table 2). However, a non-parametric Kruskal-Wallis' test was performed, as variances were not homogenous (Levene test, p -value < 0.001), and the densities of *P. nobilis* were significantly different only when comparing lagoon and open sea sites (p -value = 0.014). Then, even if mean density seemed higher in sites where vegetation was present than in sites with bare sediment, it was not statistically significant (Kruskal-Wallis test, p -value = 0.2052).

Table 2 : Mean density (\pm standard deviation) of living fan mussels (individuals/100 m²) depending on the type of habitat and depending on the presence or absence of vegetation. The star indicates a comparison that was significant after Kruskal-Wallis' test (p -value = 0.014).

	Number of transects	Density \pm SD (ind/100 m ²)	
Lagoon	105	4.76 \pm 9.34] *
Open sea	54	5.11 \pm 5.74	
Port	25	18.83 \pm 30.96	
Presence of vegetation	160	7.38 \pm 15.32	
Absence of vegetation	24	2.76 \pm 3.40	

7. Discussion

In the context of the ongoing fast and dramatic mortality due to a recent parasite expansion, the goals of the present work were to identify the main *P. nobilis* aggregations in the Gulf of Lion and to highlight their characteristics prior to the parasite invasion. Identification of the remaining local populations of *P. nobilis* will be essential to ensure the rapid implementation of conservation plans. The present work highlights the importance of lagoons, as the largest aggregations were found in Thau along the Lido site with about 45 000 fan mussels and more than 30 000 in Salses-Leucate at the Leucate Nord site. However, the densities of fan mussels within these two lagoons varied with respect to site, even when the environmental conditions appeared to be similar, leading to a very patchy global distribution. Individuals were found in shallow areas (< 14.5 m) and on different types of soft substratum (from coarse sand to mud), with or without vegetation (algae or meadow), even if the presence of phanerogams appears as a favoring feature for the presence of fan mussels.

A total of only 2 recruits were observed for all surveys which raises questions about their absence. In the present study, the field work was mainly conducted in the spring and early summer of 2018 and 2019 which is outside the settlement period which occurs at the end of August through the beginning of September (Cabanellas-Reboredo et al., 2009). The smallest individuals observed were thus recruits from the previous year, meaning that the observed individuals were around one-year-old. Another reason for the low numbers of recruits observed may be due to the difficulty associated with finding them. It is well known that, when associated with seagrass meadows, shell size affects the detectability of specimens as

small and medium individuals are covered by leaves (Basso et al., 2015b; Katsanevakis, 2006; Rabaoui et al., 2010). Furthermore, Hendriks et al. 2012 demonstrated that the probability of finding individuals of *P. nobilis* in meadows is positively associated with shell size and that this association is consistent between sites. It is clear that small individuals (i.e. recruits of the year) are absent from our study for sites where the substrate is covered by meadow, and we cannot consider the absence or the abundance of recruits as a reliable variable from the present work.

7. 1. Importance of lagoons

Lagoons appear to be the main reservoirs for the species, along the Occitan coast, as 87 % of the total estimated stock was found in Thau and Salses-Leucate lagoons. Along the entire studied coastline, the highest density of individuals was found in Salses-Leucate at the Lido of Port Leucate site with 70 ind/100 m². This is one of the highest densities of *P. nobilis* ever recorded in the literature. A similar value was found in the Gulf of Gabes, in Tunisia, where density reached 56 ind/100 m² (Rabaoui et al., 2010). The highest density ever reported was around 1 200 ind/100 m² in Venice lagoon (Russo, 2012) whereas the most common values in other areas are around 1 - 2 ind/100 m² (Basso et al., 2015b; Rabaoui et al., 2010; Trigos and Vicente, 2018; Tsatiris et al., 2018). However, a comparison of aggregation densities among different studies is complicated as the sampling design and analyses vary significantly. As reported by Rabaoui et al. 2010, some of the densities are not representative of wide regions as they are based on a small number of plots that were not randomly placed but instead high-density patches were selected for sampling. Whatever the imprecision of the measure, various surveys, together with our work confirm that lagoons, throughout the Mediterranean Sea, are essential habitats for the fan mussel (Basso et al., 2015b; Katsanevakis, 2009, 2007a; Russo, 2012).

Next, even if lagoons presented high densities and abundances, the distribution was very patchy as the densities varied between 1.98 and 70.83 ind/100 m² in Salses-Leucate and between 1.42 and 10.17 ind/100 m² in Thau. In the three lagoons sampled in our study, fan mussels were mainly located along the eastern banks, close to the connections to the sea, and there were very few individuals in the western parts away from the channel connections with the sea. Salses-Leucate and Thau both receive freshwater inflows from western sources, decreasing the surrounding salinity: two karstic springs, Font Estramar and Font Dame in

Salses-Leucate and the Vène and Pallas rivers in Thau (Fleury et al., 2007). This could explain the absence or low density of fan mussels in these areas. Similar results were found in Gera Gulf (Lesvos Island, Greece) where higher densities of fan mussels were found next to the connection to the sea (Tsadiris et al., 2018) and in Alfacs Bay, where individuals settled in the southern part of the bay and were absent from the northern part which receives irrigation channels from rice fields (Prado et al., 2014). The proximity to freshwater inflows can lead to high fluctuations of salinity, which could thus be a structuring factor that may limit the development of fan mussels. Overall, fan mussels benefit from sheltered habitats in lagoons but require some stability in salinity, both partly driving their distribution in these habitats.

7. 2. Characterization of the habitats colonized by *P. nobilis*

The association of fan mussels and *Posidonia oceanica* meadows was well described (Basso et al., 2015b; Richardson et al., 1999) and is further illustrated in the Côte Rocheuse sites in the present work. Fan mussels were also observed in association with other species of phanerogams, mostly *Zostera marina* and *Zostera noltii* in lagoons, and with *Caulerpa racemosa*, which is an invasive alga that covered almost all sediments in Pinnasouk at Cap d'Agde. Relatively dense populations were also found on substrates without meadows such as in Thau at Port de Sète or Marseillan. Similar results were found in Addis et al. (2009) in the Gulf of Oristano, Sardinia, where density was higher in an estuary site (12 ind/100 m²) than in meadows (3 - 4 ind/100 m²). In another study based in Lake Vouliagmeni (Korinthiakos Gulf, Greece), a substantial population of *P. nobilis* was reported, though marine seagrass was completely absent (Katsanevakis, 2006). Overall, fan mussels can live in bare sediment and the presence of meadow is a favoring factor rather than a limiting one. In our work, the main aggregations were generally found in seagrass which also demonstrates the favoring advantage offered by meadows that have been largely described in the literature (Duarte et al., 1999; Hendriks et al., 2008, 2012, 2011).

During the study, fan mussels were observed buried in several types of substrate, from mud to coarse sand, demonstrating that the nature of the substratum is not a limiting factor, as long as it is soft, and only hard bottom appeared unsuitable for their settlement. Muddy environments present both advantages and disadvantages. The predominance of muddy detritus in the diet of fan mussels was previously reported (Davenport et al., 2011; Najdek et al., 2013; Trigos et al., 2014b) and the high concentration of organic matter available in

muddy environment provides thus an abundant source of food. However, resuspension of fine sediments during turbulent weather in shallow habitats could interfere with filtration and may have negative effects on respiration. Muddy substrates, rich in organic matter, are generally more subject to anoxia when hydrodynamic is low, which can enhance the production of hydrogen sulfide, leading to the death of individuals (Basso et al., 2015a; Prado et al., 2014).

Considering the difficulty and the time required to collect relevant marine currents data, hydrodynamics was not measured during our survey. However, it may be one of the key parameters responsible for the structuring of fan mussel distribution. Several studies (García-March et al., 2007, 2020a, 2016; Hendriks et al., 2011; Prado et al., 2021) pointed out that high hydrodynamics may be a limiting factor for the settlement and the development of fan mussels. For example, García-March et al. (2007) demonstrated that drag forces, generated by waves, increase mortality in shallow open sea populations by breaking or dislodging shells. Next, García-March et al. (2016) showed that bimodal currents generated by waves also affect gaping activity by reducing gape angle and increasing the number of movements, which are both assimilated to defensive reactions, likely in order to limit the ingestion of undesirable particles. The hydrodynamics in the open sea is usually higher than in lagoons, particularly on the Occitan coast as it is subjected to strong winds and sea-states that can impact coastal habitats (Petrenko et al., 2005; Renault et al., 2012), and this could explain the lower abundances found in our open sea sites. However, within the lagoons, the highest densities of fan mussels were mostly found in sites close to a connection to the sea, where there are water exchanges, for example in Salses-Leucate at Leucate Nord, Leucate Sud, and in Thau at Grau des Quilles. Similar situations were reported in Aquatina Lagoon, Italy (Marrocco et al., 2018), in the Ghar el Melh, Tunisia (Zakhama-Sraieb et al., 2011) and in Mar Menor, Spain (Prado et al., 2014), where *P. nobilis* individuals were found in aggregation near the mouth of the lagoon. However, this was not the case in lake Vouliagmeni as individuals were distributed all around the saltwater lake (Katsanevakis, 2007b). The aggregation of *P. nobilis* around connections to the sea could be justified by a constant water flow from the sea, delivering food and larval supply. Then, several authors hypothesized that fan mussel distribution might instead be determined by a habitat's oxygen conditions (García-March et al., 2016; Zakhama-Sraieb et al., 2011) as the presence of at least a minimum of water motion also ensure the renewal of water and help to maintain good water quality, particularly in

lagoons where eutrophication is not rare (Carpenter et al., 1998; Lloret et al., 2008; Padedda et al., 2019).

In most of the sampled sites, adults and juveniles did not seem to cohabitate. In several studies, authors reported a depth-related size segregation of fan mussels, with smaller individuals in shallow habitats and larger individuals deeper habitats (J. R. García-March et al., 2007; Katsanevakis, 2006), but this is not consistent with our observations as, except for the Côte Rocheuse, all individuals were restricted to shallow waters (< 6 m). This is especially true for lagoons as the maximum depth was 2.9 m at Marseillan in Thau. The restriction to shallow habitat may instead be due to the correlation of depth with other parameters such as hydrodynamics, type of substrate, reduction in food supply, oxygen availability, etc., than directly linked to depth, as *P. nobilis* was already observed in deeper habitats (14 m along the Côte Rocheuse in the present work, 12-13 m in Lake Vouliagmeni, Katsanevakis 2006; below 20 m in Cabrera National Park, Balearic Islands, Vázquez-luis et al. 2014; 50 m in Korinthiakos Gulf, Katsanevakis 2007).

During the survey we did not have any information about initial recruitment and thus mortality rates could differ depending on the habitat. However, large individuals were found in all types of habitat, showing good survival over years. This study thus highlights the large diversity of habitat colonized by *P. nobilis*. While the species is generally considered as highly sensitive to perturbations, it seems that fan mussels are highly capable of adapting to various environmental conditions. In our study, the highest densities and abundances were found in lagoons, which was quite surprising considering that these habitats usually concentrate high levels of anthropic activities and erratic climatic variations that lead to disturbed and unstable environmental conditions (Padedda et al., 2019; Snoeijs-Leijonmalm et al., 2017; Viaroli et al., 2008). Open sea habitats thus appear to be even more restrictive, likely because of the hard hydrodynamic conditions, as described above, or because predation pressure might be higher.

7. 3. Perspectives for conservation

Lagoons on the Occitan coast, mainly Thau and Salses-Leucate, are the major reservoirs for the species. In the ongoing mass mortality context, these lagoonal habitats raise hopes for the survival of the species as, for now, lagoons remain less or unaffected by the parasite while almost all populations in the open sea have been devastated (Kersting et al., 2019).

Similar situations were reported throughout the Mediterranean Sea, for example in Alfacs Bay, a semi-confined estuary, where *P. nobilis* populations remain unaffected by the outbreak. The main hypothesis for the survival of individuals in lagoons is that the parasite *H. pinnae*, the cause for the mass mortalities, could be less tolerant to low-salinity waters (García-March et al., 2020b). Lagoons thus provided the opportunity to find a habitat where a healthy fan mussel population could be naturally protected by environmental conditions that are unsuitable for the parasite. Previous studies have shown the high connectivity potential of the species, along the Spanish coast (Wesselmann et al., 2018) and along the Occitan coast (Peyran et al., 2021a). In Kersting et al. (2020), authors put larval collectors along the coast to assess recruitment after the beginning of the pandemic. They found recruits in areas where *P. nobilis* has been decimated, indicating that larvae came from another source population. Using the Lagrangian trajectory model, they estimated that larvae found in collectors in Son Saura (Spain) or in the Embiez Island could be native to Occitanie. They thus have evidence of recruitment of larvae in 2018 which came from the Occitan coast. In July 2018, mass mortalities started to occur in the South of the Occitan coast but some marine populations were still healthy. However, as lagoon populations represented 87 % of the total abundance on the coast, it is likely that larvae caught in larval collectors came from Occitan lagoons. Populations in lagoons may thus have a key role in the replenishment and recovery of the species along the coast through larval export, even up to distant areas.

As lagoons are transition areas between land and sea, they are usually characterized by a high rate of dynamic change during the year as they act as a receptacle for input from watersheds which may have high level of pollutions and, because of their location, they also host an abundance of anthropic activities such as fisheries, aquaculture or recreational activities. As a result, a lagoon's ecological conditions can quickly degenerate, leading to conditions such as eutrophication, which that can have dramatic consequences on benthic fauna (Lloret et al., 2008; Rodríguez-Gallego et al., 2017). This type of scenario already happened in Mar Menor, in 2015, where the lagoon suffered an intense phenomenon of eutrophication, leading to the death of benthic organisms (Garcia-Ayllon, 2018) or in the lagoon of Ayrolle where the whole *P. nobilis* population disappeared between 2018 and 2019 with no evidence of *H. pinnae*. The situation is thus very worrying as the species is on the brink of extinction and its survival likely to rest on populations that are located in unstable

habitats. These areas should thus be treated as conservation priorities. The pandemic is ongoing and there is an urgent need to continue to survey healthy populations as there is no certainty that it is not just a question of time before the beginning of mass mortality events spreading in lagoons.

8. Supplementary information

Table S 1 : Results of the factorial analysis of mixed data for qualitative and quantitative data. Cos^2 refers to the quality of the representation. Ctr refers to the contribution to the construction of each dimension. v-test refers to the significance of variables. If a modality is $-2 < \text{v-test} < 2$, its coordinate is not significantly different from 0 on this axis.

		Dimension 1			Dimension 2		
		ctr to Dim.1	Cos^2	v-test	ctr to Dim.2	Cos^2	v-test
Qualitative variables	Lagoon	0.9	0.1	1.2	8.6	0.6	-3.2
	Open Sea	7.5	0.8	-3.6	2.9	0.2	1.9
	Port	8.6	0.7	3.2	2.9	0.1	1.6
	Matte	1.5	0.2	-1.2	0.5	0.0	0.6
	Mud	2.4	0.3	1.6	0.0	0.0	0.1
	Mud sand	2.9	0.3	1.9	5.8	0.3	-2.2
	Rock	0.9	0.1	-0.9	0.1	0.0	0.3
	Rock + Matte	1.9	0.3	-1.4	0.9	0.1	0.8
	Sand	1.7	0.3	-1.6	0.0	0.0	-0.1
	Sand + Matte	1.1	0.2	-1.1	0.1	0.0	0.3
	Shell mud	1.4	0.2	1.2	0.6	0.1	0.7
	Shell sand	1.0	0.2	1.1	1.0	0.1	0.9
	Absence of vegetation	8.8	0.6	3.3	10.5	0.4	3.1
	Presence of vegetation	2.4	0.6	-3.3	2.9	0.4	-3.1
	Dense	0.1	0.0	0.4	9.9	0.7	-3.4
	Exposed	8.8	0.6	3.3	10.5	0.4	3.1
	Scattered	6.4	0.7	-3.2	0.6	0.0	0.8
	C. racemosa	0.1	0.0	-0.3	0.3	0.0	-0.4
	No vegetation	8.8	0.6	3.3	10.5	0.4	3.1
	P. oceanica	9.6	0.8	-3.8	2.3	0.1	1.6
Z. marina	0.6	0.1	0.8	6.7	0.4	-2.4	
Z. noltii	0.1	0.0	0.3	4.2	0.3	-2.0	
Z. noltii + R. cirrhosa	0.4	0.1	0.6	3.8	0.3	-1.7	
Quantitative variables	Depth	8.6	0.4		0.3	10.0	
	Density	0.8	0.0		0.1	4.0	
	Size	12.7	0.6		0.0	0.4	

CHAPITRE 2 :

DEVELOPPEMENT ET TEST DE 26 NOUVEAUX MARQUEURS MICROSATELLITES POLYMORPHIQUES



1. Contexte

La connectivité entre populations, via la dispersion larvaire, est un paramètre clé pour l'écologie et l'évolution des organismes marins car elle a un impact direct sur ses populations à travers les processus de repeuplement (Saenz-Agudelo et al., 2011), le maintien d'un fort niveau de diversité (Almany et al., 2009) et détermine leur résilience en cas de perturbation locale (Cowen and Sponaugle, 2009; Ronce, 2007; Selkoe et al., 2006). Cependant, l'étude de la dispersion larvaire reste un grand challenge de l'écologie marine car, à cause de leur petite taille et de leur fort taux de mortalité, les larves sont presque impossibles à suivre. La plupart des études sont donc basées sur des simulations de l'hydrodynamisme (Swearer et al., 2019) plutôt que sur des données empiriques. Aujourd'hui, les progrès technologiques dans le domaine de l'analyse moléculaire et des outils de génotypage ont permis un bond en avant dans la compréhension de ces processus, grâce à l'utilisation de marqueurs microsatellites. Les marqueurs microsatellites sont de petits motifs de 2 à 6 nucléotides répétés dans la partie non codante de l'ADN. Ces séquences sont devenues des marqueurs largement utilisés en génétique des populations car ils sont très fréquents et très polymorphes grâce à leurs taux de mutations particulièrement élevés : 10^{-3} à 10^{-6} mutations par locus par générations contre 10^{-8} dans le reste du génome (Baer et al., 2007; Dallas, 1992; Schlotterer et al., 1998). En étudiant un panel de quelques locus, il est donc possible d'obtenir un génotype unique pour chaque individu et de détecter des variations génétiques à l'échelle de quelques générations (Selkoe and Toonen, 2006; Sunnucks, 2000).

Cependant, comme ils sont spécifiques, les microsatellites ont besoin d'être développés pour chaque nouveau modèle d'étude, ce qui s'avère coûteux et chronophage. Quelques études ont mis en évidence la conservation de certains marqueurs microsatellites entre des espèces proches (Dong et al., 2016; Dubé et al., 2017; Kang et al., 2013; Nie et al., 2019) mais elle est très dépendante du taxon considéré (Barbará et al., 2007). Le développement de nouveaux marqueurs microsatellites peut également présenter des difficultés chez certains taxons, notamment chez les mollusques, car leurs grandes tailles efficaces de populations augmentent le polymorphisme dans les séquences qui ne sont pas soumises à la sélection, comme les séquences bordant les microsatellites (McInerney et al., 2011), qui vont servir de zones d'amorces pour l'amplification PCR des microsatellites. Comme ces amorces sont développées à partir d'un petit nombre d'individus, il n'est pas rare que certains marqueurs

présentent des défauts d'amplification (i.e. allèles nuls), ce qui peut introduire des biais dans les analyses.

Malgré son statut d'espèce protégée, il existe peu d'études génétiques portant sur la génétique des populations de grandes nacres (Katsares et al., 2008; Rabaoui et al., 2011; Sanna et al., 2014, 2013). La plupart sont basées sur des séquences mitochondriales (COI ou 16S) ou nucléaires (18S ou 28S) mais leur résolution est limitée et ces marqueurs sont peu performants pour étudier la dynamique contemporaine des populations. Seules les plus récentes sont basées sur des marqueurs microsatellites pour étudier la connectivité entre les populations de grandes nacres en Espagne, aux Baléares et en France (González-Wangüemert et al., 2019, 2014; Wesselmann et al., 2018). Cependant, jusqu'à présent, seuls 10 microsatellites étaient disponibles pour *P. nobilis* et plusieurs ont présentés de forts taux d'allèles nuls (González-Wangüemert et al., 2014). Ce deuxième chapitre est donc consacré au développement et au test de nouveaux marqueurs microsatellites qui compléteront le set déjà existant et qui seront utilisés dans les analyses génétiques réalisées dans les chapitres suivants. L'ensemble des marqueurs disponibles a également été testé chez d'autres espèces du genre *Pinna* car ils pourront également servir pour réaliser des études chez ces espèces, notamment chez *P. rudis*, qui est l'espèce la plus proche de *P. nobilis* et qui peut parfois coloniser les mêmes habitats.

2. Publication associée :

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans la revue Molecular Biology Reports.

Peyran, C., Planes, S., Tolou, N., Iwankow, G., Boissin, E., 2020. Development of 26 highly polymorphic microsatellite markers for the highly endangered fan mussel *Pinna nobilis* and cross-species amplification. Molecular Biology Reports <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05338-1>

Les marqueurs développés au cours de ce chapitre ont également été utilisés pour réaliser une étude sur les populations de *P. nobilis* des îles Baléares (**Annexe 1**) et une étude sur la structure génétique des populations de *P. rudis* (**Annexe 2**).

Development of 26 highly polymorphic microsatellite markers for the highly endangered fan mussel *Pinna nobilis* and cross-species amplification.

Claire Peyran¹, Serge Planes^{1,2}, Nathalie Tolou¹, Guillaume Iwankow¹, Emilie Boissin^{1,2}

¹ PSL Research University: EPHE - UPVD - CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

² Laboratoire d'Excellence « CORAIL »,

Corresponding author: claire.peyran@gmail.com

Compliance with ethical standards:

The sampling was non-lethal and a priori approved by the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) of Occitanie (prefectural order n°2016-s-23).

Conflict of interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Breda M. Zimkus and Sarah Lemer for providing *Pinna* samples from the Museum of Comparative Zoology, Harvard University. We are also grateful to Maite Vázquez-Luis and the Instituto Español de Oceanografía - Centro Oceanográfico de Baleares (IEO-COB), for providing tissue samples of *Pinna rudis* for this study.

3. Abstract

The fan mussel, *Pinna nobilis* is a highly endangered bivalve species endemic to the Mediterranean Sea. During the last few decades, populations have been greatly reduced due to anthropic impacts and they are now under strict protection in most Mediterranean countries. Today, the species is facing a major crisis following the introduction of an **haplosporidan** parasite which is driving mass mortality in almost all *P. nobilis* populations throughout the Mediterranean Sea. Gathering additional knowledge regarding dynamics and connectivity patterns of *P. nobilis* populations is now more than ever critical. Here, we describe the development of 26 highly polymorphic microsatellite markers. Average allelic diversity of 10.9 alleles per locus was reported and heterozygosity ranged from 0.0294 to 0.9737. We tested cross-species amplification in four *Pinna* species for the new markers together with 10 already published markers, and analysed its success according to the genetic distances among species. Cross-species transferability success ranged from 3 – 38 % and had a negative relationship with the genetic distance between the target species and the tested species. The establishment of this new set of high-resolution markers provides a useful tool to understand processes driving gene flow and genetic diversity in *P. nobilis* populations and the closest congeneric species.

Keywords: microsatellite; genetic diversity; bivalve; cross-species transfer; conservation

4. Introduction

The fan mussel, *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) is an endemic bivalve of the Mediterranean Sea which lives half-buried in soft-bottom habitats, generally covered by seagrass meadows. As a filter feeder, *P. nobilis* plays an important ecological role by removing a large amount of detritus and organic matter (Basso et al., 2015b), thus contributing to maintaining the clarity of the water column (Trigos et al., 2014a). It also provides a hard substrate in soft-bottom areas, increasing the heterogeneity of the habitat and providing new substrate that can be colonized by other species (Giacobbe, 2002).

The Mediterranean Sea is now recognized as a highly impacted sea where anthropic pressures such as pollution, overfishing, habitat destruction and species introductions have reached unprecedented levels (Lejeune et al., 2010). These disturbances severely impact the natural balance of ecosystems. Similar to other marine species, the *P. nobilis* populations have significantly reduced over the last few decades, due to overexploitation, destruction of its primary habitat (i.e. *Posidonia* meadows), pollution and boat anchoring. Consequently, it is now considered as an endangered species and has been listed under strict protection since 1992, according to the European Council Directive 92/43/EEC (Annex IV) and the national laws of most Mediterranean countries.

Today, this species is facing a major ongoing crisis that threatens its very survival. Since October 2016, lightning mass mortalities have been observed on fan mussel populations, caused by the protozoan parasite, *Haplosporidium pinnae*. First signs of the epidemic were observed in southeast Spain (Vázquez-Luis et al., 2017) and it has now spread throughout the entire Mediterranean Sea (Cabanellas-Reboredo et al., 2019). Nearly all of the infected populations have been devastated. This is an unprecedented event for which neither the mortality rates (around 100 %) nor the speed of propagation (Cabanellas-Reboredo et al., 2019) have ever been recorded. This epidemic, in addition to the biological characteristics of *P. nobilis* (such as late sexual maturity, the pelagic larval phase, long life expectancy, etc.), could lead to its potential local or total extinction since the distribution of this species is restricted to the Mediterranean Sea.

Despite its endangered status and its great conservation need, only few studies have investigated population genetics and connectivity patterns in *P. nobilis* (Katsares et al., 2008; Rabaoui et al., 2011; Sanna et al., 2014, 2013). Most of these studies are based on

mitochondrial (COI and 16S) and nuclear (18S and 28S) sequence data but are limited in their resolution, and thus lack the capacity to provide adequate information on the contemporary dynamics of populations. Only the latest publications have used microsatellite markers to study genetic connectivity at a large scale (González-Wangüemert et al., 2019, 2014; Wesselmann et al., 2018).

Microsatellites are short sequences of DNA where a simple motif, generally 2-5 bp long, is repeated several times. Because microsatellite markers are highly polymorphic, abundant and fairly evenly distributed throughout eukaryotic genomes, they became a widely used marker in population genetics (Selkoe and Toonen, 2006). However, because they are species-specific, microsatellites need to be developed *de novo* for each species, which can be expensive and time consuming. Nevertheless, several studies indicate that cross-species transferability of microsatellite markers can be successful (Dong et al., 2016; Dubé et al., 2017; Kang et al., 2013; Nie et al., 2019) but varies among taxa (Barbará et al., 2007). It is well known that the development of microsatellite makers can present some difficulties in molluscan taxa due to the large effective population size of species which maintain polymorphism in sequences submitted to low selective pressure, such as the primer flanking regions (McInerney et al., 2011). PCR failure (i.e. null alleles) can then occur as primers are designed from few individuals (8 to 10).

The family Pinnidae Leach, 1819 contains three genera: *Atrina* Gray, 1842 with 29 accepted species, *Pinna* Linnaeus, 1758 with 25 accepted species and *Streptopinna* Martens, 1880 which contains a single species. *P. carnea* and *P. rudis* are those which are most closely related to *P. nobilis* (Lemer et al., 2014). Regarding the mass mortality context, a study of cross-species transferability will have great interest, particularly respect to the sister species *P. rudis*, as this species is still unaffected by the parasite and hybrids were recently found in the context of searching for *P. nobilis* survivors.

To date, only 10 microsatellites are available for *P. nobilis*, and several of them have shown evidence for the presence of null alleles (González-Wangüemert et al., 2014). The aim of the present study was to develop a supplementary set of microsatellite markers for *P. nobilis*, and to test for their transferability in four *Pinna* species. We also used this opportunity to test the 10 previously published markers for cross-species amplification.

5. Materials and Methods

Microsatellite sequences were isolated from genomic DNA of 13 *P. nobilis* individuals (Peyrefite, Banyuls, France) by ecogenics GmbH (Balgach, Switzerland) using the high-throughput genomic sequencing approach described by (Abdelkrim et al., 2009) to provide a database of resulting microsatellites. Based on this dataset, 95 primer pairs were characterized.

40 samples of our target species *P. nobilis* (Peyrefite, Banyuls, France) were then used to optimize Polymerase Chain Reaction amplification and identify polymorphic loci (see Table S1 for collection information). Small fragments of mantle tissue were digested in 420 µL of digest buffer containing 1 % proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany). Extraction of genomic DNA was performed using the QIAextractor robot following the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany).

PCR was performed using Type-it Microsatellite PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a final volume of 12.5 µL including 4 µL Type-it Multiplex PCR Master Mix (2X), 6 µL RNase-free water, 1 µL of each primer (2 µM forward and reverse primers diluted in TE pH 8 buffer) and 1.5 µL of DNA template. PCR programs consisted of an initial denaturing step of 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 1 min 30 s at annealing temperature (53-63 °C, depending on the locus), 30 s at 72 °C and a final elongation step at 60 °C for 30 min. Optimized loci were combined in multiplex panels according to their allele size and primer annealing temperature. Individuals were genotyped by assessing the allele size using forward primers labelled with fluorescent dyes (PET, NED, VIC, 6-FAM, Applied Biosystems). PCR products were sent to a private company, GenoScreen (Lille, France), for fragment analysis where they were visualized using an Applied Biosystems 3730 Sequencer. GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) was used for accurate sizing. Allele sizes were scored and checked manually using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems). All ambiguous peak profiles were considered as missing data.

The primers previously published in (González-Wangüemert et al., 2014) were also tested. For the ones which displayed evidence of the presence of null alleles, new reverse primers (R2) were designed.

For cross-species amplification transferability tests, optimized loci were tested on 4 other *Pinna* species (*P. rudis*, *P. carnea*, *P. rugosa*, *P. muricata*). Fourteen specimens of *P. carnea* (Western Atlantic and Western Central Pacific), 15 specimens of *P. rugosa* (Eastern Pacific and Northeast Atlantic), 15 specimens of *P. muricata* (Indo-Pacific) and 8 specimens of *P. rudis* (North Atlantic and Mediterranean Sea) were provided by the Museum of Comparative Zoology (MCZ), Harvard University (see **Table S 2** for collection information). Fifteen additional specimens of *P. rudis* were collected in the Balears Islands. For most of the samples from the MCZ collection, DNA was already extracted and for the other samples, DNA was extracted following the same protocol as described above. For cross-species amplification, each locus was amplified separately (i.e. loci were not combined in multiplexes).

The presence of null alleles, scoring errors and large allele dropout was tested using MICROCHECKER v 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) for *P. nobilis* samples only as the sample sizes for the other *Pinna* species were too low. Allele frequencies and total number of alleles (N_a) were calculated using GenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse, 2012). Observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities were estimated for each locus using the software GENETIX v 4.05.2 (Belkhir et al., 2004). GENETIX was also used to calculate the inbreeding coefficient (F_{IS}) and linkage disequilibrium (LD). Selfing rate (s) was estimated using the method implemented in RMES software (DAVID et al., 2007) which is based on the heterozygosity structure among loci and independent of technical biases such as frequency of alleles and related null alleles.

6. Results and Discussion

A panel of 30 new polymorphic loci showing clear amplification profiles was successfully developed. However, 3 loci from the previously published set (2.1, 2.2 and 4.2) presented ambiguous peak profiles for all the individuals and were removed from the study. Analysis with MICROCHECKER revealed the presence of null alleles in several loci: 4 loci in our new set (3200, 13859, 954, 4052) and 3 loci in the set already published (3.3, 3.4, 3.6). However, these loci already showed evidence of null alleles in other *P. nobilis* populations (González-Wangüemert et al., 2019, 2014; Wesselmann et al., 2018) and redesigning the reverse primer could not correct genotypic equilibrium. These loci were thus also removed from the dataset

for further analysis. Null alleles are widespread in all taxa but some groups, such as molluscs can present particularly high frequencies of null alleles (40 % of loci in *Solen grandis*, (Nie et al., 2019); almost all loci in *Mytilus coruscus*, (Kang et al., 2013); 56 % in *Chlamys farreri*, (Zhan et al., 2009)), and here we have approximately 20 % of loci for *P. nobilis*. There was no evidence of scoring error or large allele dropout in any other locus.

The number of alleles per locus ranged from 2 (locus 15006) to 21 (locus 11847) with an average of 10.9 alleles per locus (see **Table 3**). The loci published in (González-Wangüemert et al., 2014) and scored on samples of the present study, have shown a higher genetic diversity with an average of 14.2 alleles per locus. In the new panel of microsatellites, expected (*He*) and observed (*Ho*) heterozygosities ranged respectively from 0.0290 to 0.9027 with an average of 0.7256 and from 0.0294 to 0.9500 with an average of 0.6728. For the already published set *He* and *Ho* ranged respectively from 0.4487 to 0.9394 (mean: 0.6897), and from 0.4375 to 0.9737 (mean: 0.6817; see **Table 3**). The panel of newly developed loci showed a high level of genetic diversity and heterozygosity which is consistent with other bivalve species (*Donax* species, (Fernández-Pérez et al., 2019); *Mytilus coruscus*, (Kang et al., 2013); *Ruditapes philippinarum*, (Kim et al., 2014); *Gibbula divaricata*, (López-Márquez et al., 2016)). This level of diversity is similar to those recorded for other populations in the western Mediterranean Sea, using the already published set of microsatellite markers (González-Wangüemert et al., 2019, 2014; Wesselmann et al., 2018). *P. nobilis* also showed high levels of diversity (Katsares et al., 2008; Rabaoui et al., 2011; Sanna et al., 2013) when mtDNA markers (COI and 16S sequences) were used at a wider geographic scale. All of these results support Sanna et al. (2013), suggesting a common origin for all populations throughout the Mediterranean Sea followed by an eastward expansion.

Table 3 : Characterization of the 37 microsatellite loci used for this study. T_A , primer annealing temperature; N number of individuals with reliable amplification; N_a number of alleles; H_o observed heterozygosity; H_e expected heterozygosity; F_{IS} inbreeding coefficient

Locus	Primer Sequences	Repeat type	T_A (°C)	Size range (bp)	N	N_a	H_e	H_o	F_{IS}	Cross species amplification (success/total)
10059	F : TTCTCCTCCGAACCCCTC R : ATAAATACCCCTGCCGACCT	(CA) ₁₃	53°C	101-131	33	13	0.8714	0.6970	0.21493***	0/4
11847	F : ACACTCCAGTACAAGTCACAAATG R : AGAATGCCTGAGTGGGACAG	(TGT) ₁₈	53°C	72-153	39	21	0.9027	0.8974	0.01881	2/4
11974	F : TCGGCAATCACGTCTTACTA R : TTAAGAACCATCCCTGCTC	(TTG) ₉	57°C	149-221	39	11	0.8573	0.7692	0.11559	1/4
12107	F : TGCATCTGCATCGTGAGG R : TGGTGGTCAAGTGGGATGAC	(CAT) ₈	55°C	110-119	39	5	0.3153	0.2564	0.19916	2/4
13402	F : TCGTCATCGTCATCATCG R : CTAATGATGCCCATGGTTCT	(CAT)	60°C	163-214	28	16	0.8941	0.7143	0.21852***	1/4
13859	F : AACTATTCAGTGGTCCGAGA R : ATGGCACAATTATTGGAGTC	(AAC) ₁₈	57°C	166-256	35	15	-	-	-	0/4
14331	F : ATCGGAAATCGGATAGGCTG R : TAATGTGAGTTGTGTGGCGG	(GT) ₁₆	57°C	82-134	39	19	0.8968	0.9231	-0.01634	2/4
14763	F : AGCATCTGGTAACACGACGG R : TGGCGGCTCTAGAAAGATTG	(TTG) ₁₄	63°C	146-185	32	14	0.7119	0.6563	0.09395	0/4
1490	F : CTTCTGATTGACCGTAAGTG R : AAACCTCAGACAACGAGACAA	(AAC) ₁₁	53°C	179-212	38	8	0.7171	0.6053	0.16895*	0/4
15006	F : AACAAACGCAACTGCACATC R : ATGCTTGGCACTAATGGTCT	(CAA) ₁₂	57°C	192-207	34	2	0.0290	0.0294	0.00000	0/4
15096	F : AGTGCGTTGTTCAATTTCA R : TAGGCAAATTTCTCGCTCT	(GT) ₁₂	57°C	166-192	38	13	0.8695	0.9211	-0.04604	0/4
15393	F : TTGAGTGGGACGTTAAACAA R : ACGCTCCTGTTTTGTCTTCT	(CAA) ₁₂	57°C	174-225	35	11	0.7330	0.8056	-0.08498	0/4
15415	F : ACCACTACTCATGCCTCACC R : AACGAAGTCCGGCTATAACG	(AC) ₁₆	53°C	237-261	38	13	0.8553	0.7895	0.09016	2/4
15584	F : TGAGGTGGACGTCGCTTAAC R : GTCGAAGTCTCGTGGCAAAG	(TGT) ₁₃	55°C	221-272	39	17	0.8840	0.7436	0.17143***	2/4
2287F1R1	F : AGGTGCAATAGCAATAACAACAA R : GCGTGGAGGTAAGAGTCAA	(ACA) ₁₂	63°C	89-122	32	10	0.8003	0.7500	0.07864	3/4
3200	F : AAGAACCCTCCCTGCACTAC R : ACAGCTATTGAAAGACTTAGAGACC	(CAA) ₁₁	63°C	223-253	40	11	-	-	-	0/4
4052	F : GACCATATGAAACGGACCTG R : GGTATCCGCTCTCAATATCTGT	(GA) ₁₈	55°C	152-190	36	14	-	-	-	0/4
4482	F : TATCCAGCAAGAGCACCAGC R : TGACTTGGGTACTGGGTTCTG	(CAA) ₉	55°C	186-204	39	5	0.4678	0.4872	-0.02849	2/4
4664	F : ACATGCATACATAACAACAGTGC R : CCTTTCTGCCGACCTCTC	(ACAT) ₉	60°C	134-171	40	12	0.8678	0.9500	-0.08215	0/4
5017	F : ACCGAAGTCGAGATGGTTGG R : CTTACTGGCACACGATGC	(GTT) ₁₀	60°C	207-231	37	8	0.8174	0.8919	-0.07755	1/4

5062	F : TTCTGTGTATCCAATTGACC R : CCACTTTGGTGAGATTTACA	(CAA) ₁₂	55°C	227-260	40	11	0.8328	0.8250	0.02204	0/4
5990	F : TGGGACGTAAACAACAATG R : ACCAGTCGAAGAGGTACCAG	(CA) ₁₁	55°C	162-212	36	14	0.8302	0.3889	0.54163	2/4
6477	F : AATCTCTTCCAGCATCCAAG R : AGCGGTACTACTCACACGTAA	(CAA) ₁₈	60°C	124-163	36	7	0.7307	0.6944	0.06367	0/4
6980	F : AGTCTGCATAACTTCCACTGC R : GGCCACCAGTAAGCTCTTTG	(ACC) ₁₀	53°C	190-245	30	17	0.8367	0.6667	0.21938**	1/4
8995	F : AGTGGAAGAGAAGCCATACG R : TACTTGACGGAACCATGTG	(GTCT) ₁₄	57°C	226-290	40	12	0.7394	0.6750	0.09962	0/4
954	F : GAAGAAGGCTCAAAGTGGA R : TCTGGATAGTTCAGCGATCA	(GA) ₂₃	55°C	166-198	35	15	-	-	-	0/4
9809	F : GAAAGACAGACAGAGAGACAAGCA R : AAAACAAATGGACGACGACA	(CATA) ₈	63°C	138-158	31	6	0.6722	0.6774	0.00865	0/4
9865	F : TCAGGGTTAGGGTTCCTCCT R : TTTGACACAGCGTGACGTTT	(GTT) ₇	63°C	202-208	30	3	0.4761	0.3667	0.24586	1/4
9902	F : TCTAAGGTGCTTGATGTGGA R : TTAGACGGAAACCATGTGTG	(GTCT) ₁₂	55°C	215-243	32	8	0.6992	0.6875	0.03262	0/4
9918	F : GTCTTTCTGTGCCGATGTCTG R : GGACGGGCCGACCTATCT	(ATCT) ₇	63°C	226-254	32	7	0.5591	0.6250	-0.10222	0/4
3.2¹	F : CCGAGGTCCCCTATCACAG R : TGCCCTTTGTGTCATTATTTG	(ACC) ₁₂	53°C	194-248	38	14	0.8698	0.9737	-0.10626*	2/4
3.3R2¹	F : CGAGACGGAGTTCAAAAGC R2 : CATTGGCCCTGAACAGTAGG	(ATT) ₁₃	60°C	230-254	38	8	-	-	-	0/4
3.4R2¹	F : CCTCGTTCATTGCACCCTG R2 : CAGTGCTTTCATATGTCGGGATT	(ATC) ₁₀	55°C	142-157	38	6	-	-	-	3/4
3.5¹	F : CCTAGCTACATTCCATATGTGC R : TCATGTCTATGTCAAATGAACTCG	(AAT) ₁₃	63°C	149-182	32	9	0.4487	0.4375	0.04088	3/4
3.6R2¹	F : AGGGACTTAAATTGACCGCTTC R2 : CGGTTTTCCGGAAGTTACACTG	(AAT) ₁₃	53°C	156-243	24	8	-	-	-	0/4
4.3¹	F : TGGATCTAGACTCTTTGTTGTCTTC R : ACAGTGCCATGCTATGTTGC	(ATTT) ₁₇	60°C	238-322	38	25	0.9394	0.8158	0.14467***	1/4
5.2¹	F : TTGCATGTGCCACCATAATC R : TTCATACCGATGAGCCAAATG	(ATAGT) ₁₁	60°C	182-217	36	9	0.5012	0.5000	0.01639	0/4

¹(González-Wangüemert et al., 2014)

Five out of the 26 newly developed markers presented significant F_{IS} values, indicating a significant heterozygote deficiency and a departure from the Hardy-Weinberg equilibrium. This heterozygote deficiency could be due to several factors such as inbreeding, Wahlund effect, selection or null alleles. Loci with suspected null alleles were removed from the panel of markers after the analysis with MICROCHECKER. However, the selfing rate s is low and does not significantly differ from zero ($s = 0.007$, p -value = 0.377) indicating that the positive F_{IS} is likely due to technical artefacts (i.e. null allele) rather than an evolutionary process such as inbreeding, which is typically not a factor for species with large effective population size

and external open water fertilization. Furthermore, microsatellites are considered neutral markers and it is unusual to find such markers under selection in the literature (on rare occasion when they are linked to a gene under selection). Finally, a Wahlund effect could explain the deficit of heterozygotes by the recruitment and mixing of genetically variable cohorts as the pelagic larvae are highly influenced by the interannual variability of currents (González-Wangüemert et al., 2019), however it would affect all loci. Similarly, all of the previously published markers (González-Wangüemert et al., 2014) were already tested in several populations (González-Wangüemert et al., 2019, 2014; Wesselmann et al., 2018) and always presented significant F_{IS} values that the authors associated with high frequencies of null alleles in their dataset.

A significant linkage disequilibrium was also identified and distributed among all loci in *P. nobilis* as 8.9% of the pairwise loci combinations showed significant disequilibrium after sequential Bonferroni correction (**Table S 3**). Linkage disequilibrium can be due to technical problems, such as null alleles or genotyping errors, in addition to population genetics processes such as physical linkage to an allele under selective pressure, self-fertilization, inbreeding and or admixture of differentiated populations. As previously discussed, inbreeding is unlikely in this population. Even if self-fertilization was observed in controlled conditions (Trigos et al., 2018), *P. nobilis* is usually considered as a successive hermaphrodite with an asynchronous gamete maturation to avoid self-fertilization (Basso et al., 2015b).

Of the 37 loci (including 30 newly developed loci and 7 from (González-Wangüemert et al., 2014)) tested on 4 other *Pinna* species, only 17 loci were amplified on at least one species (**Table 4**). The success of cross-species amplification clearly depended on the species tested. The percentage of loci showing amplification per species ranged from 3 % for *P. muricata* (1 locus amplified) to 38 % for *P. rudis* (14 loci amplified). The loci were still polymorphic (from 2 alleles per locus to 18, see **Table 4**) but the size range could differ compared to the target species *P. nobilis*.

Table 4 : Cross-species amplification of the optimized loci for four species of Pinna (*P. carnea*, *P. muricata*, *P. rugosa*, *P. rudis*) and size range; N: number of individuals showing clear amplification profile/number of individuals tested; Na: number of alleles per locus.

Locus	<i>P. carnea</i>			<i>P. muricata</i>			<i>P. rugosa</i>			<i>P. rudis</i>		
	Size	N	Na	Size	N	Na	Size	N	Na	Size	N	Na
10059	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
11847	63 – 123	14/14	7	-	0/4	-	-	0/4	-	66 – 72	23/23	2
11974	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	168 – 195	22/23	2
12107	116 – 563	12/14	15	-	0/4	-	-	0/4	-	116 – 167	23/23	6
13402	-	0/4	-	-	0/4	-	349 – 394	14/15	2	-	0/4	-
13859	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
14331	74 – 116	13/14	14	-	0/4	-	-	0/4	-	80 – 126	23/23	18
14763	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
1490	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
15006	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
15096	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
15393	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
15415	249 – 273	13/14	10	-	0/4	-	-	0/4	-	235 – 267	22/23	14
15584	241 – 478	14/14	7	-	0/4	-	-	0/4	-	475 – 487	23/23	4
2287F1R1	116 – 128	13/14	4	44 – 125	10/15	8	-	0/4	-	-	0/4	-
3200	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
4052	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
4482	174 – 216	14/14	10	-	0/4	-	-	0/4	-	186 – 204	23/23	6
4664	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
5017	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	165 – 228	22/23	8
5062	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
5990	162 – 220	11/14	8	-	0/4	-	-	0/4	-	162 – 204	18/23	6
6477	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
6980	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	215 – 272	23/23	3

8995	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
954	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
9809	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
9865	190 – 205	9/14	2	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
9902	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
9918	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
3.2 ¹	173 – 197	12/14	6	-	0/4	-	-	0/4	-	194 – 200	23/23	3
3.3R2 ¹	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
3.4R2 ¹	111 – 144	11/14	4	-	0/4	-	123 – 132	13/15	2	123 – 150	20/23	6
3.5 ¹	218 – 245	12/14	4	-	0/4	-	143 – 161	12/15	4	155 – 248	16/23	5
3.6R2 ¹	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
4.3 ¹	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	282 – 350	15/23	10
5.2 ¹	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-	-	0/4	-
Amplification success		32 %			3 %			8 %			38 %	

¹(González-Wangüemert et al., 2014)

Our study showed a cross-species transferability success much lower (3 – 38 %) than those reported in most organisms within the same genus. Considering the low genetic distance between some species tested, this clearly shows a low conservation of flanking microsatellite regions in genus *Pinna*. For example, cross-taxon transferability success reached 73 – 86 % within *Millepora* species within a similar genetic distance range (below 5 % from the target species, (Dubé et al., 2017)). Other species have shown high success of cross-species amplification within the same genus (77 – 87 % in *Decapterus*, (Niu et al., 2019); 55 – 66 % in *Holothuria*, (Oury et al., 2019); 48 % in Sparidae, (Reid et al., 2012); 12 – 62 % in *Carcharhinus*, (Pirog et al., 2016)). However, such a low transferability success has already been observed in bivalve species (25 % among *Mytilus* species, (Kang et al., 2013) ; 0 – 16 % among *Pecten* species,(Marín et al., 2012)).

Cross-species transferability success was higher for the two closest species (*P. rudis*: 38 % and *P. carnea*: 32 %) and lower for the most divergent one (*P. muricata*: 4 %; (Lemer et al., 2014)). Therefore, caution is required with the results of cross-species transferability tests presented here as null allele frequencies have not been investigated for the other *Pinna*

species because of the small sample sizes. However, this result seems to show a moderate cross-species transferability potential for close species which is dramatically reduced as the genetic distance increases. The negative relationship between the phylogenetic distance among species and cross-species amplification success has already been highlighted in previous studies (Dubé et al., 2017; Niu et al., 2019; Rodríguez-Moreno et al., 2017).

The problems of high frequencies of null alleles and low cross-species transferability rates within species have been documented. They could be due to mutations at primer binding sites or the occurrence of cryptic repetitive DNA sequences on either side of the target microsatellite sequence causing failed amplification or amplification of fragments of unexpected size (McInerney et al., 2011; Niu et al., 2019; Zhang, 2004). It is possible to correct genotype and to remove null alleles by designing new primer pairs (Lemer et al., 2011). However, it is time consuming and using only one modified reverse primer was not sufficient in our study and several alternative primer pairs might need to be tested.

This study will be very important in the present mortality context of *Pinna nobilis*. Since October 2016, the giant fan mussel has been engulfed in a crisis that threatens its survival as a species, throughout the entire Mediterranean Sea (Catanese et al., 2018; García-March et al., 2020a; Vázquez-Luis et al., 2017). Although an interest in *P. nobilis* is growing within the scientific community and while several studies have recently been published, there is still a huge gap in the general knowledge of the species. Obtaining better knowledge about the dynamics and connectivity patterns of *P. nobilis* populations is critical, now more than ever. The 26 new high resolution genetic markers developed in this study will provide a useful tool to understand processes driving gene flow, genetic diversity or maintaining potential for the populations through parentage or assignment analyses (Vázquez-Luis et al. in prep.), which is crucial to adapt conservation strategies. In addition, the present work will also contribute to an increase in knowledge for the sister species, *P. rudis*, that was targeted in this study in an effort to better understand its resistance to the actual parasite mortality.

7. Supplementary information

Table S 2 : List of samples used in the study to optimize PCR amplification and cross-species amplification tests

Taxon	Location 1	Location 2	Region	Date of collection	Collector	Specimen ID	MCZBASE link to specimen
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	158	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	162	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	164	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	168	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	169	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	173	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	176	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	177	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	179	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	181	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	182	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	184	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	190	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	193	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	194	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	195	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	196	-

<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	197	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	198	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	199	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	299	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	300	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B10	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B11	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B12	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B2	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B3	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B4	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B5	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B6	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B7	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B8	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	1	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	18	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	25	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	44	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	306	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	109	-
<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	339	-

<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	France	Peyrefitte	Mediterranean Sea	2015	Iwankow G.	B43	-
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381148	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381148
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381149	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381149
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381150	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381150
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381151	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381151
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381152	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381152
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381153	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381153
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381154	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381154
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381155	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381155
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381156	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381156
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381157	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381157
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381160	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381160
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381161	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381161
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Panama	Bocas del Toro	Caribbean	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381162	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381162
<i>Pinna carnea</i> Gmelin, 1791	Guadeloupe	Port-Louis	Atlantic Ocean	2012	Lemer S.	MCZ MAL-387075	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387075
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	French Polynesia	Tahiti	Pacific	2012	Lemer S.	MCZ MAL-381009	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381009
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Puerto Galera	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381030	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381030
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Puerto Galera	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381031	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381031
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Puerto Galera	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381058	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381058
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Puerto Galera	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381059	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381059
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Puerto Galera	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381060	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381060
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Panglau	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL- 381092	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381092
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Panglau	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381093	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381093

<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Panglau	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381094	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381094
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Panglau	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381095	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381095
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Panglau	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381096	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381096
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Mactan Island	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381115	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381115
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Mactan Island	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381116	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381116
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Mactan Island	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL-381117	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381117
<i>Pinna muricata</i> Linnaeus, 1758	Philippines	Mactan Island	Pacific	2013	Lemer S.	MCZ MAL- 381118	http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:381118
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1007	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1008	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1009	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1010-b	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1011	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1012	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1013	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1014	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1015	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1016	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1017	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1018	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1019	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1020	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Cabrera	Spain	Mediterranean Sea	2018	Vázquez-Luis M.	1021	-
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Murcia	Spain	Mediterranean Sea	2005	Echeita A.	MCZ MAL-387219	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387219

<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	El Hierro	Spain	Atlantic Ocean	2005	Iván A.	MCZ MAL-387220	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387220
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	El Hierro	Spain	Atlantic Ocean	2005	Iván A.	MCZ MAL-387221	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387221
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Tenerife	Spain	Atlantic Ocean	2007	Iván A.	MCZ MAL-387229	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387229
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Tenerife	Spain	Atlantic Ocean	2007	Iván A.	MCZ MAL-387230	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387230
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Azores	Portugal	Atlantic Ocean	2013	Luiz R.	MCZ MAL-387264	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387264
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Azores	Portugal	Atlantic Ocean	2013	Luiz R.	MCZ MAL-387265	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387265
<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758	Azores	Portugal	Atlantic Ocean	2013	Luiz R.	MCZ MAL-387266	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:387266
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382122	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382122
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382123	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382123
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382124	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382124
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382125	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382125
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382129	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382129
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382130	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382130
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382131	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382131
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382132	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382132
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382133	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382133
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382134	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382134
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382135	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382135
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382136	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382136
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382144	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382144
<i>Pinna rugosa</i> G.B. Sowerby I, 1835	Baja California	Mexico	Pacific Ocean	2014	Lemer S.	MCZ MAL-382145	https://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Mala:382145

*Table S 3 : Linkage disequilibrium between all pairs of loci. * significant values after sequential Bonferroni correction.*

Disponible en ligne à l'adresse suivante :

https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs11033-020-05338-1/MediaObjects/11033_2020_5338_MOESM2_ESM.xlsx

CHAPITRE 3 :

CARACTERISATION DE LA STRUCTURE GENETIQUE DE
L'ESPECE LE LONG DU LITTORAL OCCITAN, EN
INCLUANT LES POPULATIONS LAGUNAIRES



© D. Fioramonti

1. Contexte

L'étude réalisée dans le premier chapitre a permis d'établir la distribution spatiale des grandes nacres le long du littoral occitan et d'identifier les principales populations. Elle a également mis en évidence l'importance des lagunes dans la dynamique de l'espèce car près de 90 % de l'abondance totale de l'espèce, à l'échelle de la côte occitane, étaient situés dans les étangs de Thau et de Salses-Leucate. Ces habitats auront donc un rôle clé dans les stratégies de conservation et représentent un espoir pour la persistance de l'espèce car, jusqu'à présent, les populations lagunaires demeurent peu affectées par le parasite responsable de la pandémie. Cependant, les lagunes sont généralement des habitats instables où les conditions environnementales peuvent changer rapidement et drastiquement, jusqu'à devenir défavorables pour la faune benthique. De plus, ces habitats rendent la distribution de l'espèce sur la côte particulièrement fragmentée, ce qui pourrait conduire à l'isolement des populations.

Il est probable que les individus lagunaires auront un rôle important à jouer dans la survie de l'espèce et potentiellement dans le repeuplement des populations en mer, via l'exportation, vers les habitats côtiers, de larves produites dans les lagunes. Pour mettre en place des mesures de conservation, il est donc indispensable de connaître le niveau de connectivité entre les populations car l'isolation pourrait créer des différenciations génétiques entre les populations. Cependant, il n'existe que peu d'information concernant la structure génétique des populations et les capacités de dispersion des grandes nacres et aucune n'a été réalisée sur la côte occitane.

Seules deux études ont évalué la connectivité, avant la pandémie, entre les populations de *P. nobilis*, entre les îles Baléares (González-Wangüemert et al., 2019) et entre la côte espagnole, les îles Baléares et Banyuls (Wesselman et al., 2018), en couplant des analyses génétiques et des modélisations de l'hydrodynamisme. Ces deux études ont montré une forte connectivité entre les sites, influencée par les courants marins, avec des populations sources qui exportent beaucoup de larves et des populations puits qui sont maintenues essentiellement grâce aux apports de larves des populations voisines. Wesselman et al. (2018) identifient la baie des Alfacs, en Espagne, comme un site clé car les grandes nacres y sont particulièrement abondantes (près de 90 000 individus) et, d'après les résultats de leur étude, la population exporterait un nombre important de larves, contribuant ainsi au

maintien de plusieurs populations des îles Baléares. La baie des Alfacs abrite aujourd'hui les dernières grandes nacres saines de la côte espagnole qui semblent peu affectées par les mortalités, probablement grâce aux conditions environnementales défavorables au développement du parasite. Ce résultat aura donc des implications particulièrement fortes pour la conservation dans le contexte actuel de la pandémie car le repeuplement des populations alentours pourrait dépendre de la survie de cette population. De la même façon que dans la baie des Alfacs, les lagunes du littoral Occitan abritent parmi les dernières populations denses de grandes nacres saines qui sont également peut affectées par le parasite et pourraient donc contribuer au repeuplement des populations alentours. Il est donc nécessaire d'avoir de meilleures connaissances sur le fonctionnement des populations et la contribution des populations lagunaires au maintien de l'espèce, à l'échelle du littoral occitan.

En se focalisant sur les principales populations identifiées dans le chapitre 1 et en utilisant les marqueurs génétiques polymorphes développés lors du précédent chapitre, l'objectif de ce chapitre 3 est de déterminer la structure génétique et les patrons de dispersion de l'espèce, à l'échelle du Golfe du Lion. Pour cela, la diversité génétique a été estimée pour chacune des populations et suivant le type d'habitat colonisé. Nous avons également déterminé dans quelle mesure la fragmentation de l'habitat tend à créer de la différenciation et de la structuration génétique entre les populations afin d'en déduire les patrons de dispersion et le fonctionnement de l'espèce.

2. Publication associée

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans la revue Scientific Reports.

Peyran, C., Boissin, E., Morage, T., Nebot-Colomer, E., Iwankow, G., Planes, S., 2021. Genetic homogeneity of the critically endangered fan mussel, *Pinna nobilis*, throughout lagoons of the Gulf of Lion (North-Western Mediterranean Sea). Scientific Reports 11, 7805. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87493-4>

Genetic homogeneity of the critically endangered fan mussel, *Pinna nobilis*, throughout lagoons of the Gulf of Lion (North-Western Mediterranean Sea).

Claire Peyran¹, Emilie Boissin^{1,2}, Titouan Morage¹, Elisabet Nebot-Colomer^{1,3}, Guillaume Iwankow¹, Serge Planes^{1,2}

¹ PSL Research University: EPHE - UPVD - CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

² Laboratoire d'Excellence « CORAIL »,

³ Instituto Español de Oceanografía (IEO). Centro Oceanográfico de Baleares. Muelle de Poniente s/n, 07015. Palma de Mallorca, Spain

Corresponding author: claire.peyran@gmail.com

Author contributions

S.P. designed the study, T.M., E.N.C., G.I. and C.P. did the fieldwork, C.P. performed genetic analyses and drafted the paper, E.B. and S.P. contributed to data interpretation and reviewed the paper.

Compliance with ethical standards

The sampling was non-lethal and approved by the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) of Occitanie (prefectural order n°2018-s-24).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This research was implemented thanks to the financial support of the Region Occitanie, the General Council of Pyrénées-Orientales and the French Ministry for Ecological Transition. C. Peyran was supported by a PhD scholarship granted by Sorbonne University. We are grateful for the support of the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) Occitanie and all of the ports involved in the study: the ports of Sète, Port-la-Nouvelle, Port-Vendres and Frontignan. We also thank the staff from the Cerbère-Banyuls Natural Marine Reserve and the Agathoise Coast Marine Protected Area for their collaboration and permission to work within their protected areas.

3. Abstract

The fan mussel, *Pinna nobilis*, endemic to the Mediterranean Sea, is a critically endangered species facing mass mortality events in almost all of its populations, following the introduction of the parasite *Haplosporidium pinnae*. Such a unique pandemic in a marine organism, which spreads rapidly and with mortality rates reaching up to 100 %, could lead to the potential extinction of the species. Only few regions, involving lagoon habitats, remain healthy throughout the entire Mediterranean Sea. This study describes the genetic structure of *P. nobilis* across the Gulf of Lion, including confined locations such as lagoons and ports. A total of 960 samples were collected among 16 sites distributed at 8 localities, and then genotyped using 22 microsatellite markers. Genetic diversity was high in all sites with mean allele numbers ranging between 10 and 14.6 and with observed heterozygosities (H_o) between 0.679 and 0.704. No genetic differentiation could be identified (F_{ST} ranging from 0.0018 to 0.0159) and the percentages of related individuals were low and similar among locations (from 1.6 % to 6.5%). Consequently, all fan mussels, over the entire coastline surveyed, including those in the most geographically isolated areas, belong to a large genetically homogeneous population across the Gulf of Lion. Considering the ongoing mass mortality context, this result demonstrates that almost all of the genetic diversity of *P. nobilis* populations is still preserved even in isolated lagoons, which might represent a refuge habitat for the future of the species.

Keywords: Conservation; Larval Dispersal; Microsatellites; Population Structure; Relatedness; Sea-Lagoon Connectivity

4. Introduction

Recent extinction rates have been shown to be 100 to 1000 times their pre-human levels in taxonomically diverse groups through a wide variety of different habitat types, and they continue to accelerate (Ceballos et al., 2015). These extinctions are mainly caused by anthropic activities such as pollution, artificialization, overexploitation, habitat loss and global change, which can lead to the isolation of populations, reduction in their size, and thus a loss of genetic diversity (Baillie et al., 2004). The conservation genetics concept has been pushed forward in the context of population genetics with the goal of better understanding the dynamics of genes in populations to avoid extinctions. The idea is to apply genetic methods to the conservation and restoration of biodiversity, with genetic diversity being the proxy for the level of extinction risk. Genetic diversity enhances the stability and reliability of ecosystems by providing biological insurance against environmental change (Hughes and Stachowicz, 2004). Hence, maintaining a high level of genetic diversity is one of the main targets of conservation biology. Knowledge concerning the level and the distribution of genetic diversity within and among populations of a given species, and on the processes that ensure its maintenance are now more than ever, necessary in order to design conservation strategies.

In marine systems, coastal environments are generally viewed as discontinuous and most organisms are sessile or have very limited movement abilities. There is thus a strong interaction between habitat fragmentation of coastal environments and species life-history traits that can affect dispersal and population connectivity, as found for the pelagic early life stage which represents the main opportunity for movement (Cowen, 2006). This dispersal phase allows connectivity between distant areas and is thus a critical feature of the ecology of marine organisms and evolution, as it drives the genetic structure and composition of populations (Ronce, 2007). The degree of connectivity between populations has an impact on local population survival through replenishment processes, the maintenance of high levels of diversity and by determining their persistence and resilience in case of local disturbance (Cowen and Sponaugle, 2009; White et al., 2019). Enhancing dispersal will certainly favor the long-term persistence of species, in a framework where dispersal will be affected by parameters such as habitat fragmentation, effective population size, anthropic activities and climate change (Munday et al., 2009; Saunders et al., 2016).

The fan mussel, *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758), is a bivalve endemic to the Mediterranean Sea, that lives half-buried in soft-bottom habitats, generally covered by seagrass meadows. Because it is associated with seagrass meadows, *P. nobilis* is restricted to subtidal areas, up to 30 meters deep, as beyond the meadow development is limited by light intensity and water transparency. As a consequence, *P. nobilis* distribution is usually aggregative and fragmented. Even if this association is generally accepted, very dense aggregations of the species were recently reported in lagoons or in artificial and degraded habitats such as ports, which puts into question the species' habitat requirements (Peyran et al., 2021b).

P. nobilis is a successive hermaphrodite organism with asynchronous gamete maturation, thus preventing self-fertilization (De Gaulejac, 1995). Several consecutive spawnings occur during summer, producing millions of veliger larvae. For *P. nobilis*, larval duration has been estimated to be around 5 to 10 days during which larvae are spread by currents (Butler et al., 1993). However, there remains a significant lack of knowledge concerning the *P. nobilis* life cycle, as a recent study has shown that the larval stage could last up to 20 days under controlled conditions (Trigos et al., 2018), a much longer larval duration which would certainly enhance dispersal capabilities.

The species has been overexploited for years, for consumption or for jewelry fabrication. Over the last decades, human activities (anchoring, pollution, habitat reduction and fragmentation) have kept *P. nobilis* populations under high pressure which has led to population decay (Öndes et al., 2020). Since 1992, the fan mussel has been under strict protection, according to the European Council Directive 92/43/EEC (Annex IV) and the national laws of most Mediterranean countries. In recent years, *P. nobilis* abundance has increased and dense populations have been observed in anthropized habitats, such as lagoons and ports, which were previously thought to be unfavorable to their settlement as the species is generally considered as a bioindicator of the quality of coastal waters (IOPR, 2003). However, despite its endangered status, only few studies have investigated population genetics and connectivity patterns in *P. nobilis* (González-Wangüemert et al., 2019; Katsares et al., 2008; Rabaoui et al., 2011; Sanna et al., 2014, 2013; Wesselmann et al., 2018). Furthermore, information on the contemporary dynamics is limited, as none of the previous studies integrated the large populations recently described in lagoons.

Today, the species is facing a major ongoing pandemic that threatens its survival. Starting in October 2016, mass mortalities have been observed in fan mussel populations, probably caused by the protozoan parasite, *Haplosporidium pinnæ* (Catanese et al., 2018). However, the causes of the outbreak are far from being completely understood as one recent study supported the occurrence of a multifactorial disease with non-species-specific pathogens that could have triggered mass mortalities in *P. nobilis* populations (Scarpa et al., 2020) whereas another study stated that *H. pinnæ* is the only pathological agent considered as essential for the onset of the mortality (Grau et al., 2021). The very first signs of mortality were observed in southeast Spain (Vázquez-Luis et al., 2017) and the epidemic has now spread throughout the entire Mediterranean Sea (Cabanellas-Reboredo et al., 2019). To date, most of the infected populations have been devastated. This is an unprecedented situation for which neither the mortality rates (around 100 %) nor the speed of propagation (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; García-March et al., 2020b; Scarpa et al., 2020) have ever been recorded for a marine species, and it could lead to the potential extinction of *P. nobilis*. Following this critical situation, the status of the species has been reevaluated and has been recently moved to “critically endangered” on the IUCN red list (Kersting et al., 2019). However, a couple of populations in localities along the early infected Spanish coastline remain less affected by the parasite mortality (Alfacs Bay and Mar Menor, Spain (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; Catanese et al., 2018)). Even if the reasons are not yet well understood, greater survival rates might be linked to salinity ranges in those areas compared to the open sea (Cabanellas-Reboredo et al., 2019): Alfacs Bay is subjected to high freshwater inflow of the Ebro River whereas Mar Menor is a confined coastal lagoon where salinity can reach up to 40 PSU. Even if observations are limited, lagoons are now a priority habitat in Spanish conservation plans, as large populations have recently been described in this habitat type throughout the Mediterranean Sea.

While accounting for about 250 km of coastline in the Mediterranean Sea, the Gulf of Lion is characterized by numerous lagoons with various hydromorphological characteristics (Ifremer, 2014). Recent surveys in these habitats revealed the presence of *P. nobilis* in high densities, even much higher than those observed in the usual seagrass meadows (T. Morage, pers. com.). Recent monitoring data demonstrated that almost 90 % of the population of *P. nobilis* is found in the lagoons of Thau and Salses-Leucate along the Gulf of Lion (Peyran et al., 2021b) and, to date, these areas are still free from parasite contamination. Considering

the current pandemic situation for *P. nobilis*, these lagoons may represent a key habitat in a conservation strategy and may provide hope for the persistence of the species. In the meantime, as these lagoons are unstable environments, facing variations in nutrient concentrations or fresh water inflows (Ifremer, 2014), the long-term survival of the species may be uncertain. Lastly, these lagoons are rendering the distribution of *P. nobilis* highly fragmented and isolated in small patches, and require better knowledge about the population structure and dispersal patterns of the species. Here, we used highly polymorphic markers to (i) assess the genetic diversity of fan mussel aggregations in the different types of habitats, (ii) estimate whether the habitat fragmentation tends to create genetic differentiation and spatial genetic structuring between aggregations and (iii) assess the regional patterns of dispersal throughout the Gulf of Lion. This work is the first genetic study of *P. nobilis* populations in the highly fragmented environment of the Gulf of Lion where lagoon habitats were also considered, before the spread of the pandemic along the French Mediterranean coast.

5. Materials and Methods

5.1. Sampling

As *P. nobilis* is an endangered species, we received necessary permissions for sampling from the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) of Occitanie (prefectural order n°2018-s-24). All Methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Samples were collected from all sites where aggregations of *P. nobilis* were observed following a year of extensive and systematic searching in all habitats along the coast of the Gulf of Lion, from the Spanish border to the Rhône estuary. A total of 960 tissue samples were collected from 16 sites along the coast during the summer of 2018 (see **Figure 9** and **Table 5** for collection information). We assume that these 16 sites provide a fairly complete sampling of the majority of the main aggregations of *P. nobilis* in the area. Sampled sites were segregated by location, type of habitat (sea, lagoon, port or lagoon linked to the sea via a port) or population density for further genetic analyses. Sites were structured in 8 localities which refer to the geomorphological entities where they were sampled (**Table 5**). For each site, SCUBA divers biopsied ~ 1 cm³ of mantle tissue on random individuals, without moving the individual. This

method was shown to be non-lethal after an initial test and survey (T. Morage, pers. com). As a preventive measure, the smallest individuals were not sampled to avoid lethal biopsies. Each tissue sample was stored in absolute ethanol at room temperature.

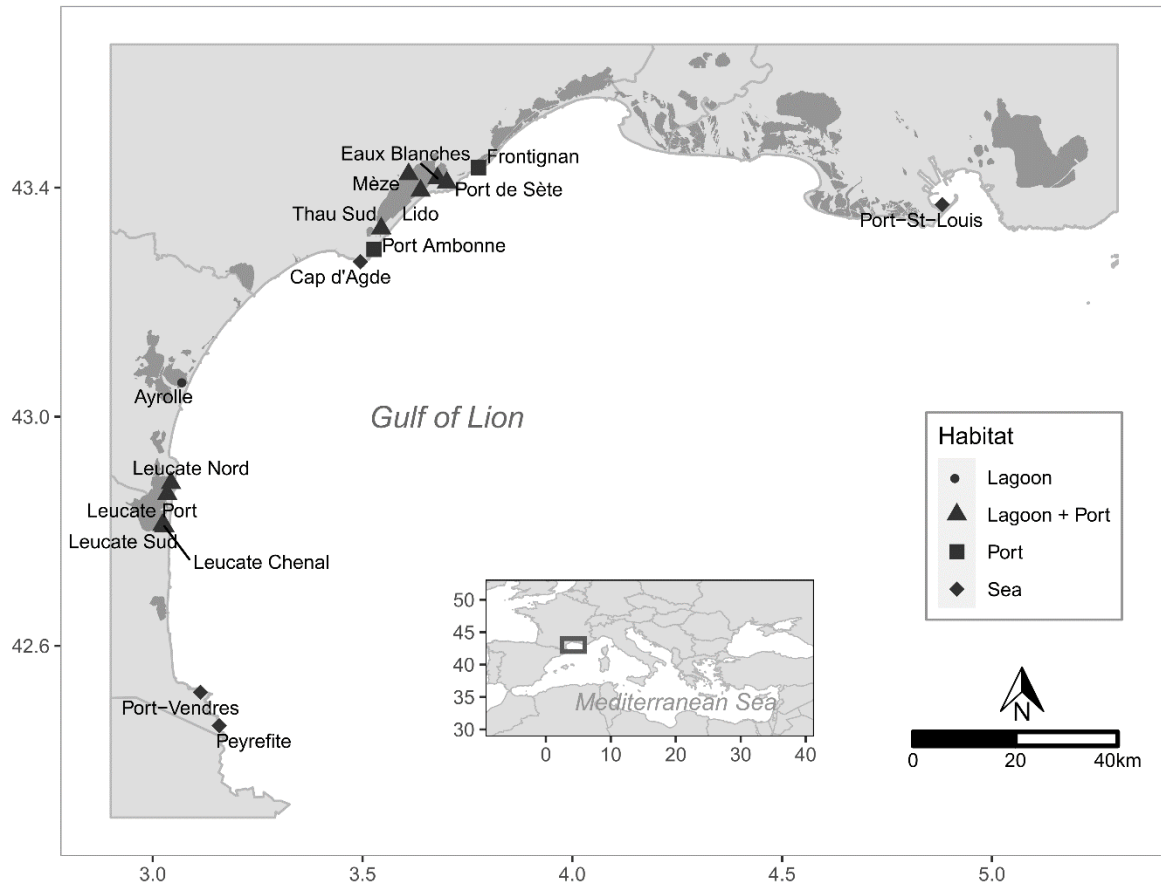


Figure 9 : Location of 16 sampled sites for *Pinna nobilis* in the Gulf of Lion, north-western Mediterranean Sea. This map was created using R 4.0.3 (<https://www.r-project.org/>) using coastline and surface water data provided by <https://www.data.gouv.fr/fr/>.

Table 5 : Collection information for the 16 sampling sites in the Gulf of Lion (north-western Mediterranean Sea) where the 960 *Pinna nobilis* individuals were collected for this study.

Geomorphological entity	Site	Type of environment	Number of individuals sampled	Population density (/100 m ²)	Estimated abundance	Percentage of abundance sampled	GPS	
							Longitude	Latitude
Côte des Albères	Peyrefite	Sea	157	1.25	17 000	1 %	3.158431	42.460506
	Port-Vendres		19	0.15			3.113699	42.518787
	Leucate Chenal		50	4.58			3.02771	42.808951
Leucate	Leucate Sud	Port + Lagoon	53	14.5	140 000	0.2 %	3.02322	42.81098
	Leucate Port		105	70.83			3.03474	42.86486
	Leucate Nord		54	7.72			3.043567	42.884103
Ayrolle	Ayrolle	Lagoon	51	0.63	2 500	2 %	3.07408	43.06163
Cap d'Agde	Cap d'Agde	Sea	116	4.83	200	58 %	3.49488	43.27064
Port Ambonne	Port Ambonne	Port	35	1.22	50	70 %	3.5272	43.29226
	Thau Sud		47	7.29			3.544564	43.328782
	Lido		54	1.42			3.638553	43.394586
Thau	Mèze	Port + Lagoon	24	1.59	90 000	0.2 %	3.609889	43.423402
	Eaux Blanches		34	2.64			3.678688	43.41625
	Port de Sète		61	4.03			3.701066	43.408866
Frontignan	Frontignan	Port	49	5.97	150	32.7 %	3.776224	43.434929
Port-St-Louis	Port-St-Louis	Sea	51	1.74	4 000	1.3 %	4.88147	43.37038

5. 2. Size estimation

The size of each individual sampled was calculated to identify different size groups that will correspond to fan mussels that settled over successive years and which could therefore represent different clouds of larvae. Because *P. nobilis* lives half-buried in the sediment, it is impossible to directly measure the total length of the shell and thus the size of each sampled individual had to be estimated from three morphometric measurements: the maximum width, the minimum width and the unburied length, as described in Garcia-March et al. (García-March et al., 2002). The following equation, described in De Gaulejac (De Gaulejac, 1993), is used to determine the total length:

$$\log(Ht) = 0,4003 + 0,5028 \cdot \log(H) + 0,26 \cdot \log(l) + 0,2171 \cdot \log(L)$$

where Ht is the total length; H the unburied length; l the minimum width and L the maximum width.

The size estimates were used to further differentiate size groups and to investigate genetic structure in relation to size structure in order to search for genetic heterogeneity of recruitment.

5. 3. Molecular analyses

Extraction of genomic DNA from the 960 samples was performed using the QIAcube HT robot following the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). All samples were genotyped using 30 microsatellite markers from Peyran et al. (2020) and González-Wangüemert et al. (2014).

PCRs were performed following the same method as described in Peyran et al. (2020). Microsatellite markers were amplified using Type-it Microsatellite PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a final volume of 12.5 μ L including 4 μ L Type-it Multiplex PCR Master Mix (2X), 6 μ L RNase-free water, 1 μ L of each primer (2 μ M forward and reverse primers diluted in TE pH 8 buffer) and 1.5 μ L of DNA template with a concentration of around 50 ng/ μ L. PCR programs consisted of an initial denaturing step of 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 1 min 30 s at annealing temperature (53-63 °C, depending on the locus (González-Wangüemert et al., 2014; Peyran et al., 2020)), 30 s at 72 °C and a final elongation step at 60 °C for 30 min. Loci were combined in multiplex panels according to their allele size and primer annealing temperature. Individuals were genotyped by assessing the allele size.

Forward primers were labelled with fluorescent dyes (PET, NED, VIC, 6-FAM, Applied Biosystems) and PCR products were sent to a private company, GenoScreen (Lille, France), for fragment genotyping where they were visualized using an Applied Biosystems 3730 Sequencer. GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) was used for accurate sizing. Allele sizes were scored and checked manually using GENEMAPPER v.5 (Applied Biosystems). Samples presenting ambiguous peak profiles were re-amplified, genotyped and re-scored and all peak profiles that were still unclear were treated as missing data.

5. 4. Data analysis

As mollusks often present amplification troubles during PCR, the quality of the microsatellite markers was investigated using MICROCHECKER v 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) to search for the presence of null alleles, scoring errors and large allele dropout. On the original panel of 30 markers, eight loci presented evidence of null allele high frequencies and were removed from the study to avoid any bias in further analyses. The final set of markers contained 22 polymorphic loci (**Table S 4**).

A preliminary genetic analysis was performed to confirm that some sites within the same area could be agglomerated into localities. As no genetic differentiation was identified (**Table S 5**), samples were grouped into 8 localities considered as units for further analyses.

Genetic diversity was investigated using GENALEX 6.503 (Peakall and Smouse, 2012), for each locality and between size groups within locality through mean allele numbers (N_a), number of private alleles (A_p), and expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosities. As sample size ranged from 35 to 262 across localities, standardized allelic richness (A_r) and standardized private allelic richness (A_{pr}) were estimated using ADZE software (Szpiech et al., 2008), based on a standardized sample size of 35 (smallest sample size). Hardy-Weinberg exact test was also performed for each loci using GENEPOP software (Rousset, 2008). The p-value of the exact test of Hardy-Weinberg was estimated based on a Markov Chain algorithm (dememorization = 10000, number of batches = 1000 and iterations per batch = 10000). Values for inbreeding coefficient (F_{IS}) were calculated for all loci and for each localities using the method of Weir and Cockerham (1984), implemented in GENETIX (Belkhir et al., 2004) and significance of values was established by permutations (1000 permutations per population). Differentiation index (F_{ST}) was calculated between locality pairs and between size groups by using the Robertson and Hill estimator for F_{ST} (1984) corrected by Raufaste and Bonhomme,

(2000), RH' , implemented in GENETIX, as this estimator is unbiased and shows a lower variance when values of F_{ST} are low (< 0.05). The Bonferroni sequential correction for multiple tests was then applied to correct the p-values (Rice, 1989).

An exploration for any genetic structuring was also performed with a MultiDimensional Scaling (MDS), using the *stats* package implemented in R software v. 1.1.453 (R Core Team, 2018) and based on the matrix of Nei's genetic distances between localities which was calculated using GENALEX. The molecular genetic variance was analyzed between and within localities using the AMOVA framework in Arlequin suite v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010).

Genetic structure was also explored using a model-based clustering method implemented in STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). An admixture model with no prior information about sampling location was used with a burn-in period of 50 000 iterations, followed by a 100 000 Monte Carlo Markov Chain (MCMC) replicates for $K = 1$ to $K = 8$ clusters and 10 iterations for each K . The choice of the most likely number of clusters (K) was made by calculating an ad hoc statistic (ΔK) using Structure Harvester online (Earl and VonHoldt, 2012) and based on the rate of change in the log probability of data between successive K as described by Evanno et al. (2005). Several authors pointed out that uneven subpopulations sampling may bias STRUCTURE results and lead to overestimate the number of clusters (Puechmaille, 2016). StructureSelector (Li and Liu, 2018), a web based software, was thus also used to estimate the number of clusters (K) based on four estimators, MedMedK, MedMeaK, MaxMedK and MaxMeaK, developed by Puechmaille (2016) and that were shown to be less sensitive to uneven sampling.

A Mantel test was performed to test the isolation by distance hypothesis, based on geographic (distances with straight lines or those which followed the coastline were both tested) and Nei's genetic distances between locations. The analysis was conducted using the R package *ape* (Paradis and Schliep, 2019).

Lastly, the genetic relatedness was calculated between all pairs of individuals by the r_{xy} coefficient (Queller and Goodnight, 1989) using the R package *Demerelate* (Kraemer and Gerlach, 2017) to investigate family structure within localities and within sites. The relatedness coefficient indicates the proportion of shared alleles between two individuals. Thus, with a sufficient number of highly polymorphic loci, a $r_{xy} > 0.25$ between two individuals assumes that they have at least one parent in common. The percentage of individuals sharing

at least one parent (Pr_{xy}) was calculated within each locality (i.e. the percentage of relations with $r_{xy} > 0.25$) and for each size group that could be identified in some localities. This percentage gives a proxy of the admixture in each locality as relatedness indexes are calculated between individuals of different size classes. Because the percentage of individuals biopsied in relation to the estimated abundance is different among localities and very low in some cases (**Table 5**), the effects of sampling effort on the final results needed to be estimated. We thus modeled Pr_{xy} depending on the number of individuals in a given sample, using a repeated random sub-sampling method, similar to rarefaction curves. For each locality, new datasets of 10 individuals were created by randomly selecting individuals in the existent database. Other datasets were then created by successively adding individuals that were randomly drawn (without replacement) in the existing database (3 individuals for localities where sample size was small, or 5 individuals for localities where sample size was high). For each locality, we thus had new datasets with 10, 13, 16, etc or 10, 15, 20, etc individuals until approaching the sample size. The procedure was repeated five times to increase the number of new datasets. Relatedness coefficients were calculated between all pairs of individuals within each of these new datasets and Pr_{xy} was estimated. A non-linear regression was then performed to model the relation between the number of individuals sampled and Pr_{xy} in each locality in order to estimate the threshold of sampling effort where adding more individuals does not increase the percentage of related individuals found. The non-linear regression was also used to extrapolate the maximum Pr_{xy} in localities where sample size was too small.

6. Results

6.1. Genetic diversity

13 out of 22 markers (see **Table S 4**) as well as 5 out of 8 localities (**Table 6**) showed low but significant F_{IS} values, indicating a significant heterozygote deficiency and departure from Hardy-Weinberg equilibrium. The analyses revealed a high level of genetic diversity as the mean allele number per locality (Na) ranged from 10 to 14.6 (**Table 6**). Standardized allelic richness (Ar) was very similar between localities as it ranged from 8.1 to 8.5. The number of private alleles (Ap) was higher in Leucate and Thau, which are the two most isolated localities. However, the standardized private allelic richness (Apr) ranged from 0.26 to 0.37

and is thus very similar within localities. The observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities ranged from 0.679 to 0.704 and from 0.705 to 0.726, respectively. Overall, the number of alleles and the heterozygosity values were very homogeneous among localities and there was no decrease in diversity in isolated lagoon areas.

Table 6 : Summary statistics of genetic diversity indices of Pinna nobilis in each locality. N: number of individuals sampled; Na: mean number of alleles; Ap: number of private alleles; Ar: standardized allelic richness; Apr: standardized private allele richness; Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity and F_{IS} : inbreeding coefficient.

Locality	N	Na	Ap	Ar	Apr	Ho	He	F_{IS}
Côte des Albères	176	13.5	5	8.5	0.37	0.679	0.707	0.02903***
Leucate	262	14.6	20	8.3	0.26	0.685	0.707	0.04461***
Ayrolle	51	10.9	1	8.5	0.28	0.684	0.705	0.05279***
Cap d'Agde	116	12.6	6	8.5	0.35	0.688	0.711	0.01862*
Port Ambonne	35	10.0	1	8.4	0.29	0.691	0.705	0.009
Thau	220	14.3	14	8.3	0.27	0.704	0.726	0.03524***
Frontignan	49	10.5	1	8.1	0.26	0.701	0.707	-0.009
Port-St-Louis	51	10.9	3	8.2	0.29	0.703	0.717	0.007

Significant values of F_{IS} are indicated with *p-value < 0.05; **p-value < 0.01;

***p-value < 0.001.

6. 2. Genetic differentiation

All of the pairwise F_{ST} values were low (ranging from 0.0018 to 0.0159) and only two were significant after Bonferroni sequential correction: between Thau and Leucate and between Thau and Cap d'Agde (**Table 7**). The multivariate analysis (MDS) based on Nei's genetic distance (**Figure 10**) did not reveal any clear partitioning of the localities. All localities were grouped together with the exception of Port-St-Louis and Frontignan which were distant from all other localities, a result inconsistent with the F_{ST} values described above. However, as the MDS is a graphical representation, these distances between Port-St-Louis, Frontignan and other localities may not be significant.

Table 7 : F_{ST} values of pairwise comparisons (Robertson and Hill estimator for F_{ST} , 1984 corrected by Raufaste & Bonhomme, 2000) between the 8 localities where *Pinna nobilis* specimens were collected.

F_{ST}	Leucate	Ayrolle	Cap d'Agde	Port Ambonne	Thau	Frontignan	Port St Louis
Côte des Albères	0.00181	0.00919	0.00338	0.00634	0.00225	0.0085	0.00773
Leucate		0.00443	0.00407	0.01594	0.01269*	0.00853	0.0099
Ayrolle			0.00397	0.00495	0.00624	0.00771	0.00308
Cap d'Agde				0.01354	0.01952*	0.00866	0.00577
Port Ambonne					0.01181	0.00551	0.00383
Thau						0.01332	0.00846
Frontignan							0.00463

The * indicates significant values after Bonferroni sequential correction.

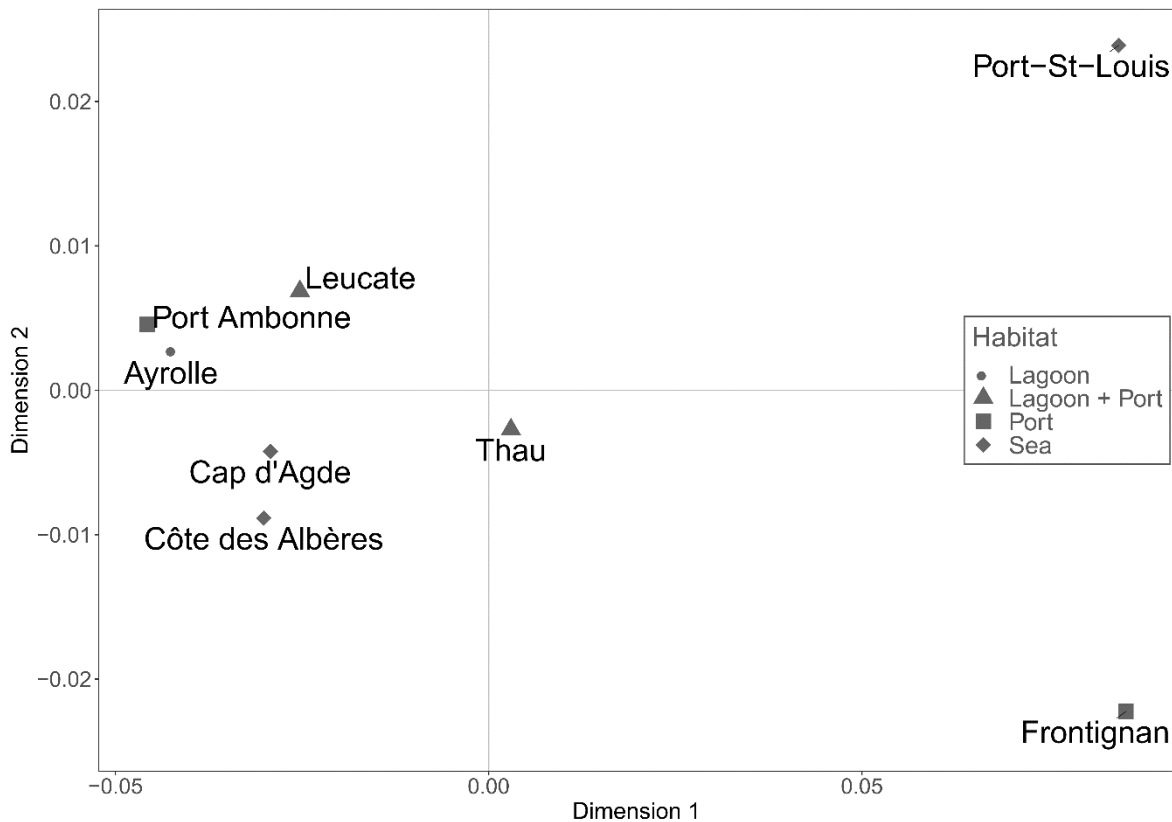


Figure 10 : Multidimensional Scaling (MDS) based on Nei's genetic distances among the 8 localities where *Pinna nobilis* individuals were collected.

The AMOVA analyses showed that 99 % of the total variation was supported by the variability among individuals (Table S 6 et Table S 7). The model-based clustering method analysis for population structure identified 4 clusters using Evanno's method and 2 clusters using Puechmaille's method (Figure S 1). However, the analysis did not clearly assign each

individual to a distinct cluster and there was a considerable level of admixture that did not allow clusters to be identified in relation to spatial distribution of individuals in localities. The isolation-by-distance test did not reveal any significant correlation between the genetic and geographic distances when distances were calculated using straight lines (Mantel test; $Z = 45468.91$; $p\text{-value} = 0.3863$) but was significant with distances following the coastline (Mantel test; $Z = 64534.25$; $p\text{-values} = 0.0209$). Overall, none of the analyses revealed a clear and consistent genetic differentiation between sampled localities that can be linked to the geographic localization or habitat type.

6.3. Relatedness

The non-linear regression between Pr_{xy} and sampling effort (**Figure S 2**) showed that all the curves quickly reached an asymptote with a sampling effort of approximately 50 individuals per sample, which is about the minimum sample size we have when considering localities, except in Port Ambonne (35 individuals). Pr_{xy} was then estimated following the nonlinear regressions obtained for each locality and for all individuals mixed (**Figure 11**). Pr_{xy} was similar among localities (ranging from 2.8 % to 4.7 %) except for Frontignan (1.6 %) and Port Ambonne (6.5 %). Similar results were found when calculating Pr_{xy} within sites (**Table S 8**). Then, when considering all individuals within a single sample Pr_{xy} was similar to the mean percentage in each locality (3.1 %).

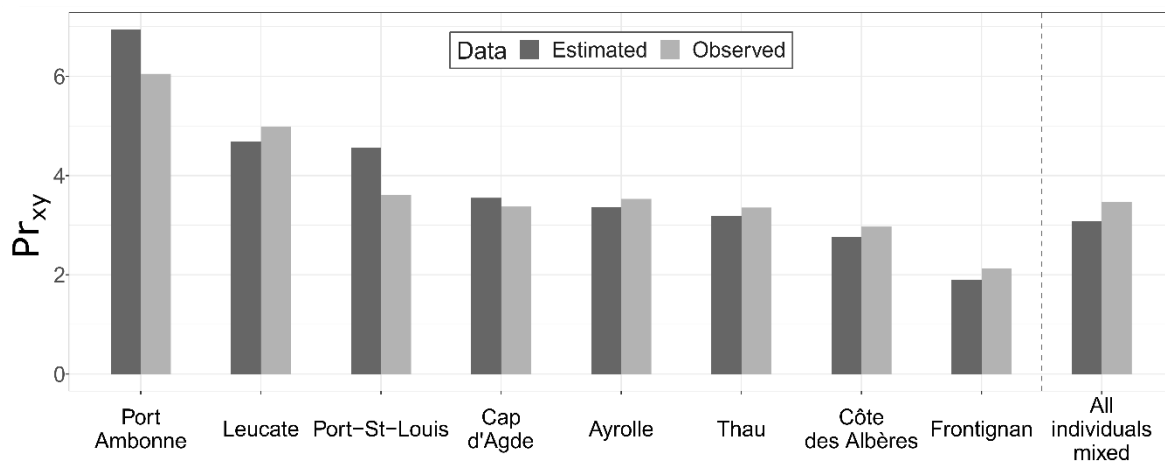


Figure 11 : Percentage (Pr_{xy}) of *Pinna nobilis* individuals sharing at least one common parent (i.e percentage of relations with $r_{xy} > 0.25$) calculated for each locality and for all sampled individuals mixed. Based on Queller and Goodnight (1989) r_{xy} index for relatedness.

6. 4. Size classes

The mean sizes ranged between 30 and 45 cm except in Thau and Ayrolle where there was a larger number of small individuals (Figure 12). Two clear size classes were segregated in Thau, Port-St-Louis and Ayrolle (Figure 12). In the three localities, the genetic diversity was similar between size groups (Table 8) and there was no genetic difference between the two size classes in each locality as all F_{ST} values were non-significant (Table 8). Then, Pr_{xy} in each size class were not different from each other and were also similar to Pr_{xy} values when size classes were grouped as a single sample (Table 8). Only in Port-St-Louis, smaller individuals showed a very low Pr_{xy} (< 1 %).

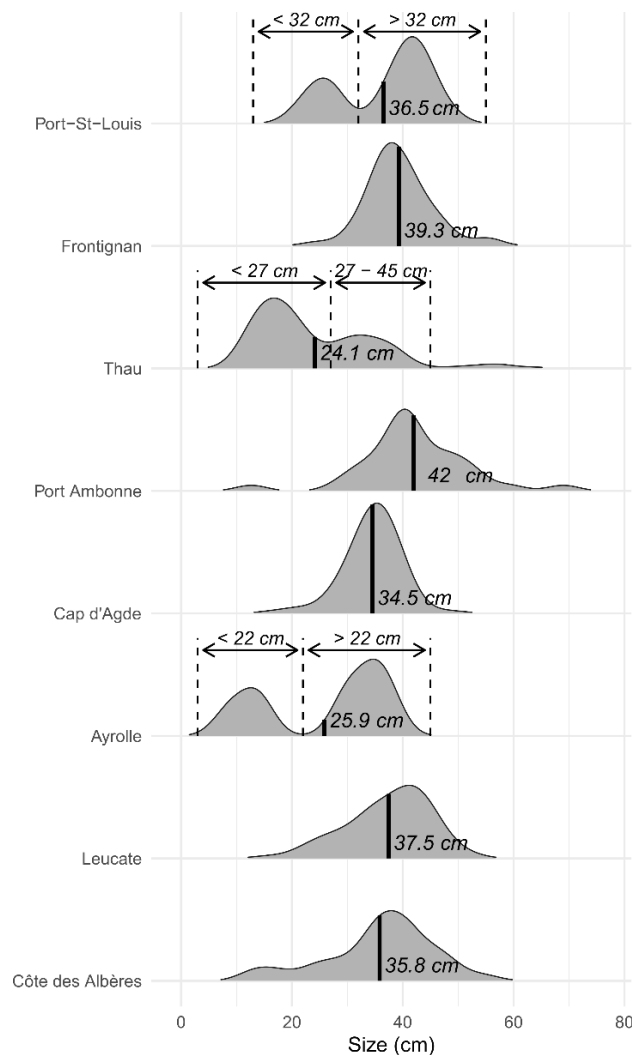


Figure 12 : Ridgeline plot showing the size density distribution of *Pinna nobilis* individuals sampled in each locality. Mean sizes in each locality are represented by solid lines. Arrows represent the range of the size groups identified in Port-St-Louis, Thau and Ayrolle.

Table 8 : Summary statistics for the two size classes in Ayrolle, Thau and Port-St-Louis. *N*, the number of individuals in the size classes; *N_a*, the mean number of alleles; *H_o*, the observed heterozygosity; *H_e*, the expected heterozygosity; *F_{IS}*, the inbreeding coefficient; *F_{ST}* values of pairwise comparisons between size classes and *Pr_{xy}*, the percentage of individuals sharing at least one common parent (i.e. percentage of relations with $r_{xy} > 0.25$) within the two size groups and considering the two size groups mixed (in bold).

Size groups	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>Pr_{xy}</i>
Ayrolle							3.51 %
0 – 22 cm	18	8,9	0.684	0.694	0.04265*	0.01601	4.57 %
22 – 50 cm	32	9,2	0.677	0.697	0.06160***		3.02 %
Thau							3.24 %
0 – 27 cm	114	12.8	0.694	0.713	0.03117***	0.00368	2.73 %
27 – 45 cm	55	10.8	0.701	0.710	0.02229*		3.30 %
Port-St-Louis							3.60 %
0 – 32 cm	16	7.9	0.699	0.683	0.00941	0.01703	0.83 %
32 – 50 cm	35	9.8	0.701	0.689	0.00620		4.03 %

Significant values of *F_{IS}* are indicated with *p-value < 0.05; **p-value < 0.01; ***p-value < 0.001.

7. Discussion

The genetic structure of *P. nobilis* across the Gulf of Lion, based on the analysis of 960 fan mussels sampled at 8 localities, with different environmental conditions, appeared homogeneous throughout the area including samples isolated in enclosed lagoons and harbors. High genetic diversity was highlighted in all locations sampled, no significant genetic differentiation was identified and the percentages of related individuals were very limited and similar between all locations. In a given site, genetic parameters were also very homogeneous between size classes. These results suggest that all fan mussels belong to a large, homogeneous and highly connected population at the scale of the Gulf of Lion, which has direct implications for genetics-based conservation strategies hereinafter discussed.

Several loci showed evidence of heterozygote deficiency, which is a common phenomenon in mollusks (Giantsis et al., 2014; Hare et al., 1996). It could be caused by different factors such as null alleles, inbreeding, Wahlund effect or selection. The possible

reasons for heterozygote deficiency in *P. nobilis* were further detailed in a previous study (Peyran et al., 2020). All the loci that showed evidence of null alleles were removed from the dataset to avoid bias in the results.

7. 1. Genetic diversity and relatedness

Genetic diversity was similar among the different localities, except in Thau, Leucate and for the Côte des Albères which showed higher values because the number of private alleles was higher. Such higher genetic diversity likely reflects the larger sample sizes from these three localities (i.e. increasing rare private alleles in these localities) as allelic richness was similar among localities when standardizing sampling effort. The levels of diversity and heterozygosity of *P. nobilis* are similar to those found in other bivalve species: *Cerastoderma glaucum* (Tarnowska et al., 2010), *Ostrea edulis* (Šegvić-Bubić et al., 2020) and *Crepidula fornicata* (Dupont et al., 2007). Genetic diversity values found here were slightly higher compared to what was found in other *P. nobilis* populations in the Balears (González-Wangüemert et al., 2019) or along the Spanish coast (Wesselmann et al., 2018) but this is also likely due to a lower sampling effort in their studies. This high level of diversity in all sampled localities supports the hypothesis of a large effective population size that maintains high polymorphism, even in the presence of fragmented and isolated habitats (Ellegren and Ellegren, 2016). Such hypothesis of large effective population is quite common in marine sessile benthic species that have external reproduction as they synchronize the release of their gametes to ensure a higher probability of external fecundation. This is the case for several bivalves such as the scallop *Pecten fumatus*, where synchronized spawning events are triggered by high density and abundance of conspecifics (Mendo et al., 2014) and thus annual recruitments involve a large number of spawners. This phenomenon was also observed in other bivalves such as the date mussel (Žuljević et al., 2018) and in other sessile organisms such as sea urchins (Lamare and Stewart, 1998), brittle stars (Soong et al., 2005) and other invertebrates (Watson et al., 2003). In the case of *P. nobilis*, the reproduction patterns are quite complex and still poorly understood. For example, Trigos et al. (2018) reported the occurrence of internal fertilization with females that maintain eggs in their body cavity whereas external fertilization was largely admitted as the main mode of reproduction (Cabanellas-Reboredo et al., 2009; De Gaulejac et al., 1995). Then, while fan mussels are described as a successive hermaphrodite, 38 % of individuals in controlled conditions and 20% in wild population in Alfacs Bay, Spain, appeared simultaneously male and female,

leading to self-fertilization (Prado et al., 2020; Trigos et al., 2018). Such high rates of self-fertilization would decrease genetic admixture and thus genetic diversity, and could induce higher rates of inbreeding, particularly in enclosed areas such as Thau or Leucate. However, Prado et al. (2020) add caution to their findings by saying that unfavorable ecological situations may have the potential to trigger the development of simultaneous hermaphrodites in bivalve populations. This phenomenon has not been observed in the populations of the Cabrera National Park Marine Protected Area in the Balearic Islands (Deudero et al., 2017) which also shows evidence of large admixture (González-Wangüemert et al., 2019). Considering the high level of genetic diversity and low inbreeding coefficients that were observed in all localities in the present study, such high rates of self-fertilization are unlikely to occur here and the hypothesis of synchronized spawning events involving a large number of individuals is more relevant with the genetic data gathered thus far.

The percentage of related individuals was not larger in a given locality than considering all individuals mixed in a single sample, even for the most isolated localities such as lagoons. The two extreme values (Frontignan: 1.6 % and Port Ambonne: 6.5 %) were found in the smallest harbors with the smallest abundances. Low abundances increase the effects of the heterogeneity of larval supply, during recruitment, in both directions, thus leading randomly to more or less related individuals. Overall, only a small proportion of individuals showed relatedness values > 0.25 (mean of 3.3 %) emphasizing evidence of large effective population size and substantial admixture during reproductive events. This result also correlates with similarity of the diversity indices among localities. Moreover, in the three sites where two size classes could be identified, individuals did not show more relatedness within a given size group. Only few studies investigated relatedness in wild marine species and to date, none of them have studied relatedness in the Gulf of Lion and within lagoons. However, Costantini et al. (2018) studied the relatedness of red coral individuals and found that 25.98 % of pairwise comparisons involved related individuals which is much higher than what we are reporting for *P. nobilis*.

Both diversity indices and relatedness estimates demonstrate that even if patchy and isolated, aggregations of *P. nobilis* originate from large effective population sizes. This is mainly linked to the reproductive mechanism that consists of the synchronic release of gametes by all individuals to ensure success in the fecundation and an increase in admixture. In this framework, the question of connectivity between aggregations remains, since the

large population size in lagoons could maintain high genetic diversity indexes while, at the same time, this high diversity in small isolated harbors could indicate a supply from outside populations.

7.2. Regional patterns of dispersal

None of the analyses performed in this study showed genetic differentiation among localities when considering genetic diversity levels, allele frequencies or relatedness index (i.e. combinations of alleles). All fan mussel aggregations belong to a large homogeneous, highly connected, population across the entire Gulf of Lion. Even small aggregations located in isolated areas (lagoons or ports) were not genetically segregated. The absence of spatial genetic differentiation is often interpreted as a signal for significant connectivity but this is primarily an equilibrium between genetic drift and migration. In the context of large effective population size, the genetic drift will be limited and only a small amount of migration is required to maintain genetic homogeneity. Considering the isolated aggregations of *P. nobilis* located in lagoons, the potential for a high self-recruitment rate remains likely as these lagoons have limited water inflow with the open sea which could limit the exportation of pelagic larvae. Then, as we are dealing with a species characterized by large effective population size, in relation to its reproductive mode, only a small amount of larval supply from other localities should be necessary to maintain low F_{ST} values, limited relatedness and the overall genetic homogeneity. In the meantime, due to their properties, larvae from all localities, even enclosed lagoons, have the potential to be exported to the open sea and spread to all localities, drifted by currents, which would also maintain the overall genetic homogeneity. Both scenarios would explain the low proportion of related individuals, as recruitment is the result of a large reproductive event, involving a large number of spawners, and relatives will not necessarily remain together until settlement (i.e. no kin aggregation).

The absence of genetic differentiation is common in mollusks, particularly at this spatial scale, as species are known to have large effective population sizes and long larval durations (for example in *Concholepas concholepas* (Cárdenas et al., 2016), *Crepidula fornicata* (Dupont et al., 2007) and *Pecten maximus* (Morvezen et al., 2016)). Population genetics studies were performed for *P. nobilis* in Balearic Islands and along the Spanish coast and authors reported no, or very weak, genetic differentiation between sites (González-Wangüemert et al., 2019; Wesselmann et al., 2018). Populations were situated in open sea

locations and authors associated the lack of genetic structure to a high connectivity in their study area. Simulations performed by Wesselmann et al. (2018), highlight the high dispersal potential of fan mussels during the pelagic larval state. In the present study, considering the size of the study area and the dispersal potential of larvae, the hypothesis of high connectivity could thus be consistent, at least between the most exposed locations, and even between the most distant ones such as Côte des Albères and Port-St-Louis.

Sea-lagoon genetic connectivity is poorly documented in the Gulf of Lion. To our knowledge, fine-scale genetic structure among lagoons in this area was investigated, in bivalve species, only for *Ruditapes decussatus* (Borsa et al., 1994) and *Mytilus galloprovincialis* (Skalamera et al., 1999) and, similar to the present study for *P. nobilis*, no genetic differentiation could be identified. Similar results were also found for the sand goby *Pomatoschistus minutus* (Boissin et al., 2011). These species are known to have large population sizes. We could thus be in the same situation as that of *P. nobilis*, where it is difficult to differentiate both scenarios of high connectivity vs reproductive events involving large number of spawners and low migration which maintains the genetic homogeneity.

Other studies on *P. nobilis* showed isolated populations in Greece (Katsares et al., 2008) and in the Venetian lagoon (Sanna et al., 2013), where geographic configuration and environmental conditions are similar to those in the lagoons in the Gulf of Lion. Genetic differentiations can thus occur in isolated areas, when a population is segregated by geography or by marine currents, which create natural barriers and prevent populations from exchanging larvae (Katsares et al., 2008). Given the particular geographic configuration of the Gulf of Lion's coast, compartmentalization of populations could be expected, especially for lagoons. Finally, Pérez-Ruzafa et al. (2019a) reported that connectivity between the sea and lagoon must be much lower than expected, by simulating larval dispersal of several species with different life history traits. This could thus be a clue to support the hypothesis of high self-recruitment rates in lagoons.

7.3. Implication for conservation

Results from the present study on *P. nobilis* demonstrate genetic homogeneity across localities, wherever they are (lagoons, harbors, open sea) that implies some connectivity among these localities that maintain genetic diversity. The question concerning the contribution of this connectivity within the context of repopulating localities remains, as we

could oppose two scenarios involving a dominance of migration vs one with a negligible migration and dominance of self-recruitment from large local populations. In the case of large lagoons such as Thau and Leucate, it is likely that self-recruitment dominates the local recruitment since all size classes and more regular settlement patterns are present. Conversely, in the case of small harbors, repopulation is highly dependent on migration that is typically more variable, leading to more variability in size classes.

P. nobilis is a sedentary endemic species with a highly fragmented distribution. This study highlights a large genetically homogenous population with high genetic diversity across the entire coast of the Gulf of Lion. This high genetic diversity may involve a large number of spawners and thus the population may have a large effective size. Maintaining a high level of genetic diversity in populations is one of the fundamentals of genetic conservation as it preserve the species' abilities to adapt to environmental changes and increase resilience (Frankham, 1999). Considering the results of the present study and regarding the pandemic occurring throughout the Mediterranean Sea, preserving fan mussels in a single locality, for example, might allow for the entire genetic variability of fan mussels in the Gulf of Lion to be preserved. Then, as migration between localities, even small, might exist, it could help to repopulate other areas. In a context of developing a species rescue plan, conserving a relatively small number of individuals in aquariums, under controlled conditions to protect them from being infested by the parasite, might be enough to provide a backup of almost the entire genetic diversity of the species.

This study also showed the wide diversity of habitat types that the fan mussels can colonize. The epidemic, caused by the parasite *H. pinnae* and leading to mass mortality, has now spread throughout almost the entire Mediterranean Sea and has already reached the coast of the Gulf of Lion where all of the infected populations have been devastated. To date, only individuals settled in lagoons remain less or unaffected and the survival of the species is likely to rest on them, as there is no longer dense population in the open sea. The present study thus has important implications for conservation as it highlights the opportunity to find a habitat that is suitable for fan mussels but which is unfavorable to the development of the parasite. Lagoons, thanks to their particular physico-chemicals conditions, might thus represent a refuge habitat for fan mussels, which could be the key for the persistence of the species in the wild.

8. Supplementary information.

Table S 4 : Characterization of the 22 microsatellite loci used for this study. T_A : primer annealing temperature; N : number of individuals with reliable amplification; N_a : number of alleles; H_o : observed heterozygosity; H_e : expected heterozygosity; F_{IS} : inbreeding coefficient.

Locus	Primer Sequences	Repeat Type	T_A (°C)	Size range (bp)	N	N_a	H_o	H_e	F_{IS}
11847	F : ACACTCCAGTACAAGTCACAAATG R : AGAATGCCTGAGTGGGACAG	(TGT) ₁₈	53°C	66 - 177	938	34	0.8774	0.8795	0.00295
3.2	F : CCGAGGTCCCCTATCACAG R : TGCCCTTTGTGCATTATTTG	(ACC) ₁₂	53°C	176 - 245	928	19	0.8330	0.8536	0.02465*
6980	F : AGTCTGCATAACTTCCACTGC R : GGCCACCAGTAAGCTCTTTG	(ACC) ₁₀	53°C	215 - 260	922	16	0.7950	0.8292	0.04176***
1490	F : CTTCTGATTGACCGTAAGTG R : AAACCTCAGACAACGAGACAA	(AAC) ₁₁	53°C	173 - 236	926	19	0.7646	0.7729	0.01135
15415	F : ACCACTACTCATGCCTCACC R : AACGAAGTTCGGCTATAACG	(AC) ₁₆	53°C	223 - 271	891	19	0.8496	0.8783	0.03320**
12107	F : TGCATCTGCATCGTGAGG R : TGTTGGTCAAGTGGGATGAC	(CAT) ₈	55°C	104 - 128	945	8	0.2360	0.2386	0.01165
15584	F : TGAGGTGGACGTCGCTTAAC R : GTCGAAGTCTCGTGGAAAG	(TGT) ₁₃	55°C	223 - 277	950	19	0.8737	0.8733	0.00007
9902	F : TCTAAGGTGCTTGATGTGGA R : TTAGACGGAAACCATGTGTG	(GTCT) ₁₂	55°C	204 - 256	950	14	0.6411	0.6815	0.05993**
4482	F : TATCCAGCAAGAGCACCAGC R : TGACTTGGGTAAGTGGTTCCG	(CAA) ₉	55°C	183 - 210	956	10	0.3609	0.3686	0.02156
15393	F : TTGAGTGGGACGTTAAACAA R : ACGCTCCTGTTTTGTCTTCT	(CAA) ₁₂	57°C	171 - 225	880	16	0.6636	0.7066	0.06140***
15096	F : AGTGCGTTGTTCAATTTCA R : TAGGCAAATTTTCTCGCTCT	(GT) ₁₂	57°C	166 - 204	949	19	0.8757	0.8825	0.00832
15006	F : AACACAGCAACTGCACATC R : ATGCTTGGCACTAATGGTCT	(CAA) ₁₂	57°C	195 - 210	941	5	0.2933	0.2656	-0.10383
14331	F : ATCGGAAATCGGATAGGCTG R : TAATGTGAGTTGTGGCGG	(GT) ₁₆	57°C	76 - 130	932	25	0.8637	0.8903	0.02950**
8995	F : AGTGGAAGAGAAGCCATACG R : TACTTGACGGAAACCATGTG	(GTCT) ₁₄	57°C	226 - 290	955	17	0.7958	0.7993	0.0049
5017	F : ACCGAAGTCGAGATGGTTGG R : CTTCACTGGCACACGATGC	(GTT) ₁₀	60°C	201 - 249	949	16	0.7640	0.8287	0.07863***
4664	F : ACATGCATACATAACAAAGTGC R : CCTTCTGCCCGACCTCTC	(ACAT) ₉	60°C	127 - 203	924	18	0.8214	0.8715	0.05800***
5.2	F : TTGCATGTGCCACCATAATC R : TTCATACCGATGAGCCAAATG	(ATAGT) ₁₁	60°C	169 - 224	944	12	0.5699	0.6080	0.06312***
4.3	F : TGGATCTAGACTCTTTGTTGTCTTC R : ACAAGTCCATGCTATGTTGC	(ATTT) ₁₇	60°C	238 - 350	942	29	0.8450	0.9363	0.09807***
14763	F : AGCATCTGGTAACACGACGG R : TGCGCGCTCTAGAAAGATTG	(TTG) ₁₄	63°C	134 - 200	941	22	0.6684	0.6934	0.03652*
3.5	F : CCTAGCCTACATTCCATATGTGC R : TCATGTCTATGTCAAATGAACCTCG	(AAT) ₁₃	63°C	143 - 191	876	16	0.4144	0.4281	0.03254*

2287F1R1	F : AGGTCGAATAGCAATAACAACAA R : GGCGTGGAGGTAAGAGTCAA	(ACA) ₁₂	63°C	89 - 131	942	15	0.8227	0.8128	-0.01223
9918R2	F : GTCTTTCTGTGCCGATGTCTG R2 : GGACGGGCCGACCTATCT	(ATCT) ₇	63°C	206 - 254	923	14	0.5645	0.7434	0.06212***

Significant values of F_{15} are indicated with *p-value < 0.05; **p-value < 0.01;

***p-value < 0.001.

Table S 5 : F_{ST} values of pairwise comparisons between sampled sites (Robertson and Hill estimator for F_{ST} , 1984 corrected by Raufaste & Bonhomme, 2000).

F_{ST}	Frontignan	Leucate Chenal	Leucate Nord	Leucate Port	Leucate Sud	Peyrefite	Pinnasouk	Port de Sète	Port-Vendres	Port Ambonne	Port-St-Louis	Thau Eaux blanches	Thau Lido	Thau Mèze	Thau Sud
Ayrolle	0.009	0.00312	0.00454	0.00336	0.00391	0.00512	0.00364	0.00453	0.00688	0.00504	0.00231	0.00496	0.0072	0.00519	0.00585
Frontignan		0.01119	0.0105	0.01458	0.00953	0.00942	0.00908	0.00927	0.01224	0.00485	0.00459	0.00689	0.00529	0.01348	0.00568
Leucate Chenal			0.00173	0.00202	0.00784	0.01476	0.0047	0.01275	0.0247	0.01174	0.00904	0.0056	0.00529	0.00968	0.00649
Leucate Nord				0.00318	0.00459	0.01329	0.00529	0.00898	0.01997	0.00491	0.00825	0.00589	0.0041	0.00594	0.00389
Leucate Port					0.00412	0.02512*	0.00487	0.01591*	0.01938	0.00724	0.00828	0.00731	0.0037	0.01042	0.00483
Leucate Sud						0.01522	0.00373	0.00776	0.01651	0.00693	0.00518	0.00711	0.00806	0.0122	0.00212
Peyrefite							0.00286	0.003	0.03707	0.01029	0.00601	0.01394	0.002	0.02067	0.01065
Pinnasouk								0.00374	0.03807	0.01273	0.00596	0.00648	0.00709	0.01159	0.00553
Port de Sète									0.017	0.00354	0.00384	0.00522	0.00405	0.01303	0.00305
Port-Vendres										0.00586	0.01097	0.01282	0.00777	0.00319	0.01698
Port Ambonne											0.00407	0.00313	0.0022	0.00378	0.00167
Port-St-Louis												0.00678	0.00319	0.00196	0.0037
Thau Eaux blanches													0.00514	0.00686	0.0053
Thau Lido														0.00694	0.0079
Thau Mèze															0.0053

The * indicates significant values after Bonferroni sequential correction.

Table S 6 : AMOVA analysis of genetic variances within and among localities through the Gulf of Lion. Level of significance is based on 10 000 iterations.

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage variation
Among localities	65.127	0.01199	0.18
Among individuals within localities	6 305.94	0.05517	0.84
Within individuals	6 253	6.51354	98.98
Total	12 624.06	6.5807	

Table S 7 : AMOVA analysis of genetic variances within and among localities and type of habitat through the Gulf of Lion. Level of significance is based on 10 000 iterations

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage variation
Among type of habitat	32.273	0.00728	0.11
Among localities within type of habitat	32.854	0.00654	0.1
Among individuals within localities	6305.937	0.05517	0.84
Within individuals	6253	6.51354	98.95
Total	12 624.06	6.58253	

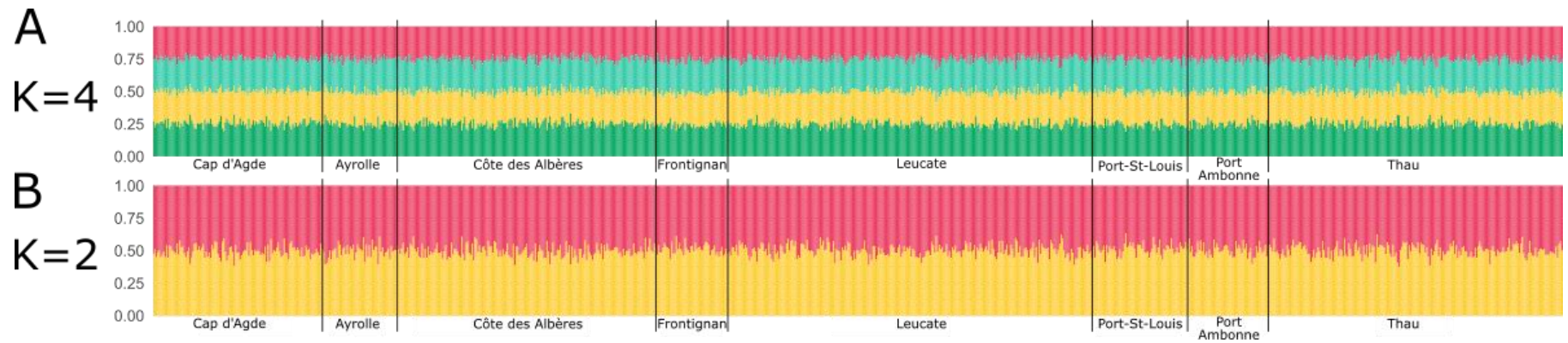


Figure S 1 : Cluster analysis obtained from the Bayesian-based method implemented in STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2000) showing the most likely number of clusters (K) present in *Pinna nobilis* populations across the Gulf of Lion resulting from the application of the method described by (A) Evanno et al. (2005) and (B) by Puechmaille (2016).

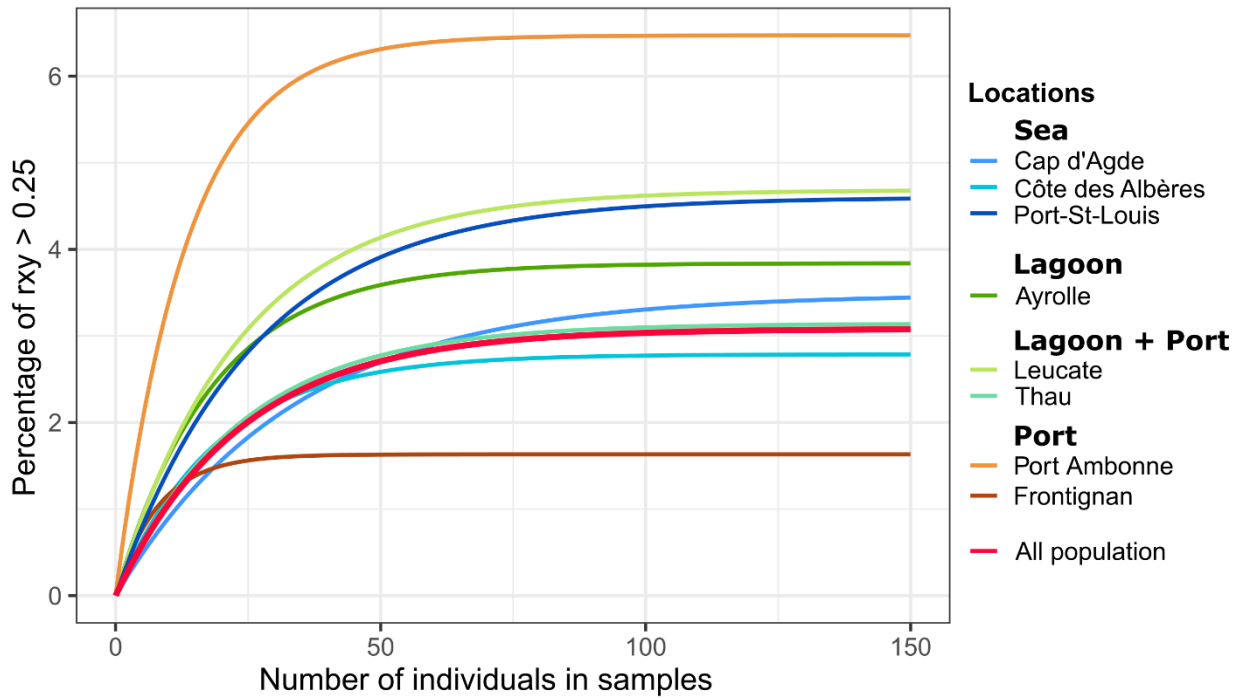


Figure S 2 : Relationship between the percentages of related individuals and the number of sampled individuals modeled for each locality

Table S 8 : Percentage of related individuals, sharing at least one common parent (i.e. $r_{xy} > 0.25$) calculated for each sampled site. Based on Queller and Goodnight (1989) index r_{xy} for relatedness.

Locality	Site	Number of individuals	Percentage of related individuals
Côte des Albères	Peyrefite	157	3.4
	Port-Vendres	19	2.3
Leucate	Leucate Chenal	50	4.0
	Leucate Sud	53	3.9
	Leucate Port	105	4.5
	Leucate Nord	54	6.1
Ayrolle	Ayrolle	51	3.5
Cap d'Agde	Cap d'Agde	116	3.4
Port Ambonne	Port Ambonne	35	6.1
Thau	Thau Sud	47	3.3
	Lido	54	2.5
	Mèze	24	2.5
	Eaux Blanches	34	2.0
	Port de Sète	61	3.1
Frontignan	Frontignan	49	2.1
Port-St-Louis	Port-St-Louis	51	3.6

CHAPITRE 4:

DYNAMIQUE DEMOGRAPHIQUE, FONCTIONNEMENT ET STRATEGIE DE REPRODUCTION D'UNE POPULATION



1. Contexte

L'étude réalisée dans le chapitre précédent a mis en évidence une forte diversité génétique très homogène entre tous les sites de l'ensemble du littoral Occitan, ce qui implique un certain niveau de connectivité. Cependant, ces analyses ne nous ont pas permis de déterminer avec précision comment les populations fonctionnent et se maintiennent. Il n'a pas été possible de faire la différence entre un scénario avec beaucoup de connectivité entre les populations et un scénario avec une faible connectivité mais des populations avec de grandes tailles efficaces qui se maintiennent grâce à un fort taux d'auto-recrutement.

Récemment, les analyses de parenté se sont révélées être de puissants outils pour évaluer de façon plus directe les patrons de dispersion et les processus impliqués dans le maintien de la population. Ainsi, déterminer la structure familiale permet de mieux comprendre le fonctionnement de la population, les stratégies de recrutement des larves et sa contribution à son propre repeuplement. Ainsi, plusieurs études ont montré, grâce à des analyses de parenté, que chez de nombreuses espèces, de fortes proportions de larves avaient tendance à disperser peu et à recruter à proximité de leur population de naissance (Berumen et al., 2012; Jones et al., 2005; Planes et al., 2009; Salles et al., 2016). Cependant, ce type d'analyse est rarement effectué chez les organismes à fécondation externe et ayant des phases de dispersion larvaires pélagiques car le succès d'assignement dépend du nombre d'individus apparentés qui ont été prélevés et nécessite donc un effort d'échantillonnage important (Jones et al., 2010; Pemberton, 2008). Dans le cadre de ce chapitre, nous nous sommes donc focalisés sur de la baie de Peyrefite, qui abrite la plus grande population de grandes nacres au sein de la Réserve Naturelle Marine de Cerbère-Banyuls.

Bien qu'il existe une multitude d'algorithmes permettant de réaliser des analyses de parenté, celui implémenté dans le programme COLONY est le plus puissant lorsqu'aucun *a priori* n'est connu (Jones and Wang, 2010). Ainsi, alors que la plupart des algorithmes de parenté comparent les individus deux à deux, COLONY est basé sur une méthode de vraisemblance à généalogie complète, c'est-à-dire qu'il permet de considérer le pedigree dans sa globalité et estime simultanément les relations de fratrie et de filiation (Jones and Wang, 2010). Ainsi, des individus qui ne sont pas directement apparentés *via* les parents peuvent être rassemblés dans un même cluster familial s'ils sont reliés par des relations plus complexes, ce qui est souvent le cas chez les espèces polygames (**Figure 13**). Les individus au

sein d'un cluster sont tous liés à au moins un autre membre du même cluster avec une relation de fratrie (demi ou vrai frère/sœur) ou de parenté (parent-enfant) et ne sont pas apparentés avec ceux des autres clusters. COLONY fournit une probabilité pour la configuration globale du cluster familial ainsi que pour chacune des relations entre individu.

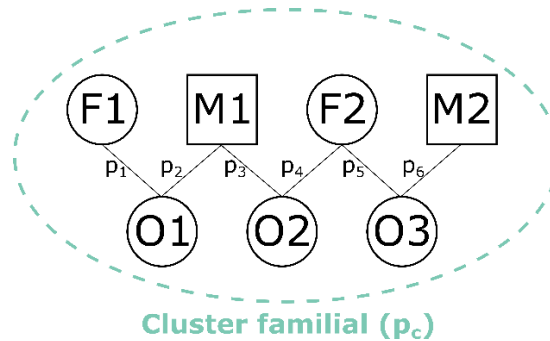


Figure 13: Exemple de configuration d'un cluster familial reconstruit par l'algorithme de COLONY. Même si les individus O1 et O3 ne sont pas directement reliés via leurs parents, ils le sont via l'individu O2 avec qui ils partagent chacun un parent (M1 et F2 respectivement). COLONY permet d'obtenir une probabilité pour l'ensemble de la configuration du cluster (p_c) ainsi que pour chacune des relations estimées (p_1 à p_6).

En se focalisant sur la population de la baie de Peyrefite, et en utilisant les marqueurs microsatellites développés au cours du chapitre 2, l'objectif de ce quatrième chapitre est d'estimer la dynamique démographique et les processus de repeuplement de l'espèce. Un échantillonnage de la population a été réalisé au cours de 3 campagnes et, grâce à des analyses de parenté, les contributions de l'autorecrutement et des apports de larves provenant de populations voisines au maintien de la population ont été estimées. Ces analyses ont également permis de mettre en évidence la structuration familiale au sein de la baie afin de mieux comprendre les stratégies de recrutement des larves et les variations de succès reproducteur.

2. Publication associée

Les résultats de ce chapitre font l'objet d'une publication soumise dans la revue *Molecular Ecology*.

Peyran, C., Boissin, E., Morage, T., Nebot-Colomer, E., Iwankow, G., Planes, S., 2021. Investigating population dynamic from parentage analysis in the highly endangered fan mussel, *Pinna nobilis*.

Investigating population dynamics from parentage analysis in the highly endangered fan mussel *Pinna nobilis*

Claire Peyran¹, Emilie Boissin^{1,2}, Titouan Morage¹, Elisabet Nebot-Colomer^{1,3}, Guillaume Iwankow¹, Serge Planes^{1,2}

¹ PSL Research University: EPHE - UPVD - CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

² Laboratoire d'Excellence « CORAIL »,

³ Instituto Español de Oceanografía (IEO). Centro Oceanográfico de Baleares. Muelle de Poniente s/n, 07015. Palma de Mallorca, Spain

Corresponding author: claire.peyran@gmail.com

Compliance with ethical standards

The sampling was non-lethal and approved by the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) of Occitanie (prefectural order n°2018-s-24).

Author contributions

S.P. designed the study, T.M., E.N.C., G.I. and C.P. did the fieldwork, C.P. performed laboratory and data analyses and drafted the paper, E.B. and S.P. contributed to data interpretation and reviewed the paper.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This research was implemented thanks to financial support from the Occitanie Region and the General Council of the Pyrénées-Orientales. C. Peyran was supported by a PhD scholarship granted by Sorbonne University. We are grateful for the support of the DREAL Occitanie and the French Ministry for Ecological Transition and Solidarity. We thank the Cerbère-Banyuls Natural Marine Reserve staff for their collaboration and permission to work within their protected areas. We also thank N. Tolou and V. Neglia for their participation in the sampling fieldwork.

3. Abstract :

Understanding dispersal patterns is a major focus for conservation biology as it influences local survival and resilience in case of local disturbance, particularly for sessile species. Dispersal can be assessed through parentage analyses by estimating family structure and self-recruitment. This study documents the family structure of a pelagic spawner, the endangered fan mussel, *Pinna nobilis*, which is currently facing a major crisis that threatens its survival as most of its populations have now been decimated by a protozoan parasite, *Haplosporidium pinnae*. There is an urgent need to understand the dispersal and replenishment processes for this species in order to implement effective conservation plans. In this context, we focused on a single large population of *P. nobilis* within a bay (Peyrefite, Banyuls-sur-mer, France) where 640 individuals were sampled in 2011, 2015 and 2018 and genotyped for 22 microsatellite markers. Genetic diversity was high and homogeneous among years, with mean allele numbers ranging between 13.6 and 14.8 and observed heterozygosities (H_o) between 0.7121 and 0.7331. Low but significant genetic differentiations were found between 2011 - 2015 and 2015 - 2018. A parentage analysis described 11 genetic clusters, including one prevailing, and revealed that 46.9 % of individuals were involved in a half-sib relationship, even between years, suggesting that the source population was recurrent year after year. There were few recaptures between years, indicating a rapid turnover. Considering the large number of half-sib relationships but the low number of relations per individual, we conclude that *P. nobilis* exhibit homogeneous reproductive success without over-dominance. The present study confirms a family structure typical of a species with large simultaneous spawning events leading to a large effective population size. Self-recruitment was not highlighted in the analysis which makes this population highly vulnerable as replenishment only relies on connectivity from neighboring populations. In the context of the pandemic which has nearly decimated the species, these results will have to be considered when choosing a location to reintroduce individuals in potential future rescue plans.

Keywords: Larval Dispersal; Conservation; Parentage Analyses; Recruitment; External Spawner; Self-Recruitment

4. Introduction

Most marine coastal ecosystems are discontinuous and made up of a mosaic of different habitats and diversified seascapes, leading to highly fragmented species distributions. Coastal organisms, from macroalgae to invertebrates, and even some fish species, are mostly sedentary or have limited movement capabilities as adults and have thus a two-phase life cycle (Cowen and Sponaugle, 2009; Thorson, 1950; Young, 1990). Adults are generally confined to a restricted living area, or fixed, whereas early life stages include a pelagic larval phase that allows for potential long-distance dispersal (Selkoe et al., 2006). This phase is a fundamental ecological step for coastal organisms, especially in fragmented habitats, as it has a direct impact on local survival through replenishment (Saenz-Agudelo et al., 2011), maintains a high level of genetic diversity (Almany et al., 2009), controls local distribution and abundances for species and determines their persistence and resilience in case of local disturbance (Cowen and Sponaugle, 2009; Selkoe et al., 2006).

While understanding dispersal patterns is a major topic in conservation biology, the study of larval dispersal remains a challenge because due to their small size and high mortality rate, larvae are almost impossible to track. Considering their weak swimming abilities, larvae were treated as passive particles carried over large distances by sea currents and larval dispersal was studied mostly through hydrodynamic models (review in Swearer et al., 2019). The dispersal distance of a species was therefore considered to be proportional to the duration of the larval phase. However, with the emergence of new molecular tools, it is now possible to determine population structure and to estimate connectivity patterns using genetic analyses and statistics (Marko and Hart, 2018). Several authors have shown that high proportions of larvae do not disperse over large distances but stay close to their birth place, and this is the case for various taxa (Bell et al., 2014; Carreras-Carbonell et al., 2007; Teske et al., 2016; Weersing and Toonen, 2009). More recently, parentage analyses have been shown to be a powerful tool to directly assess dispersal patterns and to understand maintaining processes as the reconstruction of family structure provides information about settlement strategies and the population's contribution to its own replenishment (Berumen et al., 2012; Christie et al., 2010; D'Aloia et al., 2013; Díaz-Viloria et al., 2013; Dubé et al., 2020; Jones et al., 2005; Planes et al., 2009; Salles et al., 2016; Wilson and Ferguson, 2002).

However, family structure is poorly documented for pelagic spawners as parentage analyses require a significant investment in the sampling effort (Jones et al., 2010; Pemberton, 2008).

Having a proportion of self-recruitment (i.e. the proportion of recruits that settle in their natal population) can have multiple benefits for the population. First, staying at proximity to the parental population can limit the risks linked to long-distance dispersal. For species which lives in a fragmented habitat, the chance of finding a suitable settlement habitat may also decrease if larvae disperse too far from the parental population (Swearer et al., 2002).

The fan mussel, *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758), is an endemic bivalve of the Mediterranean Sea, that lives in coastal and lagoonal seagrass meadows leading to a patchy and aggregative distribution (Basso et al., 2015a). It is a successive hermaphrodite with both male and female gonads active but with staggered developmental stages to avoid self-fertilization (De Gaulejac, 1995). Gametogenesis occurs from March to June, followed by a succession of alternate gamete emissions and rapid gametogenesis from June to August (De Gaulejac et al., 1995). It is generally accepted that fan mussels are pelagic spawners but their reproduction cycle still remains unclear as Trigos et al. (2018) reported observations of internal fertilization events with females maintaining eggs in their body cavities. After fertilization, pelagic eggs are transformed into pelagic veliger larvae. For *P. nobilis*, larval phase duration is around 5 to 10 days during which larvae are dispersed by marine currents (Butler et al., 1993) but, as for many bivalve species, this stage is poorly documented and a recent study has shown that the larval stage could last up to 20 days under controlled conditions (Trigos et al., 2018). At the end of the pelagic larval stage, individuals that find an appropriate substratum undergo a metamorphosis and settle in soft-bottom habitats to grow rapidly until they are of adult size (IOPR, 2003). As for most of the bivalve species, settlement rates can be very inconstant in space and time, with occurrence of exceptional years, as often described in species with very high fertility, that will be critical for the species population dynamics (Beukema et al., 2001; González-Wangüemert et al., 2014; Miyawaki and Sekiguchi, 2000).

Today, *P. nobilis* is facing a major crisis that threatens its survival as most of the populations, throughout the Mediterranean Sea, have suffered mass mortality events (Vázquez-Luis et al., 2017) caused by a protozoan parasite, *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al., 2018; Grau et al., 2021). This is an unprecedented situation, whether in terms of

mortality rates or spread speed, as most of the affected populations were decimated within about three to four weeks (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; García-March et al., 2020b; Šarić et al., 2020). Following this tragic situation, the status of the species was reevaluated and upgraded to “critically endangered” on the IUCN red list (Kersting et al., 2019). Currently, only very few populations remain unaffected in marine habitats (Acarli et al., 2020; Çinar et al., 2021; García-March et al., 2020b) or in lagoons (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; Catanese et al., 2018; Peyran et al., 2021b), that should be considered as targets for conservation priorities as they could act as refuges and source populations for the species recovery.

In this context, it is now, more than ever, necessary to have better information about the demographic dynamics of the species in order to implement effective conservation plans. Previous studies on *P. nobilis* population genetics showed low genetic differentiation that implied connectivity among populations (González-Wangüemert et al., 2019; Peyran et al., 2021a; Wesselmann et al., 2018). However, none of these studies focused on recruitment processes which drive the replenishment of the local population. This study documents the functioning of a natural population of a pelagic spawner species, *P. nobilis*, by (i) estimating the relative contribution of self-recruitment vs. recruitment from distant populations on the maintaining of the local population and (ii) establishing family structure to understand settlement strategies of larvae and variability in reproductive success within local populations.

5. Materials and Methods

5.1. Study location and sample collection

The study was conducted in the bay of Peyrefite (42°27'37"N; 3°09'29"E) which is located in the Cerbère-Banyuls Marine Protected Area, France, in the Gulf of Lion (North-Western Mediterranean Sea). The bay is shallow, with a mean depth around 4.6 m, and hosts a *P. oceanica* meadow of approximately 13 251 m² including dead matte and 5 731 m² of live meadow that has the potential to be colonized by *P. nobilis*.

Fan mussel biopsies were collected by SCUBA diving during three fieldwork campaigns in 2011, 2015 and 2018 (see **Figure 14**). In 2011, the sampling effort was focused on the northern part of the bay, in 2015 on the eastern part and in 2018 the entire bay was

surveyed. In 2018, the fieldwork started at the same time the first signs of the epidemic caused by *H. pinnae* were starting to show, and thus some individuals were already infected by the parasite. In order to carry out the most exhaustive possible sampling, the following strategy was established: fixed base lines, with known GPS positions, were installed and, every 2 m on these base lines, 60 m line transects were deployed following a heading. The meadow was then meticulously explored along 2 m wide transects. For each fan mussel, a biopsy of $\sim 1 \text{ cm}^3$ of mantle tissue was collected with forceps. This method was shown to be non-lethal after an initial test and survey, but as a preventive measure, the smallest individuals were not sampled to avoid potential lethal biopsies. Each tissue sample was stored in absolute ethanol at room temperature before DNA extraction. As GPS positions of the base lines, heading and length of transects were known, GPS positions for each fan mussel were deduced using triangulation.

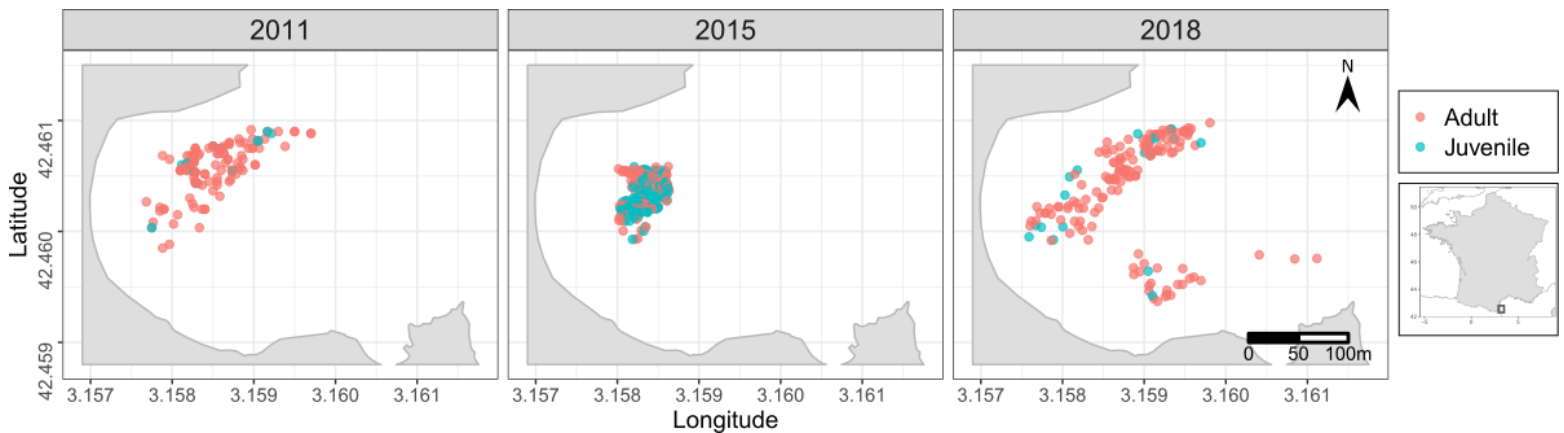


Figure 14 : Location of all the *Pinna nobilis* individuals sampled in Peyrefite Bay during the three fieldwork campaigns.

5. 2. Size and sexual maturity stage estimation

As fan mussels live half-buried in the sediment, it is not possible to easily measure their size, and as such, their size must be estimated. The maximum width, the minimum width and the unburied length, were measured *in situ* for each individual, as described by García-March et al. (2002), and the total length was determined using the equation developed by De Gaulejac (1993).

Size of individuals was then used to estimate their developmental stage related to sexual maturity (i.e. separating immature juveniles from adults that can reproduce) following the method described by Iwankow (2015) where growth models from different studied sites were averaged. The size of sexual maturity was deduced from this mean model and matches

to the slow-down of the growth which is reached at 24.5 cm. Individuals below this threshold were considered as juveniles, and above, as adults.

5.3. Molecular analysis

Genomic DNA was extracted using the QIAextractor and QIAcube robots (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Samples were screened at 30 microsatellite markers from Peyran et al. (2020) and González-Wangüemert et al. (2014) following the same genotyping procedure as described in Peyran et al. (2021). Allele sizes were scored and checked manually using GeneMapper v.5 software (Applied Biosystems). Samples presenting ambiguous peak profiles were re-amplified, genotyped and re-scored and all peaks that remained unclear were considered as missing data.

5.4. Data analysis

As mollusks are known to often present amplification troubles leading to high frequencies of null alleles (Hare et al., 1996), the quality of the microsatellite markers was checked using MICROCHECKER v2.2.3. (Van Oosterhout et al., 2004). On the original set of 30 markers, 8 presented high frequencies of null alleles and were removed from the database to avoid any bias in further analyses. The final set thus contained 22 polymorphic loci.

Since the sampling areas overlapped between three fieldwork campaigns, some individuals were sampled multiple times, leading to duplicate genotypes in the database. GENALEX 6.503 (Peakall and Smouse, 2012) was used to identify identical genotypes that corresponded to the same individuals. Both genotypes from the same individual were kept for analyses when comparing genetic composition between years while a unique genotype was kept for parentage analysis.

Genetic diversity was evaluated through allele number (N_a), expected (H_e), unbiased expected (H_{nb}) and observed (H_o) heterozygosities using GENALEX 6.503 (Peakall and Smouse, 2012). As sample size is not homogeneous among years, standardized allelic richness (A_r) and standardized private allelic richness (A_{pr}) were estimated using ADZE software (Szpiech et al., 2008), based on a standardized sample size of 150, large enough to be representative of the total sampling. GENETIX (Belkhir et al., 2004) was used to compute inbreeding coefficients (F_{is}) for each year, using the method of Weir and Cockerham (Weir and Cockerham, 1984) and significance of values was estimated by permutations (1 000

permutations per population). GENETIX was also used to calculate differentiation index (F_{ST}) between years using the Robertson and Hill unbiased estimator for F_{ST} (Robertson and Hill, 1984) corrected by Raufaste and Bonhomme (2000), RH' . The sequential Bonferroni correction for multiple tests was then applied to adjust p-values (Rice, 1989).

After removing replicate genotypes, a parentage analysis was performed using COLONY package which implemented a full-pedigree likelihood method to simultaneously infer sibships and parentage among individuals, considering the entire pedigree configuration rather than pairs of individuals (Jones and Wang, 2010). COLONY's algorithm thus allows for individuals to be partitioned, into family clusters, even though they are not directly related *via* their parents (i.e. half or full-sib) but instead with more complex relations, which is often the case in polygamous population. Individuals within a given cluster are related to at least one other individual from the same cluster, with a full-sib, half-sib or parent-offspring relation. Individuals from different clusters are unrelated. COLONY provides a likelihood for the entire cluster configuration as well as for each dyad.

In the present study, all individuals were considered as potential offspring, providing a dataset of 596 individuals, and the potential parent pool included all individuals except for the juveniles sampled in 2018, providing a dataset of 578 potential parents. *P. nobilis* is a successive hermaphrodite for which a succession of alternate spawning and fast gametogenesis occur during the spawning period (De Gaulejac et al., 1995). All parental genotypes were thus considered as candidate fathers and mothers within the analysis since the sex of individuals could not be determined. COLONY analysis was performed with the following parameters for the three long-length runs: both sexes are polygamous, the organism is dioecious, and, as it is an external spawner, inbreeding was considered as possible but clonal reproduction was not. The full-likelihood method was used with a high likelihood precision and no sib-ships prior. The genotype error rate was set to 1 % for all loci. Only family clusters with a probability greater than 95 % and inferred relations with a probability also greater than 95 % were considered in the results. Resulting relations between individuals were visualized using R package *ggraph* (Pedersen et al., 2017).

6. Results

6.1. Sampling effort and recaptures

The total number of sampled individuals was 640 with 224 in 2011, 256 in 2015 and 160 in 2018 (see **Table 9**). Among the 640 samples, 44 were recaptures (i.e. a sample of an individual that was already sampled during a previous campaign). In 2015, although there was little overlap between both sampling areas, 30 fan mussels were recaptured from 2011. In 2018, for the 160 individuals sampled, only 11 were previously sampled in 2015 and 3 in 2011, whereas the sampling area covered the entire bay in 2018 and thus totally overlapped both sampling areas of 2011 and 2015. In 2011 and 2018, the samples were dominated by adults as there were only 20 juveniles with 188 adults in 2011 and 18 juveniles with 138 adults in 2018. In 2015, the sampling was mostly composed of young individuals with 161 juveniles and 93 adults sampled.

*Table 9 : Sampling effort for each year and total number of *Pinna nobilis* juveniles, adults and individuals that were not measured (NA) for each fieldwork campaign. Numbers in bold indicate the number of new individuals sampled during the year and numbers between brackets refer to individuals sampled during the previous years.*

	2011	2015	2018	Totals			
				Juveniles	Adults	NA	Total
2011	224	-	-	20	188	16	224
2015	(30)	226	-	161	93	2	256
2018	(3)	(11)	146	18	138	4	160

6.2. Genetic variability among years

The analyses revealed a high level of genetic diversity for the three years as the mean number of alleles per locus (N_a) ranged from 14.773 to 13.591 and the total number of alleles over the 22 loci ($N_{a_{tot}}$) ranged from 299 to 325 (see **Table 9**). The observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities ranged from 0.6845 to 0.7361 and from 0.7121 to 0.7331, respectively. Genetic diversity seemed to be slightly lower in 2018 as N_a and $N_{a_{tot}}$ were lower and only 5 private alleles (N_{ap}) were found in 2018 compared to 20 and 23 for 2011 and 2015. However, this appeared to be due to a lower sampling effort in 2018 as all of the parameters were very similar among years when parameters were estimated for a standardized sample size of 150 individuals (see *Ar*, *Apr* and *Hnb*, **Table 10**). Genetic diversity was thus very homogeneous and constant among years. The inbreeding coefficient (F_{IS}) was very low and non-significant

in 2011 and increased, but remained weak, and significant (p-value < 0.001) in 2015 and 2018, indicating heterozygote deficiencies. All of the pairwise F_{ST} values were very low (ranging from 0.00196 to 0.00235) but two pairwise comparisons were significant after Bonferroni sequential correction: between 2011 and 2015 and between 2015 and 2018 suggestion that the 2015 sample is significantly different (**Table 11**).

Table 10 : Summary statistics of genetic diversity indices of Pinna nobilis for each year. N: number of individuals sampled; $N_{a_{tot}}$: total number of alleles; N_a : mean number of alleles; A_r : standardized allelic richness; $A_{p_{tot}}$: total number of private alleles; A_p : mean number of private alleles; A_{pr} : standardized private allele richness; H_o : observed heterozygosity; H_e : expected heterozygosity; H_{nb} : unbiased expected heterozygosity and F_{IS} : inbreeding coefficient.

Year	N	$N_{a_{tot}}$	N_a	A_r	N_{ap}	A_p	A_{pr}	H_o	H_e	H_{nb}	F_{IS}
2011	224	314	14.273	12.6268	20	0.909	0.830754	0.7361	0.7331	0.7348	-0.00179
2015	254	325	14.773	12.5484	23	1.045	0.892598	0.6845	0.7121	0.7135	0.04079***
2018	159	299	13.591	12.8043	5	0.227	1.10422	0.7026	0.7242	0.7265	0.03306***

Significant values of F_{IS} are indicated with *p-value < 0.05; **p-value < 0.01; ***p-value < 0.001.

Table 11 : F_{ST} values of pairwise comparisons (Robertson and Hill estimator for F_{ST} , 1984 corrected by Raufaste & Bonhomme, 2000) between the 3 years of fieldwork campaigns during which Pinna nobilis specimens were collected.

F_{ST}	2015	2018
2011	0.00235*	0.00196
2015		0.00233*

The * indicates significant values after Bonferroni sequential correction.

6.3. Family structure

In total, 11 family clusters were found, based on the COLONY's parentage analysis when retaining only families with probability higher than 95 % (**Figure 15A**), involving 157 fan mussels. Within these clusters, the number of individuals is on average 14.3 and ranged from 3 to 67 for cluster n°10 which is thus largely prevailing. All individuals belonging to a given cluster were related by sib-ship relations with at least one individual of the same cluster, but not always with high probabilities (**Figure 15C**). The clusters were homogeneously constituted of individuals from all years (**Table 12, Figure S 2**). However, the number of juveniles and adults were different between years for a given cluster as, for example, cluster n°10 was composed of 24 adults and only 1 juvenile from 2011 whereas there were 14 juveniles and 8 adults from 2015.

Over the 596 individuals screened, no parent-offspring or full-sib relation was detected. However, 280 individuals, i.e. 46.9 % of fan mussels in the study, were implicated in 172 half-sib relations with a probability of at least 95 %. Most of the individuals were involved in only one half-sib relationship and only 2 were implicated in 4 relationships (**Figure 15B**).

Table 12 : Composition of the 11 clusters

Cluster	2011				2015				2018			
	Juveniles	Adults	NA	Total	Juveniles	Adults	NA	Total	Juveniles	Adults	NA	Total
7	0	5	0	5	3	2	0	5	0	1	0	1
10	1	24	1	26	14	8	0	22	2	16	1	19
11	0	5	0	5	5	1	0	6	0	1	0	1
15	0	1	0	1	2	0	0	2	1	2	0	3
16	0	4	0	4	5	2	0	7	1	0	1	2
17	2	6	0	8	7	2	0	9	0	2	0	2
18	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
21	0	1	0	1	2	1	0	3	0	1	0	1
22	0	2	1	3	2	1	0	3	0	2	0	2
26	0	2	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0
28	0	1	0	1	1	3	0	4	0	2	0	2

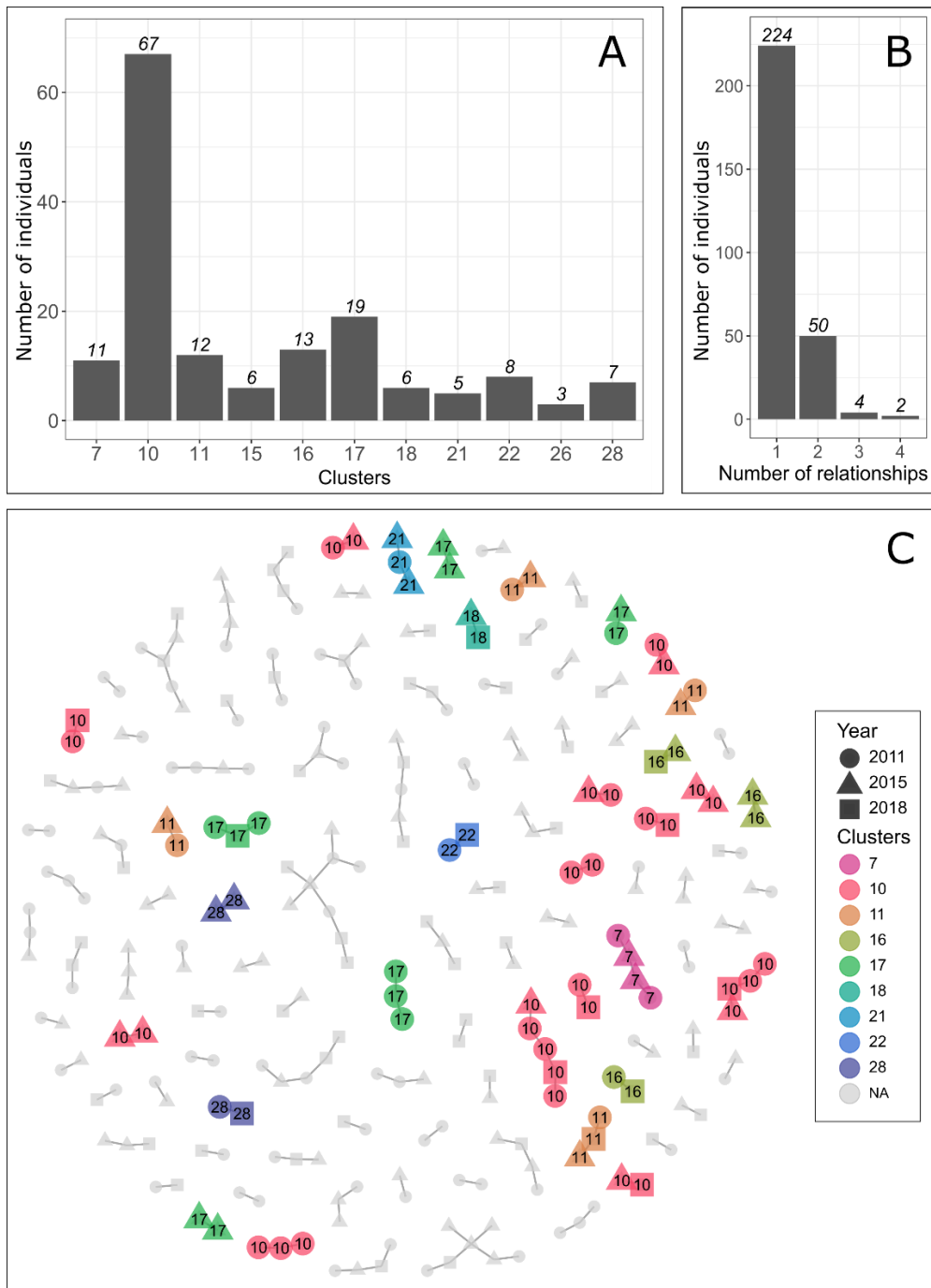


Figure 15 : Representation of the family structure highlighted within the fan mussel population in the bay of Peyrefite, based on COLONY parentage analysis. (A) Number of individuals per family cluster that have at least a 95 % probability of grouping together. (B) Number of individuals involved in 1, 2, 3 or 4 half-sib relationships with a probability up to 95 %. (C) Representation of the half-sib relations with a probability of at least 95 % and displayed in color if the cluster of belonging has a probability up to 95 % or in grey if the cluster of belonging has a probability lower than 95 %. Clusters 15 and 26 are not displayed as all included individuals were linked by relationships with probability lower than 95 %.

7. Discussion

This study is among the few to investigate family structure for a wild population of a pelagic spawning species and the first to assess local dispersal and replenishment patterns in a restricted *P. nobilis* population. Among the 640 specimens sampled over the 3 years, few were resampled, even in 2018 when the entire bay was surveyed and thus sampling area overlapped those of 2011 and 2015, indicating a quick turnover of individuals in the population. The analyses revealed a high level of genetic diversity in the bay of Peyrefite which is constant over years and the genetic differentiation between years was very low even if significant, with 2015 slightly different from 2011 and 2018, in terms of allele frequencies. The parentage analysis demonstrated that fan mussels are structured in family clusters within the bay, with one family highly dominant, which could suggest a higher reproductive success due to a larger abundance of spawners in the parental population or to a better larval survival rate. Further, almost half of the sampled individuals were related and involved in a half-sib relationship with another sampled fan mussel, even through the years, indicating that most recruits inside the bay, came from the same source population from year to year.

7.1. Temporal dynamic within the population

For the 2015 sampling, 30 individuals were previously sampled in 2011 whereas there was little spatial overlap between the two sampling areas. In 2018, while the entire bay was surveyed and sampled as much as possible, there were even less recaptures as only 11 specimens were previously sampled in 2015 and 3 in 2011. Overall, there were very few resampled individuals during the successive fieldwork campaigns, with only 4 and 3 years in between, suggesting that there was a rapid turnover of the population and that in only 7 years, it was almost fully renewed. This result was quite surprising as it seems to indicate little survival rate whereas fan mussels are considered to be long-lived. The life expectancy of fan mussels was previously estimated to be more than 20 years (Butler et al., 1993; García-March et al., 2020a) and in Rouanet et al. (2015) authors surveyed two individuals for about 45 years. In the literature, authors reported stable populations, with slow dynamics and low mortality rates (in Columbretes Islands, Kersting and García-March, 2017; in Alfacs Bay, Prado et al., 2014). In Lake Vouliagmeni, Katsanevakis (2007) also reported high mortality as, in a 2-month period, at a depth of 4 m, 80 % of individuals with widths up to 18 cm died. This mortality was attributed to illegal fishing in shallow waters, but it is an unlikely hypothesis in

our study as the bay of Peyrefite is located in a marine protected area. According to García-March et al. (2007) and García-March et al. (2020a), exposed open-sea and shallow habitats, such as the bay of Peyrefite, can be highly stressful for fan mussels as moderate to high hydrodynamics and waves create disturbances and increase mortality rate. In addition, the area is known to undergo intense air-sea interactions leading to strong winds and large sea-states that can have substantial impacts on coastal habitats (Renault et al., 2012), which could be responsible for the lower survival in the bay of Peyrefite.

As a parallel, low but significant genetic differentiation was found between years in the bay of Peyrefite, which also supports the hypothesis of a rapid turnover within the population. Even if low, values were in the same order of magnitude as what was found between Port-St-Louis and the Côte des Albères, which are separated by approximately 200 km (Peyran et al., 2021a). Such differences, as well as the small heterozygote deficiency observed in 2015 and 2018, may reflect some temporal Wahlund effect that could be due to successive cohorts presenting slight variations in allele frequencies. Genetic differences between cohorts can be caused by different selective histories during the dispersal phase, a change in population source or in the respective contributions of adults with a better reproductive success in the population source. Similar phenomena were documented for reef fish (Pusack et al., 2014) and flatfish (Hoarau et al., 2002) and changes in cohort composition were attributed to variations in reproductive success and local variations in water currents. The large variance in individual reproductive success is well documented. Hedgecock and Pudovkin (2011) formulated the hypothesis of sweepstakes reproductive success explaining that the probability of matching reproductive activity with oceanographic conditions favorable for gamete maturation, fertilization, larval development and recruitment are very low and similar to a random draw. The effective size and the cohort genetic composition is thus widely different than that of the whole population.

7. 2. Reproductive system and maintenance of the population

Although *P. nobilis* is usually considered as an external fertilizer and successive hermaphrodite, its reproductive system is still poorly understood as authors reported the occurrence of internal fertilization with females retaining eggs in their body cavity (Trigos et al., 2018) or high rates of self-fertilization with individuals that were simultaneously male and female (Prado et al., 2020). Estimations of kinship provided here, within a natural population,

offer new insights into the reproductive mode of the species. The analysis revealed no full-sib relationship whereas almost half (46.9 %) of the population was genetically linked by a half-sib relationship. In parallel, individuals were involved in a maximum of 4 relationships meaning that there were a large number of adults involved in the reproduction and that reproductive success is low and homogeneous among spawners. A high level of multiple mating is not surprising for a species with external fertilization and with aggregative behavior, where both males and females release their gametes into the water column. Similar levels of multiple mating were also found for other organisms such as in *Millepora* hydrocorals (Dubé et al., 2020), the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* (Johnson and Yund, 2007), the small bivalve *Digitaria digitaria* (Marina et al., 2020), the sea urchin *Abatus agassizii* (Maturana et al., 2017) and other invertebrates (Bishop and Pemberton, 1997; Levitan, 2018; Wacker et al., 2018). Our results support the hypothesis of a pelagic spawner with synchronized spawning events involving a large number of individuals. This is consistent with a previous study that highlighted a high genetic diversity and genetic homogeneity throughout the entire Occitan coastline, even in fragmented and isolated habitats, that could be due to a large effective population size that maintains high polymorphism (Peyran et al., 2021a). In the *P. nobilis* reproductive cycle, several successive spawning events occur (De Gaulejac et al., 1995), which can also increase the multiple mating as the release of gametes at different times decreases the probability that all of a female's oocytes were fertilized by a single male. This mechanism insures a high level of genetic diversity among offspring but also reduces variation in their fitness that was proven to, slightly but significantly, increase fitness across generations (Fox and Rauter, 2003).

No parent-offspring dyad was detected within the bay of Peyrefite, suggesting that there was no self-recruitment and that replenishment of the population only depend on larval supply from populations outside the bay. Then, as there were a lot of half-sib relationships both within and between years, it seems that larvae clouds were not totally scattered during the dispersal phase and rather tended to travel and settle partially together. The source population may also be similar through years. This finding is consistent with previous studies on *P. nobilis* population structure which suggested high levels of connectivity across the Gulf of Lion (González-Wangüemert et al., 2019; Peyran et al., 2021a; Wesselmann et al., 2018). In Wesselmann et al. (2018), the authors revealed genetic differentiations between Banyuls-Murcia and Banyuls-Mallorca likely due to isolation by distance and to the North Balearic

Front which creates a physical barrier of dense water that limits circulation of particles such as larvae (Seyfried et al., 2019). The source population of individuals in the bay of Peyrefite was thus more likely located in the Eastern or Northeastern part of the Gulf of Lion, such as the northern lagoons (Salses-Leucate and Thau) and larvae may be transported by the influence of the Northern Current (Seyfried et al., 2019). Such low levels of self-recruitment and high connectivity were also found at a similar spatial scale for other bivalve species such as the Arctic surfclam, *Mactromeris polynyma* (Cassista and Hart, 2007), the Venus clam *Polititapes rhomboides* (Chacón et al., 2021) or the hard clam *Meretrix meretrix* (Ye et al., 2020) and support the hypothesis of a species with a large effective population size where both males and females release their gametes into the water during massive synchronous spawning events.

7.3. Family structure

Most of the individuals were involved in only one or two half-sib relationships, indicating that parents only generated one or two offspring that survived, demonstrating a reproductive success that is fairly homogeneous among adults in the source population. However, one family (cluster n°10) was much more abundant than the others, over the three years sampled, and thus had a higher contribution to the replenishment of the population in the bay of Peyrefite. Several scenarios could explain the predominance of this family within the bay. First, the prevalence of offspring from this family could simply be due to a larger abundance of adults from the same family in the source population which thus proportionately contribute more than the rest of the population to the production of larvae. The number of larvae that recruit in the bay of Peyrefite would thus be larger, even with the same rate of survival than larvae from other families. The dominance of offspring from cluster n°10 could also be explained by a higher reproductive success of the progenitors. Several parameters can enhance the reproductive success of individuals such as a higher fecundity of fertilization which leads to a small number of progenitors that produce more larvae in the source population, which is a widespread phenomenon for marine invertebrates (Hedgecock et al., 2007; Lallias et al., 2010). However, if offspring were produced by a small number of progenitors, we would have expected more relatives, especially full-sibs. The dominance of offspring from cluster 10 could also be due to a higher survival of larvae during the dispersal phase. At this stage, we do not have any information about the source

populations, the parents or the initial abundance of larvae and it is thus not possible to assess the most likely scenario.

7. 4. Implication for conservation

Our study emphasized a classic family structure for a species with large simultaneous spawning events, aggregative behavior and a large population size that led to a high level of genetic diversity. Although one family seemed dominant, in terms of abundance, the reproductive success was weak but homogeneous among adults in the source population. There was no self-recruitment indicating that the population of the bay of Peyrefite is clearly not self-sustaining and is highly reliant on the sustainability and reproductive success of surrounding populations. These results will have serious implications in management plans, particularly in the context of the present pandemic, caused by *H. pinnae*, and considering that a number of rescue projects, that include reintroduction perspectives, are emerging in several Mediterranean countries.

As *P. nobilis* is an external spawner, population density will be an important parameter to consider to maintain a stable population and to enhance reproductive success. Several studies showed that one of the major determinants of fertilization success is the concentration of gametes in the water column (André and Lindegarth, 1995; Levitan, 2004, 1991). As this concentration is quickly diluted after release, it is important that the population density is high enough to ensure proximity between individuals. Crimaldi (2012) also demonstrated that when two mates are less than a meter away from one another, the fertilization success is greater than 50 %. Because of the pandemic, fan mussel populations were decimated but few individuals survived and appeared likely to be resistant to the parasite (Prado et al., 2021; Vázquez-Luis et al., 2021). However, populations are now so scattered that it will be almost impossible for individuals to reproduce, if nothing is done to improve this situation.

There was no self-recruitment in the fan mussel population in the bay of Peyrefite, meaning that all settled individuals were immigrants from a source population and that all of the locally produced larvae were exported to other locations. This high level of connectivity could be an argument in support of the efficiency of the Cerbère-Banyuls Marine Protected Area because one of the main benefits of protected areas is their seeding of adjacent areas (Russ, G. R. and Alcala, 1996). However, to ensure the stability of a population it is necessary

to have a balance between self-recruitment and external larval supply (Armsworth, 2002; Hastings and Botsford, 2006), which is not the case here. Although the population in the bay of Peyrefite is located in a marine protected area, its replenishment and resilience in response to local disturbance is highly uncertain as it depends on both the persistence of neighboring populations and the larval exportation from these populations. This study thus emphasizes the importance of marine protected area networks where protected areas are connected through larval dispersal, which thus enhances resilience (Berumen et al., 2012; Grorud-Colvert et al., 2014; Planes et al., 2009; Thiault et al., 2019). When considering reintroduction projects for conservation, the bay of Peyrefite would appear as the perfect site to re-establish a population of fan mussels thanks to the dense *Posidonia* meadows and the protection provided by the marine protected area. Since the extinction of the local population in 2018, no recruitment was observed in this area, indicating that the source population were likely decimated. Reintroducing a population into the bay of Peyrefite therefore has both advantages and disadvantages because it would have the potential to export larvae and contribute to the repopulation of other sites, but it will be necessary to regularly reintroduce new individuals as the population is not self-sustaining. This feature will thus have to be considered when choosing a location to reintroduce individuals in potential future rescue plans.

8. Supplementary information

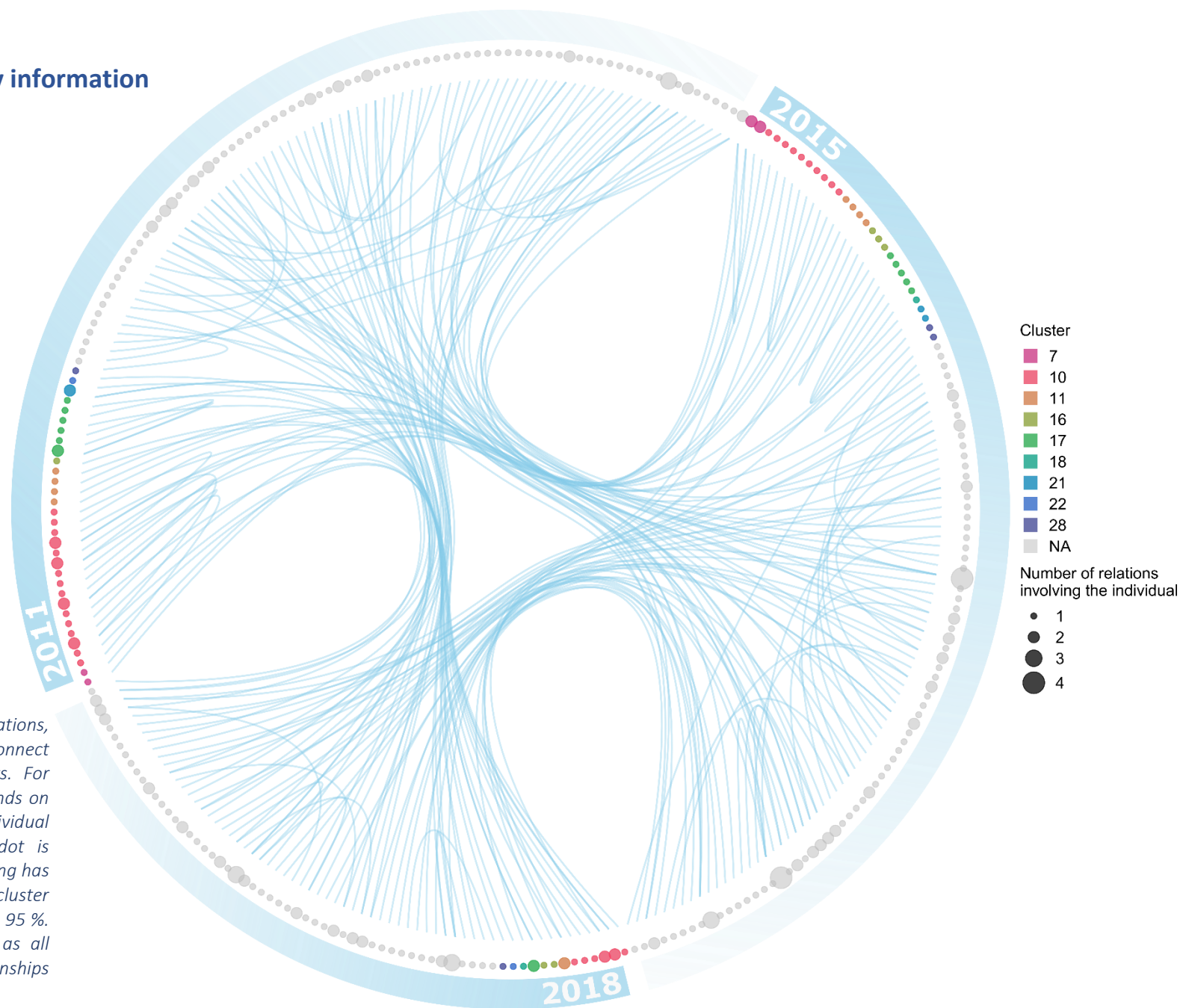


Figure S1: Representation of half-sib relations, with probability higher than 95 % that connect *Pinna nobilis* individuals between years. For each individual the size of the dot depends on the number of relations in which the individual is involved. For each individual the dot is displayed in color if the cluster of belonging has a probability up to 95 % or in grey if the cluster of belonging has a probability lower than 95 %. Clusters 15 and 26 are not displayed as all included individuals were linked by relationships with probability lower than 95 %.

CONCLUSION GENERALE :



© D. Fioramonti

Le taux d’extinctions enregistré de nos jours ne cesse de s’accélérer, principalement causé par les activités anthropiques (Ceballos et al., 2015; Pievani, 2014). L’extinction d’une espèce n’est pas un processus immédiat et il est généralement précédé par le déclin progressif de ses populations, conduisant à la perte de diversité génétique (Ceballos et al., 2017). La grande nacre de Méditerranée, *Pinna nobilis*, illustre parfaitement cette dynamique. Depuis 2016, l’espèce voit ses populations disparaître progressivement sous l’effet d’une pandémie causée par un protozoaire parasite nouvellement décrit, *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al., 2018). En réponse à cette situation critique, son statut a été réévalué et elle est désormais considérée comme « en voie critique d’extinction », ce qui correspond au plus haut niveau d’alerte sur la liste rouge de l’IUCN (Kersting et al., 2019). Cette mise à jour s’accompagne également d’un certain nombre de recommandations émises par l’IUCN et parmi elles, il est bien sûr question d’améliorer et de renforcer les actions pour favoriser la conservation. Cependant, pour mettre en place des mesures de conservation efficaces, il est nécessaire d’avoir une bonne connaissance de l’espèce. Cette thèse contribue à l’amélioration des connaissances sur l’écologie et le fonctionnement des populations de grandes nacres et apporte plusieurs résultats qui auront de fortes implications pour adapter les mesures de conservation qui pourraient être indispensables à la survie de l’espèce.

1. Résultats principaux

1. 1. Une espèce avec une forte capacité d’adaptation

Pinna nobilis est généralement considérée comme une espèce emblématique des côtes Méditerranéennes et souvent associée aux herbiers de posidonies. Elle a également longtemps été considérée comme une espèce sensible aux perturbations de son habitat (Alomar et al., 2015; IOPR, 2003). Par exemple, Natalotto et al. (2015) ont mis en évidence des signaux de stress physiologique (stress oxydatif, altération de l’épithélium des branchies) bien plus élevés chez des individus situés dans des habitats avec de fortes activités anthropiques par rapport à ceux d’une aire marine protégée (AMP). Cependant, nos études montrent que *P. nobilis* est également capable de coloniser une grande diversité d’habitats puisque des populations ont été observées sur tous types de substrats meubles, avec ou sans végétation (**Figure 16**), dans des milieux côtiers ou lagunaires et même dans des ports (voir les caractéristiques des habitats décrits dans le **Chapitre 1**). De grands individus (> 60 cm) et

différentes classes de taille ont été observés dans ces habitats ce qui témoigne d'un bon taux de survie et une dynamique faite d'évènements de recrutement successifs, notamment dans les lagunes. La présence de l'espèce n'est donc pas anecdotique ou accidentelle et les grandes nacres semblent s'adaptent et se développent particulièrement bien dans les habitats lagunaires.

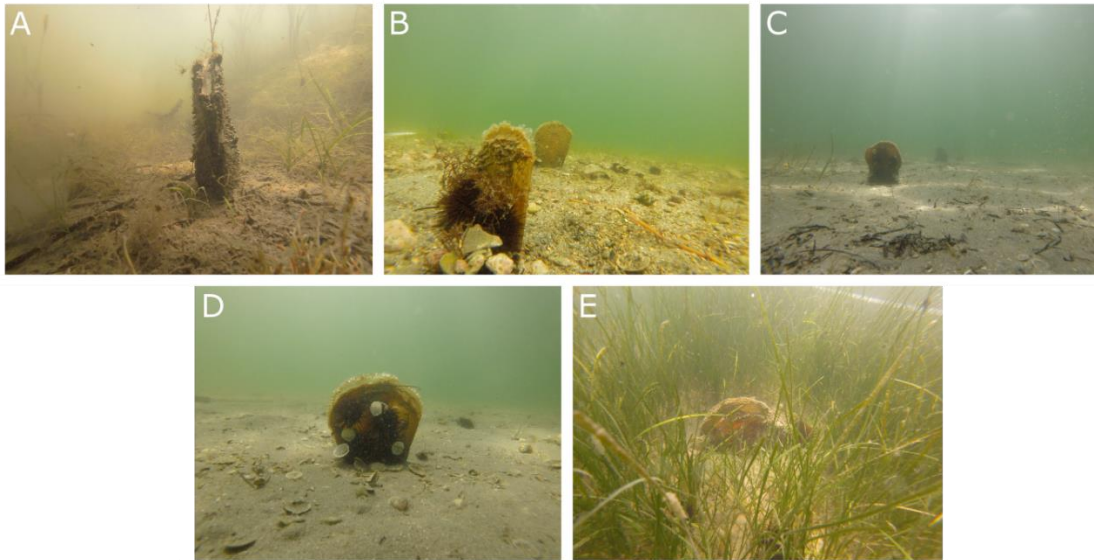


Figure 16 Illustration des différents types de substrats colonisés par *Pinna nobilis*. Vase (A), sable grossier (B), sable fin (C), sans herbier (D) ou avec herbier (E).

Les lagunes et les ports concentrent un grand nombre d'activités anthropiques, générant ainsi beaucoup de pressions sur l'environnement (artificialisation, pollution, surexploitation, etc.) qui peuvent conduire à la dégradation de l'habitat (Kennish and Paerl, 2010). De plus, du fait de leur situation géographique, les lagunes sont des milieux de transitions entre la terre et la mer et sont soumises à beaucoup de gradients physiques et écologiques. Le relativement faible volume d'eau ainsi que les faibles profondeurs des lagunes font qu'elles sont très sensibles et réagissent très rapidement aux changements environnementaux. La colonne d'eau est donc soumise à de fortes variations, à la fois journalières et saisonnières, de plusieurs paramètres physico-chimiques comme la température, la salinité et/ou la turbidité (Kennish and Paerl, 2010; Pérez-Ruzafa et al., 2019b). La présence de grandes nacres dans ces habitats témoigne donc d'une tolérance certaine face aux variations de leur environnement. Les capacités d'adaptation de l'espèce ont très peu été étudiées. Cependant, Laganà et al. (2014) ont analysé la réponse métabolique des grandes nacres en

fonction d'un gradient de salinité, à l'aide de marqueurs enzymatiques. Ils ont mis en évidence une grande plasticité métabolique, typique des bivalves estuariens, notamment la présence de voies métaboliques qui permettent d'augmenter la production d'énergie en anaérobiose, ce qui démontre une certaine capacité d'adaptation aux conditions hypoxiques. Récemment, Cappello et al. (2019) ont également montré la présence de différents mécanismes adaptatifs en comparant des individus provenant de différents habitats (lagune et mer). Ainsi, ils ont observé des changements dans la composition du mucus des branchies des nacres lagunaires, qu'ils ont attribué à un mécanisme d'adaptation aux communautés microbiennes locales. Ils ont également montré la présence de métabolites impliqués dans l'osmorégulation qui permettraient une réponse rapide aux fluctuations de salinité typiquement rencontrées dans les lagunes. Enfin, ils ont également mis en évidence des voies de neurotransmission typiques de celles retrouvées chez des espèces tolérantes à l'hypoxie. Ces résultats combinés à ceux de notre étude suggèrent que *P. nobilis* est une espèce tolérante aux variations de son environnement et avec de fortes capacités d'adaptation.

1. 2. Importance des lagunes dans le fonctionnement de l'espèce

2. 1. a. Des réservoirs pour les dernières populations denses.

Au cours de notre étude, les populations les plus importantes, en termes d'abondance et de densité, ont été retrouvées dans les lagunes de Thau et de Salses-Leucate, ce qui représente près de 90 % de la totalité du stock de grandes nacres estimé sur le littoral occitan (**Chapitre 1**). Les lagunes apparaissent donc comme les principaux réservoirs pour l'espèce. Sur la totalité du littoral occitan, la plus forte densité se trouvait au niveau du lido de Port-Leucate avec 70 individus/100 m². Il s'agit d'une des plus fortes densités enregistrées dans la littérature. La plus forte densité pour une population de grandes nacres a été observée dans la lagune de Venise avec 1 200 individus/100 m² (Russo, 2012) mais les valeurs les plus communes sont généralement autour de 1 à 2 individus/100 m² (Basso et al., 2015b; Rabaoui et al., 2010; Trigos and Vicente, 2018; Tsatiris et al., 2018). Ce résultat est inattendu car la grande nacre est généralement considérée comme une espèce côtière. De plus, alors que la baie de Peyrefite, située en pleine mer et dans la Réserve Naturelle Marine de Cerbère-Banyuls, apparaissait comme l'habitat typique de l'espèce, la population en place a montré une faible survie et un renouvellement rapide car en 7 ans presque la totalité des individus avait été remplacée (**Chapitre 4**). L'espérance de vie des grandes nacres est pourtant estimée

autour de 20 ans (Butler et al., 1993; García-March et al., 2020a). Le taux de mortalité dans cette zone est donc particulièrement important. Dans le **chapitre 1**, l'ensemble des sites prospectés sur la côte rocheuse était colonisé par une majorité d'individus juvéniles, et peu d'individus de grande taille, ce qui pourrait également indiquer une faible survie des nacres dans ces habitats. L'ensemble de ces résultats démontre l'importance des lagunes car elles semblent correspondre à l'habitat qui répond le mieux aux exigences écologiques de l'espèce, en tout cas c'est le cas sur le littoral occitan. De la même façon, en Espagne des populations très abondantes colonisent les lagunes, par exemple dans la baie des Alfacs, située près du delta de l'Ebre, où près de 90 000 individus ont été recensés (Prado et al., 2014).

Depuis Octobre 2016 et à travers toute la Méditerranée, la quasi-totalité des populations de grandes nacres situées en mer a été décimée par la pandémie causée par *H. pinnae* (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; Panarese et al., 2019; Šarić et al., 2020; Scarpa et al., 2021). Seules les populations lagunaires semblent, à ce jour, encore peu affectées, par le parasite (Cabanellas-Reboredo et al., 2019). Les parasites du genre *Haplosporidium* ont généralement des dynamiques d'infestation saisonnières et dépendantes des paramètres environnementaux. Par exemple, *Haplosporidium nelsoni* (Haskin, Stauber & Mackin, 1966), responsable de mortalités massives chez *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), est capable de supporter un intervalle de salinité relativement réduit, entre 20 et 30, en dehors duquel il est peu virulent ou meurt (Arzul and Carnegie, 2015; Haskin and Ford, 1982). De la même façon, *H. pinnae* semble ne pas tolérer les valeurs de salinité extrêmes car, en Espagne, il n'entraîne pas de mortalité chez la population de grandes nacres de la baie des Alfacs, qui est soumise à d'importantes entrées d'eau douce de l'Ebre (Lloret et al., 2008), ni celle de Mar Menor où la salinité peut atteindre 46 (Pérez-Ruzafa et al., 2005). Dans notre cas, les lagunes de Salses-Leucate et de Thau sont sous l'influence de plusieurs rivières qui créent des gradients de salinité, ce qui pourrait expliquer le faible impact du parasite dans ces zones (Fleury et al., 2007). Ces habitats pourraient donc représenter des refuges qui protègent les dernières populations de grandes nacres de la pandémie, du fait des conditions physico-chimiques potentiellement défavorables au développement du parasite.

2. 1. b. Un important patrimoine génétique encore préservé.

Une importante diversité génétique a été mise en évidence pour tous les sites échantillonnés le long de la côte occitane (**Chapitre 3**). Des taux de diversité génétique élevés

ont également été observés chez d'autres populations de grandes nacres en Espagne et aux îles Baléares (González-Wangüemert et al., 2019; Wesselmann et al., 2018) et sont assez classiques des valeurs retrouvées chez d'autres espèces de bivalves (Dupont et al., 2007; Šegvić-Bubić et al., 2020; Tarnowska et al., 2010). De tels taux de diversité génétique sont généralement attribués au mode de reproduction des organismes marins sessiles ayant une fécondation externe car l'expulsion des gamètes se fait de façon massive et synchronisée chez tous les adultes d'une population. Les événements de reproduction impliquent donc un grand nombre de reproducteurs ce qui génère des tailles de populations efficaces importantes et maintient une forte diversité génétique (Ellegren and Ellegren, 2016; Mendo et al., 2014; Žuljević et al., 2018).

L'homogénéité génétique mise en évidence sur l'ensemble de la côte (**Chapitre 3**) implique qu'une très grande partie de la diversité génétique des populations occitanes reste conservée dans les lagunes de Thau et de Salses-Leucate. Les lagunes du littoral occitan représentent donc une opportunité unique pour la préservation de l'espèce car maintenir un fort taux de diversité génétique est un des principaux enjeux de la biologie de la conservation, comme décrits par Frankham (2003). Une forte diversité génétique offre un éventail plus large de réponses possibles en cas de perturbation du milieu. Elle détermine la pérennité et la résilience d'une population car elle augmente la probabilité qu'un génotype résistant à la perturbation soit présent chez certains individus (Hughes et al., 2008; Oliver et al., 2015). Il a également été démontré qu'une diversité génétique élevée augmentait la résistance aux maladies et réduisait la propagation des parasites dans les populations d'hôtes (Altermatt and Ebert, 2008; King and Lively, 2012). Ainsi, la diversité génétique est positivement corrélée à la fitness de la population (Reed and Frankham, 2003). Les populations lagunaires laissent envisager la possibilité de voir l'émergence d'un génotype résistant au parasite. Elles représentent également une ressource génétique particulièrement importante qui sera utile pour la mise en place de plans de sauvegarde et de repeuplement, naturels ou facilités, et auront donc un rôle primordial dans la survie de l'espèce.

2. 1. c. Une contribution incertaine des populations lagunaires au maintien de l'espèce sur la côte.

Les populations de grandes nacres lagunaires sont parmi les dernières encore vivantes et maintiennent une forte diversité génétique. Il est donc probable qu'elles auront un rôle à

jouer dans la survie et le repeuplement de l'espèce. Cependant, les résultats de cette thèse n'ont pas permis de déterminer avec précision la contribution relative de ces populations lagunaires au maintien des autres populations sur le littoral occitan (**Chapitre 3**). Aucune différenciation génétique n'a pu être mise en évidence au cours de toutes les analyses réalisées, que ce soit en termes de diversité génétique, fréquences alléliques ou de combinaisons d'allèles. L'absence de différenciation génétique est généralement attribuée à une forte connectivité entre les sites mais elle correspond avant tout à un équilibre entre les effets de la dérive génétique et de la migration. Dans le cas d'une population avec une grande taille efficace, l'effet de la dérive est limité et un faible taux de migration suffit à maintenir l'homogénéité génétique. Dans notre cas, il est difficile de faire la différence entre un scénario avec beaucoup de connectivité entre les populations et un scénario avec une faible connectivité mais des populations avec de grandes tailles efficaces qui se maintiennent grâce à une contribution dominante de l'auto-recrutement.

De la même façon dans la littérature, aucune différenciation génétique n'a été mise en évidence entre les populations de grandes nacres des îles Baléares et de la côte Espagnole (González-Wangüemert et al., 2019; Wesselmann et al., 2018). Grâce à des simulations de l'hydrodynamisme et de la dispersion larvaire, Wesselmann et al. (2018) ont mis en évidence un fort potentiel de dispersion des larves. L'hypothèse d'une forte connectivité entre les différents sites de notre zone d'étude est compatible avec la capacité de dispersion larvaire estimée par leur modèle. Cette hypothèse est également supportée par notre étude détaillée sur une population en particulier et qui montre l'absence d'auto-recrutement mise en évidence dans la baie de Peyrefite (**Chapitre 4**). Il semble donc cohérent de considérer que les populations de la côte Occitane sont structurées en métapopulation avec des populations sources qui exportent des larves et des populations puits qui sont essentiellement maintenues par des apports de larves depuis les populations voisines.

Cependant, dans le cas des populations lagunaires, il est possible que le taux d'auto-recrutement soit fort car, la configuration géographique semi-fermée de la lagune limite les échanges d'eau avec la mer, ce qui pourrait également limiter l'exportation de larves vers l'extérieur. Des populations génétiquement isolées ont déjà été mises en évidence en Grèce (Katsares et al., 2008) et dans la lagune de Venise (Sanna et al., 2013), qui a une configuration similaire à celle des lagunes de Thau et de Salses-Leucate. La connectivité lagune-mer a été très peu documentée, notamment dans le Golfe du Lion, mais quelques études ont mis en

évidence une absence de différenciation génétique chez différentes espèces (Boissin et al., 2011; Borsa et al., 1994; Skalamera et al., 1999). Cependant, il est possible que la situation soit similaire à celle de *P. nobilis* et qu'il ne soit pas possible de différencier entre les scénarios avec une forte connectivité vs une faible connectivité mais de grandes tailles efficaces. De plus, grâce à des simulations de l'hydrodynamisme et de la dispersion larvaire dans la lagune de Mar Menor, une étude a montré que la connectivité entre les lagunes et la mer pourrait être très limitée (Pérez-Ruzafa et al., 2019a).

Récemment, grâce à des collecteurs larvaires disposés le long des côtes françaises et espagnoles, de nouvelles recrues ont été observées dans des zones où les populations de grandes nacres avaient été décimées par *H. pinnae* (Kersting et al., 2020). En utilisant des modèles Lagrangiens, les auteurs estiment que les larves trouvées, en 2018, dans les collecteurs à Son Saura (Minorque, Espagne), ou dans les îles des Embiez en France, pourraient être originaires de la côte Occitane et donc des deux principales lagunes (Thau et Salses-Leucate). En juillet 2018, nous avons vu les premières mortalités massives causées par le parasite sur la côte rocheuse des Albères. Ainsi, certaines populations ont été décimées, notamment celle de la baie de Peyrefite, mais il restait encore quelques populations saines dans les habitats côtiers. Cependant, les populations lagunaires représentant près de 90 % de l'abondance totale sur le littoral occitan, il est possible que ces larves présentes dans les collecteurs soient natives des lagunes. Si c'est le cas, les populations lagunaires pourraient permettre le repeuplement de l'espèce même pour des zones très éloignées, grâce à la dispersion larvaire.

2. 1. d. Des habitats instables

Comme décrit précédemment, les lagunes sont soumises à de fortes perturbations qui peuvent conduire à l'instabilité de l'écosystème. Ce sont des habitats relativement fermés où le volume d'eau est faible. Les lagunes réagissent donc rapidement aux conditions environnementales et peuvent être soumises à de fortes variations des paramètres physico-chimiques à la fois journalières et saisonnières (Kennish and Paerl, 2010; Pérez-Ruzafa et al., 2019b). L'effet du vent et des vagues peut augmenter de façon importante la turbidité, limitant ainsi la pénétration de la lumière, ce qui peut également conduire à une réduction de la production primaire. La colonne d'eau, sensible aux variations de température, est parfois soumise à de fortes diminutions de la solubilité de l'oxygène qui déstabilisent l'équilibre respiration/production primaire (Pérez-Ruzafa et al., 2019b). De plus, les lagunes

sont propices au développement économique qui entraîne des pressions anthropiques fortes (défrichage, agriculture et utilisation de fertilisants, production animale, combustion d'énergie fossile, etc.). Ces activités s'accompagnent généralement d'importants rejets de nutriments, notamment de nitrate et de phosphate, qui modifient l'équilibre biogéochimique du milieu naturel (Cloern, 2001). L'apparition d'épisodes d'eutrophisation et de conditions hypoxiques, voire anoxiques, n'est donc pas rare dans les lagunes entraînant des conséquences dramatiques sur la faune benthique. Ces phénomènes sont également exacerbés par le réchauffement climatique (Lloret et al., 2008).

En 2019, dans la lagune de Mar Menor, une tempête a ainsi considérablement augmenté les apports d'eau douce et de nutriments, puis des conditions atmosphériques très stables pendant des semaines ont entraîné une stratification de la colonne d'eau. Cette stratification couplée aux apports de nutriments a entraîné un appauvrissement en oxygène dans le fond de la lagune, conduisant à des conditions euxiniques¹, létales pour la plupart des organismes vivants (Álvarez-Rogel et al., 2020). Une situation similaire avait eu lieu en 2015 où près de 85 % de la faune benthique avait été décimés (Garcia-Ayllon, 2018; Sandonnini et al., 2021). Même si *P. nobilis* a une certaine tolérance à l'hypoxie (Basso et al., 2015a; Cappello et al., 2019; Laganà et al., 2014), de tels événements d'eutrophisation entraînent également la production d'autres composés chimiques (sulfure d'hydrogène, ammoniac) létaux pour les organismes benthiques.

Les lagunes occitanes ne sont pas à l'abri de ce type de scénario. Par exemple, l'étang de Berre, situé dans le Golfe du Lion, et ayant des caractéristiques géomorphologiques similaires à celles de Thau et de Salses-Leucate, a fait l'objet d'une gestion désastreuse qui a entraîné le développement de conditions physico-chimiques catastrophiques et la disparition de la vie benthique (Bernard et al., 2007; Pakhomova et al., 2018). Les lagunes de Salses-Leucate et de Thau sont généralement considérées en bon état écologique et présentent donc peu de risques d'eutrophisation (Bec et al., 2011). Cependant, au cours de cette thèse et pendant les suivis de la propagation du parasite responsable des mortalités de masse chez *P. nobilis*, nous avons constaté la disparition totale de la population de l'étang de l'Ayrolle entre 2018 et 2019. Comme aucun tissu n'a pu être prélevé, il n'a pas été possible de tester génétiquement la présence de *H. pinnae*. Cependant, aucun signe de mortalité liée

¹ Conditions anoxiques et sulfuriques

au parasite n'avait pu être observé dans cette zone auparavant et, à ce moment-là, *H. pinnae* avait été détecté uniquement dans les populations de la côte rocheuse. Il est donc difficile d'attribuer ces mortalités à *H. pinnae*. De plus, nous n'avons aucune information sur des mortalités particulières chez d'autres espèces dans l'étang. La disparition de la population de nacres pourrait donc avoir été causée par une multitude d'autres facteurs liés au déséquilibre des conditions physico-chimiques dans l'habitat comme le développement de conditions hypoxiques dues à une forte augmentation de température ou à la prolifération d'un autre pathogène. Dans cette lagune, les individus étaient de petites tailles, ce qui va également dans le sens d'une faible survie, avec des événements de mortalité réguliers qui empêchent les nacres d'atteindre l'âge adulte.

Des conditions écologiques défavorables, ou la présence de certains polluants, sont également susceptibles d'impacter le développement gamétique des bivalves et d'entraîner l'apparition d'organismes hermaphrodites simultanés (Syasina et al., 1996). Ce phénomène a déjà été observé chez *P. nobilis* en conditions contrôlées (Trigos et al., 2018) et dans la baie des Alfacs avec, respectivement 38 % et 20 % d'organismes présentant simultanément des gonades mâle et femelle matures (Prado et al., 2020), alors que l'espèce est hermaphrodite successive. Un développement gonadique anormal est susceptible d'impacter la viabilité des larves, réduisant ainsi le rendement de la reproduction, ou de conduire à un fort taux d'autofécondation. L'autofécondation peut affecter de multiple façon les processus d'adaptation d'une population, par exemple en diminuant la diversité génétique et la recombinaison qui crée de nouveaux haplotypes, en exacerbant les effets de la dérive génétique ou en réduisant la taille de la population efficace (Hartfield et al., 2017).

Les grandes nacres lagunaires observées dans cette thèse sont parmi les dernières populations denses encore saines en Méditerranée. Il est probable qu'elles auront un rôle important à jouer dans la survie de l'espèce et notamment dans le repeuplement des habitats côtiers. Cependant, elles sont situées dans des milieux à l'équilibre instable, la survie de l'espèce peut donc être considérée comme très incertaine. Ces populations des étangs de Thau et de Salses-Leucate doivent donc être considérées comme des priorités de conservation et il est nécessaire de veiller au maintien du bon état écologique des lagunes car il est inhérent à leur survie.

1. 3. Implications pour la conservation

3. 1. a. Définition d'un état de référence

L'ensemble des résultats de cette thèse ont permis d'accumuler des connaissances qui contribuent à une meilleure compréhension des exigences écologiques et du fonctionnement des populations de grandes nacres. Un état de référence est indispensable pour mettre en place des mesures de conservation car il permet de fixer des objectifs de restauration et d'évaluer l'efficacité des actions effectuées. Définir un état de référence peut s'avérer très compliqué et il s'agit d'un sujet largement débattu dans la communauté scientifique (Alagona et al., 2012; Bull et al., 2014). Théoriquement, il correspondrait à l'état de l'écosystème, dans des conditions « pristines », tel qu'il aurait été sans l'intervention et la présence de l'homme, mais il est rarement possible d'avoir accès à de telles données. Dans notre cas, les grandes nacres ont subi, dès l'Antiquité, un large éventail de pressions anthropiques (exploitation, pollution, réduction de l'habitat, etc.) et il n'existe pas de description d'un état de référence pour ses populations. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence des populations denses et abondantes, comparées aux autres populations en Méditerranée, et une diversité génétique élevée, ce qui laisse envisager un relativement bon état écologique de l'espèce. Bien qu'ils comportent certaines lacunes inhérentes à tout travail scientifique en développement, l'ensemble des résultats de cette thèse permettent donc d'avoir un aperçu de l'état des populations, en termes de distribution spatiale, structuration génétique et fonctionnement des populations, sur le littoral occitan, avant la pandémie. Nous proposons que cet état puisse donc servir de référence pour l'implémentation de mesures de protections et évaluer leur efficacité dans le futur.

3. 1. b. Quel futur pour l'espèce ?

Compte tenu de la situation actuelle, il est très difficile de prédire le futur de l'espèce. Entre 1983 et 1984, une épidémie très similaire à celle touchant actuellement les grandes nacres, a décimé les populations d'oursins diadèmes, *Diadema antillarum* (Philippi, 1845), à travers les Caraïbes (Hughes et al., 1987). Les causes de cette épidémie restent encore mal connues mais seraient potentiellement attribuées à une bactérie du genre *Clostridium*, spécifique à *D. antillarum* et transportée par les courants (Lessios, 1988). Les taux de mortalité étaient de 93 à 100 % dans les populations infectées (Lessios, 2016). La disparition de ces oursins, couplée à la surpêche des poissons herbivores, a entraîné un changement drastique dans les écosystèmes coralliens, avec un passage d'un état dominé par le corail à

un état dominé par des communautés algales. Près de 30 ans plus tard, les populations peinent à se rétablir et les densités actuelles ne sont que d'environ 12 % de celles enregistrées à l'époque (Lessios, 2016). Les raisons de cette faible récupération sont mal comprises mais certains auteurs font l'hypothèse que le pathogène serait toujours présent dans le milieu et continuerait à causer d'importantes mortalités, limitant ainsi le recrutement (Lessios, 2016). De plus, de la même façon que pour *P. nobilis*, les oursins sont des espèces ayant une fécondation externe et dont le succès reproducteur est intrinsèquement dépendant de la densité (Levitan, 2004). Ainsi, la faible densité d'oursins survivants limiterait le succès de la reproduction. Enfin, le recrutement pourrait être limité par une trop forte pression de prédation et par la couverture algale qui s'est développée après l'effondrement des populations en 1984 et qui limiteraient l'installation des larves (Lessios, 2016).

Pour l'instant, des populations de grandes nacres, saines et abondantes, sont encore conservées dans les lagunes, préservant ainsi une bonne partie de la diversité génétique, sur la côte Occitane. Cependant, ces populations ne pourront participer au repeuplement des habitats côtiers que si elles exportent effectivement un nombre de larves conséquent vers l'extérieur des lagunes. De plus, rien ne dit qu'il ne s'agit pas d'une question de temps avant que le parasite ne gagne finalement les lagunes et décime les dernières populations. La forte diversité génétique mise en évidence dans l'ensemble des études sur les grandes nacres laisse envisager l'opportunité de voir émerger un génotype résistant. Quelques observations d'individus survivants dans des zones infectées, donc potentiellement résistants, ont été signalées dans des populations côtières (Vázquez-Luis et al., 2021). La comparaison de l'expression des gènes (i.e. le transcriptome) entre des individus résistants et des individus non résistants a mis en évidence une signature d'expression génique spécifique au génotype résistant, notamment pour les gènes impliqués dans l'immunité (**Annexe 3**). Cependant, ces observations sont tellement éparses et anecdotiques qu'il est peu probable que ces individus suffisent à maintenir ou à repeupler les populations. Sur la population de la baie de Peyrefite, estimée avant la pandémie à environ 630 individus, seuls 4 individus ont survécu et ont été identifiés comme résistants au parasite, ce qui ne représente que 0,6 % de la population. Malheureusement, ces 4 individus ont fini par mourir, probablement de mortalité naturelle en raison d'autres stress, renforçant également l'hypothèse de faible longévité des nacres dans la baie de Peyrefite. Les grandes nacres sont des organismes avec un mode de

reproduction externe, le succès de la fécondation est donc intrinsèquement lié à la distance entre les individus (André and Lindegarth, 1995; Crimaldi, 2012; Levitan, 2004). En l'état, il est donc presque impossible d'envisager que des individus résistants présents sur la côte ne se reproduisent. De plus, même s'ils se reproduisent, la mortalité naturelle, notamment par prédation, chez les nouvelles recrues d'invertébrés benthiques est généralement très élevée. Ainsi, lors d'expérience de monitoring des jeunes stades de vie des grandes nacres, d'importantes mortalités par prédation ont été observées, causées principalement par le gastéropode *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758), des poissons tels que *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) ou des espèces de céphalopodes (Kersting and García-March, 2017). L'homogénéité génétique mise en évidence sur toute la côte suggère également que toutes les populations partagent la même susceptibilité au parasite, et que le nombre d'individus résistants sera faible. La survie de l'espèce pourrait donc ne dépendre que d'un petit nombre d'individus et même si la diversité génétique est élevée, elle est susceptible d'être considérablement réduite si seuls les individus ayant un génotype résistant au parasite survivent. Les tailles de populations seront drastiquement réduites ce qui s'accompagnera de l'isolement de certaines d'entre-elles, d'effets fondateurs et donc probablement d'une forte dépression de consanguinité. La relation entre dépression de consanguinité et risque d'extinction a largement été décrite chez de nombreuses espèces (Frankham and Ralls, 1998; Hedrick and Kalinowski, 2000) et limiter la consanguinité est désormais un des principaux enjeux de la biologie de la conservation (Frankham, 2003).

3. 1. c. Recommandations pour la conservation

Dans ce contexte, les résultats de cette thèse permettent de définir un certain nombre de recommandations pour l'adaptation des mesures de conservation dans le but de réduire les pressions et d'augmenter les chances de succès de restauration des populations de grandes nacres. Il existe une multitude d'approches dans le domaine de la restauration écologique mais elles peuvent globalement être classées en deux catégories : les approches passives (« Putting Nature First ») qui sont caractérisées par un faible niveau d'intervention de l'homme sur l'environnement et dont les objectifs principaux sont de renforcer les mesures de protections et de limiter les pressions afin de laisser la nature se régénérer. Les approches actives (« Bringing Nature Back ») sont caractérisées par des niveaux d'intervention de l'homme plus élevés (Smith et al., 2021) et partent du principe que les dégradations sont trop importantes pour que l'espèce ou l'écosystème puisse se restaurer sans actions

humaines. Elles consistent généralement en la mise en place de mesures actives comme la reproduction en captivité, la réintroduction d'individus pour repeupler les populations, etc.

La grande nacre de Méditerranée est une espèce protégée par Directive Européenne Habitat Faune-Flore n°92/43/CEE qui définit *P. nobilis* comme espèce animale d'intérêt communautaire depuis le 21 mai 1992. Elle figure dans l'Annexe II de la Convention de Barcelone (1995) qui liste les espèces Méditerranéenne en danger ou menacées. En réponse à la situation catastrophique actuelle, son statut a également été réévalué et elle est désormais considérée comme « en danger critique d'extinction » sur la liste rouge de l'IUCN. Cependant, les mesures de protections ne sont pas toujours respectées et l'espèce subit encore beaucoup de pressions. Par exemple, alors que son prélèvement et sa consommation sont strictement interdits, elle était encore servie récemment, parfois régulièrement, dans près de 20 % des restaurants en Grèce (Katsanevakis et al., 2011). De plus, les populations de grandes nacres sont généralement situées dans des habitats peu profonds (< 15 m) et sont souvent soumises à des mortalités accidentelles causées, par exemple, par l'ancrage des bateaux ou les captures accessoires dans les filets de pêche (Öndes et al., 2020). Il est donc nécessaire de renforcer les mesures de protection déjà en place, à la fois dans les lagunes qui ont été identifiées comme particulièrement importantes pour l'espèce, ainsi qu'en mer où de rares individus survivants ont été signalés dans des zones où la population en place avait été décimée par le parasite. Une attention particulière doit être portée à ces individus car ils sont susceptibles de porter un génotype permettant une certaine résistance au parasite et ils pourraient donc jouer un rôle crucial dans la survie de l'espèce.

L'espèce est structurée en métapopulation, sur le littoral Occitan, avec des populations qui sont interdépendantes et interconnectées grâce à la dispersion larvaire (**Chapitre 3 et 4**). Les analyses réalisées dans le **chapitre 4** montrent que la population de la baie de Peyrefite, située dans la Réserve Naturelle Marine de Cerbère-Banyuls, se maintient uniquement grâce aux apports de larves provenant des populations alentours. Ce résultat montre l'importance d'intégrer la dynamique de l'espèce et les échelles d'interactions entre ses populations lors de la mise en place de mesures de protection. Une aire marine protégée (AMP) localisée ne suffit pas forcément à assurer le maintien d'une population. Ainsi, si la population de la baie de Peyrefite se retrouvait isolée et qu'elle n'était plus alimentée en larves par les populations voisines, elle serait vouée à disparaître malgré l'effort de protection fourni par la Réserve. Pour être efficace, une AMP doit assurer son propre maintien mais aussi être connectée à

d'autres AMP grâce à la dispersion larvaire (Hastings and Botsford, 2006). En cas de perturbation ou d'extinction locale, les populations des autres AMP peuvent alors participer à la restauration en exportant des larves (Gonzalez, 1998). Les réseaux d'AMP apparaissent donc comme des outils plus adaptés pour la protection des espèces ayant des capacités de dispersion importantes car ils intègrent mieux l'aspect dynamique de la structure spatiale des populations et permettent donc une meilleure résilience au sein de chaque AMP en cas de perturbation locale (Airamé et al., 2003; Planes et al., 2009).

Dans le contexte actuel, il est possible que les actions passives de protections ne soient pas suffisantes pour assurer le maintien de l'espèce et pour restaurer les populations. La grande nacre de Méditerranée est un organisme à fécondation externe dont le succès reproducteur est dépendant de la densité de la population. Cependant, la plupart des populations en mer ont été décimées par la pandémie et les quelques individus résistants sont probablement distribués de façon trop sporadique pour pouvoir se reproduire, en supposant qu'il en existe d'autres en dehors de la baie de Peyrefite. Actuellement, on peut considérer que la restauration des populations de grandes nacres repose exclusivement sur la capacité des populations lagunaires à exporter des larves vers les habitats côtiers.

La réintroduction d'individus est une méthode qui a largement été utilisée pour recréer des populations en cas d'extinction locale ou dans le but de repeupler des populations existantes lorsque la densité ou la taille de la population est trop faible pour assurer le succès reproducteur (Reading et al., 2002; Robinson et al., 2020; Seddon et al., 2014). Le succès des programmes de réintroduction dépend intrinsèquement de la réduction des menaces et des causes de l'extinction (Robinson et al., 2020). Dans le cas de *P. nobilis*, la réimplantation d'individus dans le milieu ne peut être envisagée que si l'habitat est dépourvu de parasite et de risque d'infection par *H. pinnae*. Cependant, on peut également imaginer, dans un futur proche, des programmes de reproduction en aquarium d'individus résistants dans un but de réintroduction dans le milieu afin de restaurer les populations.

Dans un premier temps, il est nécessaire de s'assurer qu'une fois réintroduits, les individus seront capables de se reproduire de façon naturelle afin d'assurer le maintien de la population. En effet, d'importantes divergences génétiques sont susceptibles de créer des isolements reproductifs au sein d'une même espèce et entraîner une descendance ayant un faible succès reproducteur (Ganz and Burton, 1995). L'homogénéité génétique et l'important

niveau de connectivité entre les populations (**Chapitre 3**) laissent envisager qu'il n'y aura pas de risque d'incompatibilité génétique entre les individus provenant de différentes populations.

Le site pour l'installation des individus est un paramètre très important à prendre en compte pour maximiser le succès de réintroduction. La baie de Peyrefite, située dans la Réserve Naturelle Marine de Cerbère-Banyuls, apparaissait comme le site idéal pour réimplanter une population de grandes nacres grâce à la présence d'un herbier de posidonies dense et à la protection renforcée fournie par l'AMP. Cependant, la population en place avant la pandémie n'était pas du tout autosuffisante et se maintenait uniquement grâce aux apports de larves depuis les populations voisines. Depuis la disparition de cette population en 2018, aucun recrutement n'a été observé dans cette zone, indiquant que les populations sources ont également été décimées. Réintroduire une population dans la baie de Peyrefite présente donc à la fois des avantages et des inconvénients car d'un côté, elle aurait le potentiel d'exporter beaucoup de larves vers l'extérieur et de contribuer au repeuplement d'autres sites mais il faudra régulièrement réintroduire de nouveaux individus. De plus, le rapide turnover mis en évidence au cours du chapitre 4 laisse envisager que la survie des individus est relativement faible dans ce site.

Les lagunes pourraient être l'endroit idéal pour introduire des individus sains et résistants. En effet, installer des individus résistants au milieu d'une population naturelle dense permettrait d'augmenter considérablement la proportion de génotypes résistants. Grâce à la reproduction, ces génotypes seront multipliés et exportés vers d'autres sites à travers la dispersion larvaire. De plus, les lagunes semblent répondre le mieux aux exigences écologiques de l'espèce. Ainsi, le type de substrat ne semble pas être un facteur limitant, tant qu'il est meuble, et la présence de végétation n'est pas obligatoire mais favorise le développement des grandes nacres. De la même façon, la profondeur ne semble pas limitante, tant qu'elle est suffisamment importante pour permettre aux individus de rester immergés. Bien qu'il n'ait pas été mesuré, l'hydrodynamisme semble être un paramètre clé dans la structuration des populations de grandes nacres car il réduit la survie lorsqu'il est trop fort (**Chapitre 1 et 4**). Cependant, un certain niveau d'hydrodynamisme semble nécessaire car, dans les lagunes, les populations les plus denses se trouvaient près des connections à la mer. Un courant constant permet ainsi l'apport de nourriture, de larves au moment du recrutement et assure une bonne oxygénation de la colonne d'eau, ce qui est

particulièrement important dans les lagunes où le risque d'eutrophisation et d'hypoxie sont important. Les herbiers situés dans les lagunes, à proximité des connections à la mer, apparaissent donc comme les habitats susceptibles de maximiser la survie des grandes nacres. De plus, leur présence à proximité de l'ouverture de la lagune augmenterait la probabilité que des larves soient exportées à l'extérieur, vers les habitats côtiers.

Enfin, la recommandation la plus évidente mais aussi peut être la plus efficace qui puisse être faite est probablement celle de la concertation et de la collaboration entre les différents acteurs de la conservation, à la fois sur le plan local, national et international. Dans le contexte actuel de la pandémie, il y a une réelle nécessité de créer une synergie pour mettre en place des actions à la fois locales et globales, cohérentes et simultanées à travers les pays du pourtour Méditerranéen.

Mettre en place une coordination internationale est généralement un défi, particulièrement en ce qui concerne la mer Méditerranée car elle concentre, sur une zone restreinte, près de 20 pays, à travers trois continents différents (Europe, Afrique et Asie), avec chacun des contextes politiques et écologiques très hétérogènes. La zone Méditerranéenne est considérée comme un « hotspot » de biodiversité caractérisé par un fort taux d'endémisme, mais concentre énormément de pressions anthropiques (Myers et al., 2000) et la plupart des mesures de conservation sont généralement mises en place avec peu de concertations entre les différents pays. Cependant, la collaboration entre les différents pays permet d'augmenter considérablement l'efficacité des mesures mises en place tout en réduisant substantiellement les coûts (Mazor et al., 2013). Alors que le manque de connaissances et de moyens, à la fois financiers et matériels, sont généralement identifiés parmi les principaux freins à la conservation (Lindenmayer et al., 2013; Smith et al., 2021), la collaboration internationale permet de mutualiser les connaissances et les compétences, de fixer de meilleurs objectifs et de réduire les coûts. La mise en place d'AMP illustre parfaitement ce besoin de collaboration entre pays. En Méditerranée, les AMP sont généralement petites et ne reposent pas sur une législation ou une mise en place coordonnée et chaque pays a ses propres lignes directrices et sa propre gestion de ses AMP. Cependant, une concertation internationale permettrait de définir le positionnement des AMP de façon plus stratégique afin de maximiser leur connectivité et de former des réseaux d'AMP plus efficaces (Lubchenco et al., 2003).

La mise en place de mesure de conservation fait intervenir une multitude d'acteurs, incluant les scientifiques, les gestionnaires de sites protégés, des organisations ou associations mais également les différents usagers de la zone à protéger, professionnels ou non, ainsi que des institutions administratives et des décideurs politiques et chacun a ses propres priorités. Pour que la collaboration, et donc les mesures de conservation mises en place, soit efficace, il faut qu'elle soit basée sur la concertation entre les différents acteurs et leur engagement (Clark and Brunner, 2002). Pour assurer une gestion efficace, il est indispensable qu'elle soit basée sur un plan d'action, un programme de conservation flexible, établi en concertation avec les différents acteurs et qui définit des objectifs afin d'organiser les actions de restauration (Williams, 2011). Dans le cas de *P. nobilis*, les pressions subies par l'espèce sont à la fois locales (réduction de l'habitat, pollution, braconnage) et globale (pandémie). Il est donc nécessaire de mettre en place une synergie entre les acteurs impliqués à différentes échelles afin de définir des objectifs locaux (augmentation de la protection, maintien de la bonne qualité écologique des habitats) et globaux (définition d'objectifs de recherche, répartition des tâches et mutualisation des connaissances et des expériences).

2. Perspectives

2. 1. Fonctionnement de l'espèce sur le littoral Occitan.

Cette thèse apporte des connaissances sur le fonctionnement des populations de grandes nacres, à l'échelle de la côte Occitane. Ainsi, l'espèce est structurée en métapopulation et les populations sont interdépendantes et connectées via la dispersion larvaire. A travers tous nos sites d'échantillonnage, aucune différenciation génétique n'a pu être mise en évidence. L'étendue géographique de la métapopulation reste donc encore à déterminer. Les études génétiques réalisées sur la côte Espagnole et aux îles Baléares laissent supposer que les populations de grandes nacres espagnoles et françaises seraient connectées (González-Wangüemert et al., 2019; Kersting et al., 2020; Wesselmann et al., 2018). Une étude génétique intégrant ces deux zones permettrait de déterminer avec plus de précision la connectivité et les patrons de dispersion et apporterait une meilleure compréhension du fonctionnement de la métapopulation. Suite à la pandémie, presque la totalité des populations de grandes nacres a été décimée, à l'exception des populations lagunaires.

Acquérir une meilleure connaissance des processus qui contrôlent la régulation et le maintien des populations, en incluant les habitats lagunaires, avant la pandémie, permettra de mieux prédire le futur de l'espèce et d'évaluer les capacités de récupération de l'espèce.

Bien que les lagunes abritent près de 90 % de l'abondance totale mise en évidence sur le littoral Occitan, la contribution et le rôle de ces populations lagunaires au fonctionnement de l'espèce sur la côte reste à déterminer. Au cours de nos analyses, il n'a pas été possible de faire la différence entre un scénario avec beaucoup de connectivité entre les populations et un scénario avec une faible connectivité mais des populations lagunaires avec de grandes tailles efficaces qui se maintiennent seules grâce à de forts taux d'auto-recrutement. Suite à la pandémie, la quasi-totalité des populations côtières ont été décimées, à travers toute la Méditerranée. Les populations des lagunes Occitanes ainsi que celles de Mar Menor et de la baie des Alfacs en Espagne sont donc les dernières populations denses du bassin ouest de la mer Méditerranée. Ces populations auront un rôle particulièrement important pour le futur de l'espèce mais sont également susceptibles de se retrouver isolées. Il est donc indispensable de déterminer les échelles d'interaction de ces populations et leur capacité à exporter des larves vers les habitats côtiers afin de participer au repeuplement. Au printemps 2021, un grand nombre de nouvelles recrues a été observé dans la lagune de Salses-Leucate (T. Morage, communication personnelle) alors que toutes les populations en mer ont été décimées. Ces recrues sont forcément des individus issus de la reproduction de l'été 2020. Comme les populations lagunaires sont les seules encore en vie, il paraît évident que ces nouvelles recrues ont été produites localement. Une approche similaire à celle réalisée pour la population de la baie de Peyrefite (**Chapitre 4**) permettrait de mieux comprendre le fonctionnement d'une population lagunaire. De plus, l'installation de capteurs larvaires (Kersting et al., 2020) dans les lagunes, à la sortie des lagunes et dans les différents sites côtiers précédemment colonisés par l'espèce permettrait d'évaluer l'exportation des larves depuis les lagunes. Enfin, d'après les résultats des entretiens réalisés auprès des usagers des lagunes (**Chapitre 1**), il semblerait que les populations lagunaires soient relativement jeunes et que l'espèce n'était pas présente, ou moins abondante, il y a une dizaine d'années. Déterminer l'origine de ces populations lagunaires permettrait de mieux comprendre leur rôle dans le fonctionnement global de l'espèce. L'utilisation de modèles de coalescence permettrait de déterminer l'histoire démographique des populations. Les approches de coalescence utilisent des modèles rétrospectifs pour suivre les allèles d'un gène partagé par

tous les individus de la population échantillonnée, jusqu'à une copie ancestrale qui correspond alors à l'ancêtre commun de la population (Tavaré et al., 1997). Grâce à ces approches, il est donc possible de déterminer les flux de gènes qui ont eu lieu dans le passé et d'estimer les relations historiques entre les populations.

Les lagunes de la côte Occitane ont été identifiées comme des habitats particulièrement favorables au développement des grandes naces. De grands individus et différentes classes de taille ont été observés dans ces habitats ce qui laisse supposer d'un bon taux de survie et des événements de recrutement successifs. Cependant, la taille n'est pas toujours un bon proxy de l'âge car le taux de croissance peut être très variable en fonction des conditions du milieu (García-March et al., 2020a). De plus, certaines études ont montré que des individus en milieu eutrophe présentaient des taux de croissance plus rapides que ceux des milieux oligotrophes mais qu'ils avaient des taux de survie plus faibles (Alomar et al., 2015; García-March et al., 2020a). La méthode de modélisation du taux de croissance chez la grande nacre est assez bien décrite (García-March et al., 2020a, 2011; Richardson et al., 1999) et est basée sur l'étude sclérochronologique des coquilles. Estimer les paramètres de croissance des populations lagunaires serait un bon moyen pour d'évaluer leur structure démographique et permettrait d'avoir une meilleure estimation de la survie des individus dans ces habitats.

2. 2. Evaluation de l'impact de la disparition de *Pinna nobilis* sur le milieu

Lors de l'épidémie de 1983 aux Caraïbes, la disparition des oursins diadèmes a entraîné un changement drastique de l'environnement, faisant basculer l'écosystème d'un état dominé par le corail vers un état dominé par les algues qui perdure encore aujourd'hui (Lessios, 2016). La grande nacre est généralement considérée comme une espèce ayant un rôle important dans l'écosystème. En tant qu'organisme suspensivore, on suppose qu'elle participe activement au recyclage de la matière organique et au maintien de la clarté de l'eau en filtrant de grandes quantités de débris et de matière organique en suspension (Davenport et al., 2011; Trigos et al., 2014b). La disparition d'une telle espèce est donc susceptible d'entraîner des conséquences négatives à différents niveaux trophiques et de modifier l'habitat.

Dans certaines conditions la disparition d'une espèce dans un écosystème peut, par effet de cascade, entraîner l'extinction d'autres espèces, notamment des espèces commensales ou parasites (Kehoe et al., 2020). Ce type de phénomène est courant dans le cas d'espèces structurantes de l'habitat. Par exemple, la disparition locale du frêne commun, *Fraxinus excelsior* (Linnaeus, 1753), est susceptible d'entraîner la disparition de près de 115 autres espèces qui vivent fortement associées à ces arbres (Hultberg et al., 2020). La grande nacre est généralement

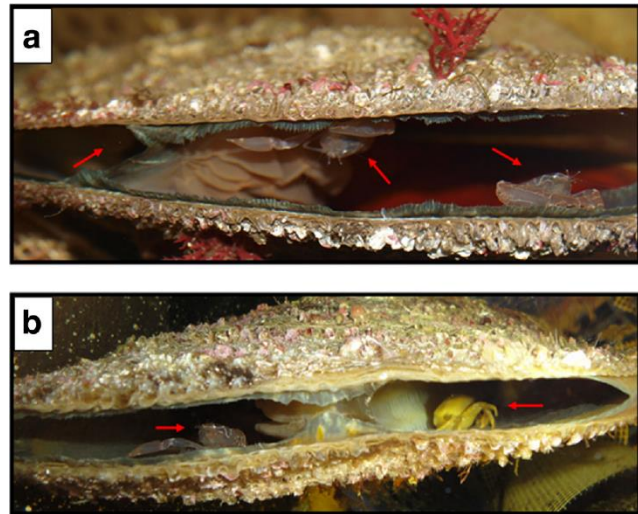


Figure 17 Illustration de l'association entre *Pinna nobilis* et les deux espèces commensales *Pontonia pinnophylax* et *Nepinnotheres pinnotheres*, indiquées par les flèches rouges. (a) Individus de *P. pinnophylax* et (b) *P. pinnophylax* et *N. pinnotheres* coexistant au sein de la même grande nacre (Trigos and Vicente, 2019).

considérée comme une espèce structurante car sa grande coquille est colonisée par une multitude d'organismes épibiontes, ce qui augmente la biodiversité locale (Giacobbe, 2002; Rabaoui et al., 2009). De plus, elle abrite deux espèces commensales (**Figure 18**), une crevette *Pontonia pinnophylax* (Otto, 1821), pour qui la présence de *P. nobilis* est indispensable lors du développement (Costanzo et al., 1996, 1991), et le crabe *Nepinnotheres pinnotheres* (Linnaeus, 1758) qui utilise les nacres comme abri temporaire (Rabaoui et al., 2008; Trigos and Vicente, 2019). Ces espèces sont présentes chez environ 20 à 50 % des grandes nacres (Rabaoui et al., 2008; Richardson et al., 1997).

La disparition d'une espèce laisse également une niche écologique vacante qui peut alors être utilisée par des espèces qui étaient moins compétitives que celle précédemment en place (Yackulic et al., 2015). *P. rudis* et *P. nobilis* sont deux espèces très proches qui colonisent parfois le même type d'habitat. Cependant, *P. nobilis* est généralement plus abondante. La disparition des grandes nacres est donc susceptible de laisser une niche écologique vacante qui pourrait être occupé par *P. rudis*.

La disparition des grandes nacres est donc susceptible d'avoir un impact sur l'habitat et les espèces avec lesquelles elle interagit. Evaluer l'impact et les changements de

l'écosystèmes suite à la disparition des populations de grandes nacres permettrait de mieux comprendre le rôle de l'espèce dans l'habitat.

2. 3. Sauvegarde et restauration des populations de *Pinna nobilis*

A ce jour, presque la totalité des populations de grandes nacres situées en mer a été décimée par la pandémie causée par le parasite *H. pinnae*. La survie de l'espèce est donc particulièrement incertaine et des plans de sauvegarde ont été mis en place, incluant une perspective de réintroduction d'individus sains dans le milieu. Cependant, la réimplantation d'individus dans le milieu naturel ne peut être envisagée que s'il est dépourvu de parasite et de risque d'infection. Des expériences préliminaires ont montrées que, même s'il n'y a plus de population naturelle de grandes nacres dans le milieu, le parasite était toujours présent et actif si des individus sains sont transplantés. Ainsi, en 2019, 10 individus provenant de la lagune de Salses-Leucate ont été transférés dans des aquariums à l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer. Ces aquariums étaient alimentés avec de l'eau de mer non traitée pompée directement sur la côte et en 10 jours environ, les individus ont commencé à présenter des symptômes d'infestation par *H. pinnae*, suggérant la présence du parasite bien que la population de grandes nacres avait disparu à la fin de l'été 2018, soit un an en avant. Il est donc probable que le parasite soit encore présent sur la côte, même en l'absence de *P. nobilis*. Pour l'instant aucun signe de mortalité causée par *H. pinnae* n'a été observée chez d'autres mollusques en Méditerranée, pas même chez *Pinna rudis* qui est très proche de *P. nobilis* et qui peut parfois partager le même habitat. Cependant, certains parasites peuvent avoir plusieurs hôtes ou rester en dormance dans le sédiment. Par exemple, *Bonamia ostreae* (Pichot, 1980), parasite de la famille des Haplosporidiidae et responsable de mortalités massives chez les huîtres, peut rester dans le milieu des années après avoir décimé une population et engendrer de nouvelles mortalités si les huîtres sont réintroduites (Lynch et al., 2007). Une multitude d'espèces peut servir de réservoir au parasite de façon à ce que, finalement, il ne disparaisse jamais du milieu (Costello et al., 2021). Le parasite *H. pinnae* a été décrit récemment et reste très mal connu. Il est donc nécessaire d'acquérir un maximum de connaissance, notamment sur son cycle de vie et sur sa dynamique d'infestation. Déterminer si certaines espèces agissent de telle façon qu'elles maintiennent le parasite dans le milieu représente une première étape pour la mise en place des mesures de conservation et espérer restaurer les populations. Ainsi, un programme est actuellement en cours dont l'objectif est de rechercher le parasite, via une approche

génétique de type barcode ADN, chez d'autres espèces de bivalves présents le long du littoral Occitan et qui colonisent les mêmes habitats que *P. nobilis*, afin de déterminer s'il existe des espèces porteuses qui pourraient agir comme réservoir du parasite.

La quasi-totalité des grandes nacres ayant été décimées dans les habitats côtiers, la réintroduction d'individus sains apparait comme la solution adaptée pour restaurer les populations. Cependant, transplanter des individus sains depuis des zones non infectées, comme les lagunes par exemple, vers des zones où les populations ont été décimées peut s'avérer inefficace car ils risquent de mourir si *H. pinnae* est toujours présent. La reproduction et le croisement d'individus résistants pourrait représenter une solution pour repeupler les habitats côtiers et limiter le risque que les individus transplantés ne meurent à cause du parasite. La reproduction de bivalves en aquarium peut être un exercice compliqué car la phase larvaire pélagique et la métamorphose nécessaire à l'installation sont des étapes critiques de leur développement. Avant de maîtriser le cycle de vie des organismes, on ne dispose finalement que de peu d'informations sur la durée de la phase larvaire, sur le comportement des larves, sur leur alimentation ou sur les facteurs déclencheurs de la métamorphose pour le recrutement. Trigos et al. (2018) ont présenté les premiers essais de reproduction en captivité des grandes nacres et ont apporté de premiers résultats prometteurs qui permettront de maîtriser le cycle biologique de l'espèce. Plus d'efforts dans cette direction sont nécessaires afin de boucler le cycle de vie des grandes nacres et de pouvoir envisager la réintroduction d'individus dans le milieu.

Cependant les méthodes conventionnelles de conservation ne seront peut-être pas suffisantes pour sauver l'espèce de l'extinction. Poussées par les progrès technologiques dans le domaine de l'analyse moléculaire, de nouvelles approches se développent et révolutionnent les applications de la génétique pour la conservation. Ainsi, le séquençage et l'édition du génome, notamment grâce à la méthode CRISPR-Cas9², ont permis l'émergence de l'ingénierie génétique comme outils prometteur pour la conservation du vivant (Redford et al., 2019). Ces approches sont très controversées dans la communauté scientifique mais il est très probable qu'elles se développent dans les années à venir et l'IUCN est déjà en train de mettre en place des recommandations pour en définir les limites et les bonnes pratiques.

² Cette méthode peut être assimilée à des « ciseaux moléculaires » et permet d'éditer le génome en coupant précisément l'ADN au niveau d'une séquence ciblée afin de la modifier ou de la remplacer.

La production et l'utilisation d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) sont déjà acceptées dans certains cas, notamment dans l'agriculture pour créer des variétés de plantes résistantes aux ravageurs ou en médecine où certaines bactéries sont modifiées génétiquement pour produire des médicaments. Cependant, la réglementation actuelle impose que les OGM soient utilisés dans des espaces confinés et contrôlés (Redford et al., 2019). Dans le cas de l'utilisation d'OGM dans un cadre de conservation, l'idée est ensuite de réintroduire ces organismes dans l'environnement pour qu'ils se reproduisent et face partie inhérente des populations naturelles. Les conséquences négatives de ce type d'approche peuvent être multiples et incluent le transfert de gènes, l'hybridation avec des espèces sauvages, la pullulation des espèces modifiées, etc. (Tsatsakis et al., 2017). Il est donc indispensable de bien évaluer les risques avant d'envisager la réintroduction d'OGM dans le milieu naturel.

Il existe déjà quelques exemples où ces approches ont été utilisées pour restaurer des populations décimées par des pandémies causées par l'introduction accidentelle d'un microorganisme. La résistance à un pathogène dans la région d'origine est généralement le résultat de millions d'années d'exposition et de coévolution alors que dans la région d'introduction, l'hôte n'a jamais été exposé et cette résistance n'a pas été sélectionnée (Adams et al., 2002). L'idée est donc de donner un « coup de pouce » à l'espèce en lui transférant un ou plusieurs gènes provenant d'une autre espèce et impliqué dans la résistance au pathogène. Ce type d'approche a été développée chez le châtaigner d'Amérique, *Castanea dentata* ((Marshall) Borkh, 1800), dont les populations ont été décimées lors de l'introduction accidentelle d'un champignon pathogène *Cryphonectria parasitica* arrivé sur des châtaigniers asiatiques importés en 1904 (Anagnostakis, 1987). L'espèce est désormais considérée comme « en danger critique d'extinction » sur la liste rouge de l'IUCN et il est probable que, sans intervention humaine, elle finisse par s'éteindre. Plusieurs tentatives de croisements ont été réalisées entre le châtaignier d'Amérique et l'asiatique, résistant à la maladie, mais sans véritable succès (Woodcock et al., 2018). Finalement, la résistance des châtaigniers à la maladie a été augmentée en insérant un gène provenant du blé. Ce gène produit une enzyme, l'oxalate oxydase, qui ne tue pas le champignon mais décompose l'acide oxalique qu'il produit et qui est responsable de la destruction des tissus du châtaignier (Zhang et al., 2013). Ces arbres transgéniques n'ont pas encore été introduits dans le milieu naturel mais cette possibilité est en train d'être étudiée.

D'autres exemples existent chez les animaux comme avec le putois à pieds noirs, *Mustela nigripes* (Audubon and Bachman, 1851), qui, malgré plusieurs programmes de réintroduction reste menacé car ses populations sont décimées par la peste sylvatique, contrairement à son homologue domestique qui est peu affecté par la maladie. L'idée est donc d'éditer, dans le génome du putois à pieds noirs, l'allèle de résistance à la peste sylvatique provenant du furet domestique (Novak et al., 2018).



"We would like to be genetically modified to taste like Brussels sprouts."

Dans le contexte de la pandémie subie par *P. nobilis*, ce type d'approche pourrait être imaginé. En effet, la réintroduction de grandes naces dans les habitats côtiers ne pourra se faire que si le parasite ne se trouve plus dans le milieu et qu'il n'y a plus de risque d'infection pour l'espèce. Malheureusement, il est possible que cette situation n'arrive jamais à cause d'autres espèces qui pourrait agir comme des réservoirs du parasite. Bien que *P. nobilis* ait été décimée par le parasite, les populations de *P. rudis* ne semblent pas du tout affectées (Catanese et al., 2018) alors que les deux espèces sont très proches génétiquement et coexistent dans certains habitats. Des hybrides entre les deux espèces ont même été observés dans le milieu naturel (**Figure 18**) et semblent également résistants au parasite (Vázquez-Luis et al., 2021). L'hybridation entre les deux espèces comme possibilité de

conservation pour *P. nobilis* a été évoquée (Vázquez-Luis et al., 2021). Bien que les deux espèces partagent des distributions bathymétriques similaires et qu'elles colonisent parfois les mêmes habitats, ces hybrides sont très rares et seuls 3 individus ont été observés. Cette faible prévalence pourrait s'expliquer par un décalage entre les périodes de reproduction ou par une incompatibilité entre les deux espèces au moment de la fécondation. De plus, les individus issus de croisements hybrides ne sont pas forcément féconds et l'hybridation reste très aléatoire car il n'est pas possible de choisir les traits transmis. Ces individus hybrides offrent une opportunité de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance au parasite. Dans ce contexte, la possibilité d'isoler le ou les gènes impliqués dans la résistance au parasite chez *P. rudis* pour le transférer chez *P. nobilis* pourrait être une solution pour la conservation de l'espèce et éventuellement sa potentielle réintroduction dans le milieu.

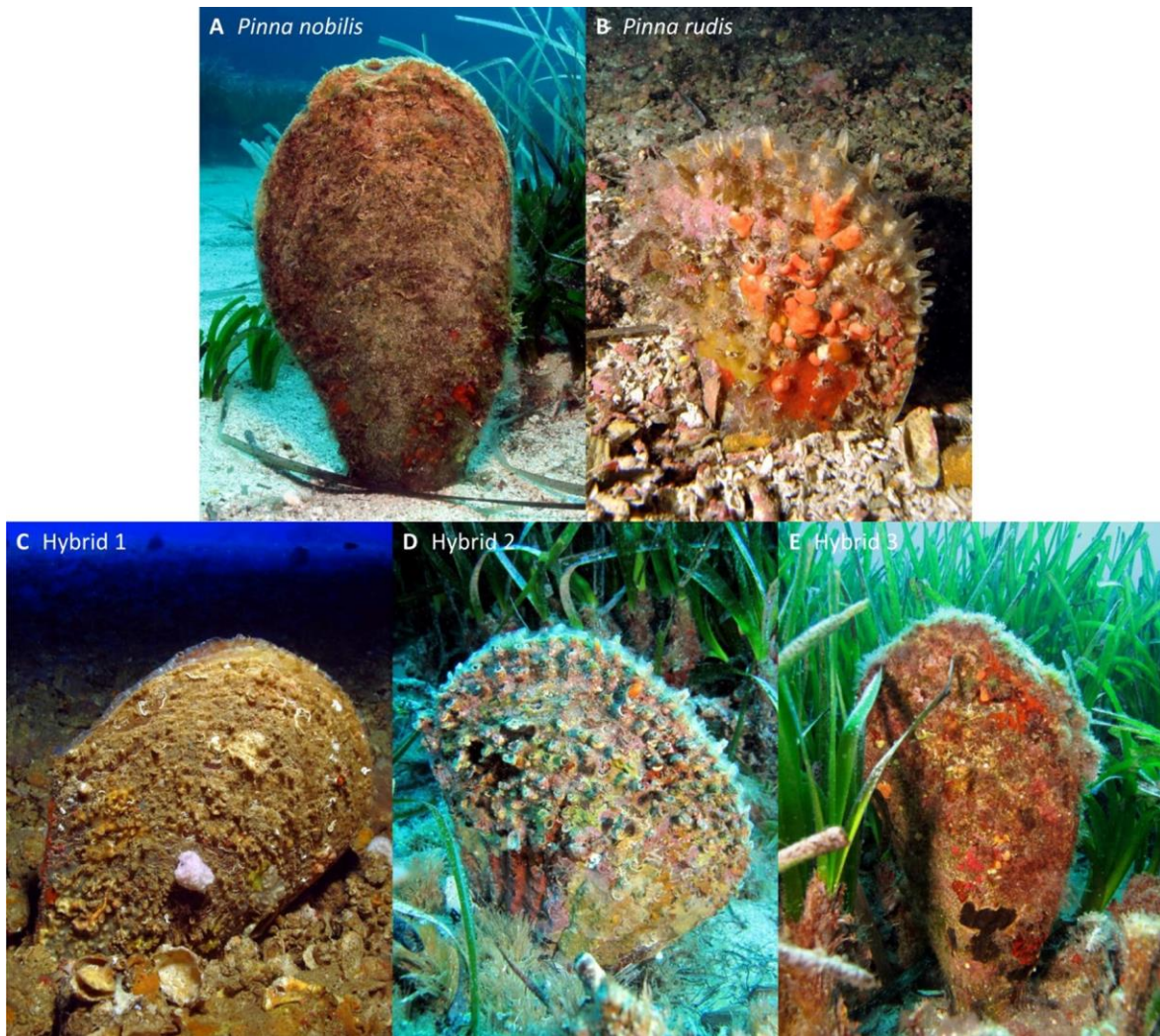


Figure 18: Photos de (A) *Pinna nobilis*, (B) *Pinna rudis* ainsi que des trois hybrides identifiés génétiquement (C, D et E). Vázquez-Luis et al. (2021)

3. Conclusion

La grande nacre de Méditerranée fait aujourd'hui face à une crise majeure qui menace sa survie. Ce travail de thèse apporte des connaissances à la fois sur la distribution spatiale de l'espèce, ses exigences écologiques et le fonctionnement de ses populations sur la côte Occitane qui seront utiles pour mettre en place des mesures de conservation adaptées. Malgré l'émergence d'initiatives de sauvegarde, au sein de plusieurs pays Méditerranéens, le futur de l'espèce reste très incertain et, si l'espèce persiste, cela prendra probablement des années avant que ses populations ne soient restaurées telles qu'elles étaient avant la pandémie. La grande nacre est une espèce emblématique et bien suivie par les scientifiques. La disparition de ses populations a donc été remarquée et a permis d'augmenter les efforts de conservation. Cependant cette situation critique doit permettre d'alerter sur la vulnérabilité des organismes marins et sur la difficulté de restaurer les populations, particulièrement dans le cas d'une pandémie. Combien d'espèces moins charismatiques ont été décimées sans être remarquées ? Les mortalités de masse et les épizooties sont des événements de plus en plus courants et qui semblent s'intensifier à cause du réchauffement climatique (Bally and Garrabou, 2007; Coma et al., 2009; Fey et al., 2015). Dans ce contexte, la biologie de la conservation s'apparente à une discipline thérapeutique, comme une sorte de médecine des populations avec toutes les étapes décisionnelles de la médecine : auscultation ou récupération des données, analyse, diagnostic, traitement et évaluation (Delord, 2010). Cependant, la prévention est généralement le meilleur des remèdes et il est indispensable d'intégrer ce paramètre à la gestion de l'environnement. Les écosystèmes marins subissent de plus en plus de dégradations dues aux activités anthropiques et la situation actuelle subit par la grande nacre de Méditerranée est un exemple parmi tant d'autres. Plusieurs études montrent qu'il est encore temps d'inverser la tendance et de restaurer les écosystèmes marins mais ce ne sera possible que si des mesures drastiques sont rapidement mises en place afin de réduire les pressions anthropiques (Darling et al., 2019; Duarte et al., 2020).

REFERENCES



© D. Floramonti

- Abdelkrim, J., Robertson, B.C., Stanton, J.-A.L., Gemmell, N.J., 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *Biotechniques* 46, 185–192. <https://doi.org/10.2144/000113084>
- Acarli, S., Acarli, D., Kale, S., 2020. Current Status of Critically Endangered Fan Mussel *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) Population in Çanakkale Strait, Turkey. *Mar. Sci. Technol. Bull.* 10, 62–70. <https://doi.org/10.33714/masteb.793885>
- Adams, J.M., Piovesan, G., Strauss, S., Brown, S., 2002. Pests and Diseases The Case for Genetic Engineering of Native and Landscape Trees against Introduced Pests and Diseases 16, 874–879.
- Addis, P., Secci, M., Brundu, G., Manunza, A., Corrias, S., Cau, A., 2009. Density, size structure, shell orientation and epibiotic colonization of the fan mussel *Pinna nobilis* L. 1758 (Mollusca: Bivalvia) in three contrasting habitats in an estuarine area of Sardinia (W Mediterranean). *Sci. Mar.* 73, 143–152. <https://doi.org/10.3989/scimar.2009.73n1143>
- Airamé, S., Dugan, J.E., Lafferty, K.D., Leslie, H., Deborah, A., Mcardle, D.A., Warner, R.R., 2003. Applying Ecological Criteria to Marine Reserve Design : A Case Study from the California Channel Islands. *Ecol. Appl.* 13, S170–S184.
- Airoldi, L., Beck, M., 2007. Loss, Status and Trends for Coastal Marine Habitats of Europe, in: *Oceanography and Marine Biology*. pp. 345–405. <https://doi.org/10.1201/9781420050943.ch7>
- Alagona, P.S., Sandlos, J., Wiersma, Y.F., 2012. Past imperfect: using historical ecology and baseline data for conservation and restoration projects in North America. *Environ. Philos.* 9, 49–70. <https://doi.org/10.5840/envirophil2012914>
- Almany, G.R., Berumen, M.L., Thorrold, S.R., Planes, S., Jones, G.P., 2007. Local Replenishment of Coral Reef Fish Populations in a Marine Reserve. *Science* (80-.). 316, 742–744. <https://doi.org/10.1126/science.1140597>
- Almany, G.R., Connolly, S.R., Heath, D.D., Hogan, J.D., Jones, G.P., McCook, L.J., Mills, M., Pressey, R.L., Williamson, D.H., 2009. Connectivity, biodiversity conservation and the design of marine reserve networks for coral reefs. *Coral Reefs* 28, 339–351. <https://doi.org/10.1007/s00338-009-0484-x>
- Alomar, C., Vázquez-Luis, M., Magraner, K., Lozano, L., Deudero, S., 2015. Evaluating stable isotopic signals in bivalve *Pinna nobilis* under different human pressures. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 467, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.03.006>
- Altermatt, F., Ebert, D., 2008. Genetic diversity of *Daphnia magna* populations enhances resistance to parasites. *Ecol. Lett.* 11, 918–928. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01203.x>
- Álvarez-Rogel, J., Barberá, G.G., Maxwell, B., Guerrero-Brotóns, M., Díaz-García, C., Martínez-

- Sánchez, J.J., Sallent, A., Martínez-Ródenas, J., González-Alcaraz, M.N., Jiménez-Cárceles, F.J., Tercero, C., Gómez, R., 2020. The case of Mar Menor eutrophication: State of the art and description of tested Nature-Based Solutions. *Ecol. Eng.* 158, 106086. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.106086>
- Anagnostakis, S.L., 1987. Chestnut Blight: The Classical Problem of an Introduced Pathogen. *Mycologia* 79, 23–37. <https://doi.org/10.1080/00275514.1987.12025367>
- André, C., Lindegarth, M., 1995. Fertilization efficiency and gamete viability of a sessile, free-spawning bivalve, *Cerastoderma edule*. *Ophelia* 43, 215–227. <https://doi.org/10.1080/00785326.1995.10429833>
- Ardren, W.R., DeHaan, P.W., Smith, C.T., Taylor, E.B., Leary, R., Kozfkay, C.C., Godfrey, L., Diggs, M., Fredenberg, W., Chan, J., Kilpatrick, C.W., Small, M.P., Hawkins, D.K., 2011. Genetic Structure, Evolutionary History, and Conservation Units of Bull Trout in the Coterminous United States. *Trans. Am. Fish. Soc.* 140, 506–525. <https://doi.org/10.1080/00028487.2011.567875>
- Armsworth, P.R., 2002. Recruitment Limitation, Population Regulation, and Larval Connectivity in Reef Fish Metapopulations. *Ecology* 83, 1092. <https://doi.org/10.2307/3071916>
- Arzul, I., Carnegie, R.B., 2015. New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.014>
- Baer, C.F., Miyamoto, M.M., Denver, D.R., 2007. Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* 8, 619–631. <https://doi.org/10.1038/nrg2158>
- Baillie, J.E., Hilton-Taylor, C., Stuart, S.N., 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Balbar, A.C., Metaxas, A., 2019. The current application of ecological connectivity in the design of marine protected areas. *Glob. Ecol. Conserv.* 17, e00569. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00569>
- Bally, M., Garrabou, J., 2007. Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. *Glob. Chang. Biol.* 13, 2078–2088. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01423.x>
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G.M., Bered, F., Fay, M.F., Lexer, C., 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol.* 16, 3759–3767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x>
- Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G.O.U., Swartz, B., Quental, T.B., Marshall, C., McGuire, J.L., Lindsey, E.L., Maguire, K.C., Mersey, B., Ferrer, E.A., 2011. Has the Earth's

sixth mass extinction already arrived? Nature 471, 51–57.
<https://doi.org/10.1038/nature09678>

- Basso, L., Hendriks, I., Steckbauer, A., Duarte, C., 2015a. Resistance of juveniles of the Mediterranean pen shell, (*Pinna nobilis*) to hypoxia and interaction with warming. Estuar. Coast. Shelf Sci. 165, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.05.016>
- Basso, L., Vázquez-Luis, M., García-March, J.R., Deudero, S., Alvarez, E., Vicente, N., Duarte, C.M., Hendriks, I.E., 2015b. The Pen Shell, *Pinna nobilis*: A Review of Population Status and Recommended Research Priorities in the Mediterranean Sea, in: Advances in Marine Biology. pp. 109–160. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2015.06.002>
- Bec, B., Collos, Y., Souchu, P., Vaquer, A., Lautier, J., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Laugier, T., 2011. Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. Aquat. Microb. Ecol. 63, 29–45. <https://doi.org/10.3354/ame01480>
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, Population genetics software for Windows TM. Univ. Montpellier II.
- Bell, J.J., Smith, D., Hannan, D., Haris, A., Jompa, J., Thomas, L., 2014. Resilience to Disturbance Despite Limited Dispersal and Self-Recruitment in Tropical Barrel Sponges: Implications for Conservation and Management. PLoS One 9, e91635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091635>
- Bernard, G., Boudouresque, C.F., Picon, P., 2007. Long term changes in *Zostera meadows* in the Berre lagoon (Provence, Mediterranean Sea). Estuar. Coast. Shelf Sci. 73, 617–629. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.03.003>
- Berumen, M.L., Almany, G.R., Planes, S., Jones, G.P., Saenz-Agudelo, P., Thorrold, S.R., 2012. Persistence of self-recruitment and patterns of larval connectivity in a marine protected area network. Ecol. Evol. 2, 444–452. <https://doi.org/10.1002/ece3.208>
- Beukema, J., Dekker, R., Essink, K., Michaelis, H., 2001. Synchronized reproductive success in the main bivalve species in the Wadden Sea: causes and consequences. Mar. Ecol. Prog. Ser. 211, 143–155. <https://doi.org/10.3354/meps211143>
- Bishop, J.D., Pemberton, A.J., 1997. Sessile animals: attached, but promiscuous? Trends Ecol. Evol. 12, 403. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)87390-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)87390-9)
- Boissin, E., Hoareau, T.B., Berrebi, P., 2011. Effects of current and historic habitat fragmentation on the genetic structure of the sand goby *Pomatoschistus minutus* (Osteichthys, Gobiidae). Biol. J. Linn. Soc. 102, 175–198. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01565.x>
- Borsa, P., Jarne, P., Belkhir, K., Bonhomme, F., 1994. Genetic structure of the palourde 103. Genet. Evol. Aquat. Org. 103.

- Bull, J.W., Gordon, A., Law, E.A., Suttle, K.B., Milner-gulland, E.J., 2014. Importance of Baseline Specification in Evaluating Conservation Interventions and Achieving No Net Loss of Biodiversity. *Conserv. Biol.* 28, 799–809. <https://doi.org/10.1111/cobi.12243>
- Butler, A., Vicente, N., de Gaulejac, B., 1993. Ecology of the pteriod bivalves *Pinna bicolor* Gmelin and *Pinna nobilis* L. *Mar. Life*.
- Cabanellas-Reboredo, M., Deudero, S., Alós, J., Valencia, J.M., March, D., Hendriks, I.E., Álvarez, E., 2009. Recruitment of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) on artificial structures. *Mar. Biodivers. Rec.* 2, e126. <https://doi.org/10.1017/S1755267209001274>
- Cabanellas-Reboredo, M., Vázquez-Luis, M., Mourre, B., Álvarez, E., Deudero, S., Amores, Á., Addis, P., Ballesteros, E., Barrajon, A., Coppa, S., García-March, J.R., Giacobbe, S., Casalduero, F.G., Hadjioannou, L., Jiménez-Gutiérrez, S. V., Katsanevakis, S., Kersting, D., Mačić, V., Mavrič, B., Patti, F.P., Planes, S., Prado, P., Sánchez, J., Tena-Medialdea, J., de Vaugelas, J., Vicente, N., Belkhamssa, F.Z., Zupan, I., Hendriks, I.E., 2019. Tracking a mass mortality outbreak of pen shell *Pinna nobilis* populations: A collaborative effort of scientists and citizens. *Sci. Rep.* 9, 13355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49808-4>
- Cafaro, P., 2015. Three ways to think about the sixth mass extinction. *Biol. Conserv.* 192, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.10.017>
- Cappello, T., Maisano, M., Giannetto, A., Natalotto, A., Parrino, V., Mauceri, A., Spanò, N., 2019. Pen shell *Pinna nobilis* L. (Mollusca: Bivalvia) from different peculiar environments: adaptive mechanisms of osmoregulation and neurotransmission. *Eur. Zool. J.* 86, 333–342. <https://doi.org/10.1080/24750263.2019.1673492>
- Cárdenas, L., Castilla, J.C., Viard, F., 2016. Hierarchical analysis of the population genetic structure in *Concholepas concholepas*, a marine mollusk with a long-lived dispersive larva. *Mar. Ecol.* 37, 359–369. <https://doi.org/10.1111/maec.12286>
- Carella, F., Aceto, S., Pollaro, F., Miccio, A., Iaria, C., Carrasco, N., Prado, P., De Vico, G., 2019. A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. *Sci. Rep.* 9, 2725. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37217-y>
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.H., 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecol. Appl.* 8, 559–568. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1998\)008\[0559:NPOSWW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1998)008[0559:NPOSWW]2.0.CO;2)
- Carreras-Carbonell, J., Macpherson, E., Pascual, M., 2007. High self-recruitment levels in a Mediterranean littoral fish population revealed by microsatellite markers. *Mar. Biol.* 151, 719–727. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0513-z>
- Cassista, M.C., Hart, M.W., 2007. Spatial and temporal genetic homogeneity in the Arctic

- surfclam (*Mactromeris polynyma*). Mar. Biol. 152, 569–579. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0711-3>
- Catanese, G., Grau, A., Valencia, J.M., Garcia-March, J.R., Vázquez-Luis, M., Alvarez, E., Deudero, S., Darriba, S., Carballal, M.J., Villalba, A., 2018. *Haplosporidium pinnae* sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, *Pinna nobilis*, in the Western Mediterranean Sea. J. Invertebr. Pathol. 157, 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.006>
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M., 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. Sci. Adv. 1, e1400253. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253>
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Dirzo, R., 2017. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. Proc. Natl. Acad. Sci. 114, E6089–E6096. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704949114>
- Chacón, G.M., Arias-Pérez, A., Freire, R., Martínez, L., Ojea, J., Insua, A., 2021. Genetic characterization of wild, broodstock and seed samples of *Polititapes rhomboides* (Bivalvia: Veneridae): Implications for hatchery seed production. Aquac. Reports 20. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100658>
- Charlesworth, B., 2009. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation 10. <https://doi.org/10.1038/nrg2526>
- Charlesworth, D., Willis, J.H., 2009. The genetics of inbreeding depression. Nat. Rev. Genet. 10, 783–796. <https://doi.org/10.1038/nrg2664>
- Christie, M.R., Tissot, B.N., Albins, M.A., Beets, J.P., Jia, Y., Ortiz, D.M., Thompson, S.E., Hixon, M.A., 2010. Larval Connectivity in an Effective Network of Marine Protected Areas. PLoS One 5, e15715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015715>
- Çinar, M.E., Bilecenoğlu, M., Yokeş, M.B., Güçlüsoy, H., 2021. *Pinna nobilis* in the south Marmara Islands (Sea of Marmara); it still remains uninfected by the epidemic and acts as egg laying substratum for an alien invader 161–168. <https://doi.org/10.12681/mms.25289>
- Čižmek, H., Čolić, B., Gračan, R., Grau, A., Catanese, G., 2020. An emergency situation for pen shells in the Mediterranean: The Adriatic Sea, one of the last *Pinna nobilis* shelters, is now affected by a mass mortality event. J. Invertebr. Pathol. 173, 107388. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107388>
- Clark, T.W., Brunner, R.D., 2002. Making partnerships work in endangered species conservation: an introduction to the decision process. Endanger. Species Updat. 19, 74–80.
- Cloern, J., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. Mar.

- Ecol. Prog. Ser. 210, 223–253. <https://doi.org/10.3354/meps210223>
- Coma, R., Ribes, M., Serrano, E., Jimenez, E., Salat, J., Pascual, J., 2009. Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 6176–6181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805801106>
- Connell, J.H., 1985. The consequences of variation in initial settlement vs. post-settlement mortality in rocky intertidal communities. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 93, 11–45. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(85\)90146-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(85)90146-7)
- Costantini, F., Rugiu, L., Cerrano, C., Abbiati, M., 2018. Living upside down : patterns of red coral settlement in a cave 1–23. <https://doi.org/10.7717/peerj.4649>
- Costanzo, A.G., Calafiore, N., Crescenti, N., 1996. Mediterranean species of the Genus *Pontonia* Latreille , 1829. II. Developmental stages of *Pontonia flavomaculata* Heller, 1864 (Decapoda, Natantia, Pontoniinae) reared in the laboratory 69, 773–781.
- Costanzo, G., Giacobbe, S., Calafiore, N., 1991. Mediterranean species of the genus *Pontonia* Latreille, 1829. I. Developmental stages of *Pontonia pinnophylax* (Otto, 1821) (Decapoda, Natantia, Pontoniinae) Reared in the laboratory. Crustaceana 60, 52–75. <https://doi.org/10.1163/156854091X00263>
- Costello, K.E., Lynch, S.A., McAllen, R., O’Riordan, R.M., Culloty, S.C., 2021. The role of invasive tunicates as reservoirs of molluscan pathogens. Biol. Invasions 23, 641–655. <https://doi.org/10.1007/s10530-020-02392-5>
- Cowen, R.K., 2006. Scaling of Connectivity in Marine Populations. Science (80-.). 311, 522–527. <https://doi.org/10.1126/science.1122039>
- Cowen, R.K., Sponaugle, S., 2009. Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. Ann. Rev. Mar. Sci. 1, 443–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163757>
- Crimaldi, J.P., 2012. The role of structured stirring and mixing on gamete dispersal and aggregation in broadcast spawning. J. Exp. Biol. 215, 1031–1039. <https://doi.org/10.1242/jeb.060145>
- Crooks, K.R., Sanjayan, M., 2010. Connectivity conservation: maintaining connections for nature, in: Crooks, K.R., Sanjayan, M. (Eds.), Connectivity Conservation. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–20. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511754821.001>
- D’Aloia, C.C., Bogdanowicz, S.M., Majoris, J.E., Harrison, R.G., Buston, P.M., 2013. Self-recruitment in a Caribbean reef fish: a method for approximating dispersal kernels accounting for seascape. Mol. Ecol. 22, 2563–2572. <https://doi.org/10.1111/mec.12274>
- Dakin, E.E., Avise, J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity (Edinb).

93, 504–509. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>

- Dallas, J.F., 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mamm. Genome* 3, 452–456. <https://doi.org/10.1007/BF00356155>
- Darling, E.S., McClanahan, T.R., Maina, J., Gurney, G.G., Graham, N.A.J., Januchowski-Hartley, F., Cinner, J.E., Mora, C., Hicks, C.C., Maire, E., Puotinen, M., Skirving, W.J., Adjeroud, M., Ahmadi, G., Arthur, R., Bauman, A.G., Beger, M., Berumen, M.L., Bigot, L., Bouwmeester, J., Brenier, A., Bridge, T.C.L., Brown, E., Campbell, S.J., Cannon, S., Cauvin, B., Chen, C.A., Claudet, J., Denis, V., Donner, S., Estradivari, Fadli, N., Feary, D.A., Fenner, D., Fox, H., Franklin, E.C., Friedlander, A., Gilmour, J., Goiran, C., Guest, J., Hobbs, J.-P.A., Hoey, A.S., Houk, P., Johnson, S., Jupiter, S.D., Kayal, M., Kuo, C., Lamb, J., Lee, M.A.C., Low, J., Muthiga, N., Muttaqin, E., Nand, Y., Nash, K.L., Nedlic, O., Pandolfi, J.M., Pardede, S., Patankar, V., Penin, L., Ribas-Deulofeu, L., Richards, Z., Roberts, T.E., Rodgers, K.S., Safuan, C.D.M., Sala, E., Shedrawi, G., Sin, T.M., Smallhorn-West, P., Smith, J.E., Sommer, B., Steinberg, P.D., Sutthacheep, M., Tan, C.H.J., Williams, G.J., Wilson, S., Yeemin, T., Bruno, J.F., Fortin, M.-J., Krkosek, M., Mouillot, D., 2019. Social–environmental drivers inform strategic management of coral reefs in the Anthropocene. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 1341–1350. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0953-8>
- Davenport, J., Ezgeta-Balić, D., Peharda, M., Skejić, S., Ninčević-Gladan, Ž., Matijević, S., 2011. Size-differential feeding in *Pinna nobilis* L. (Mollusca: Bivalvia): Exploitation of detritus, phytoplankton and zooplankton. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 92, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.12.033>
- DAVID, P., PUJOL, B., VIARD, F., CASTELLA, V., GOUDET, J., 2007. Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Mol. Ecol.* 16, 2474–2487. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03330.x>
- De Gaulejac, B., 1995. Mise en évidence de l’hermaphrodisme successif à maturation asynchrone de *Pinna nobilis*. *Biol. Pathol. Anim.* 99–103.
- De Gaulejac, B., 1993. Etude écophysiologique du mollusque bivalve méditerranéen *Pinna nobilis* L. reproduction; croissance; respiration.
- De Gaulejac, B., Henry, M., Vicente, N., 1995. An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) II. Spermatogenesis. *J. Molluscan Stud.* 61, 393–403. <https://doi.org/10.1093/mollus/61.3.393>
- Delord, J., 2010. L’extinction d’espèce. Publications scientifiques du Muséum. <https://doi.org/10.4000/books.mnhn.2482>
- Desalle, R., Amato, G., 2017. Conservation Genetics, Precision Conservation, and De-extinction. *Hastings Cent. Rep.* 47, S18–S23. <https://doi.org/10.1002/hast.747>
- Desalle, R., Amato, G., 2004. The expansion of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.* 5,

702–712. <https://doi.org/10.1038/nrg1425>

- Deudero, S., Grau, A., Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Alomar, C., Hendriks, I.E., 2017. Reproductive investment of the pen shell *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 in Cabrera National Park (Spain). *Mediterr. Mar. Sci.* 18, 271. <https://doi.org/10.12681/mms.1645>
- Díaz-Viloria, N., Prío, S.A.G.G.-D., Cruz, P., Perez-Enriquez, R., 2013. Assessment of Self-Recruitment in a Pink Abalone (*Haliotis corrugata*) Aggregation by Parentage Analyses. *J. Shellfish Res.* 32, 105–113. <https://doi.org/10.2983/035.032.0116>
- Dirzo, R., Raven, P.H., 2003. Global State of Biodiversity and Loss. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 28, 137–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.28.050302.105532>
- Dong, Y.H., Yao, H.H., Sun, C.S., Lv, D.M., Li, M.Q., Lin, Z.H., 2016. Development of polymorphic SSR markers in the razor clam (*Sinonovacula constricta*) and cross-species amplification. *Genet. Mol. Res.* 15, 1–7. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017285>
- Duarte, C.M., Agusti, S., Barbier, E., Britten, G.L., Castilla, J.C., Gattuso, J.-P., Fulweiler, R.W., Hughes, T.P., Knowlton, N., Lovelock, C.E., Lotze, H.K., Predragovic, M., Poloczanska, E., Roberts, C., Worm, B., 2020. Rebuilding marine life. *Nature* 580, 39–51. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2146-7>
- Duarte, C.M., Benavent, E., Sánchez, M.D.C., 1999. The microcosm of particles within seagrass *Posidonia oceanica* canopies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 181, 289–295. <https://doi.org/10.3354/meps181289>
- Dubé, C.E., Boissin, E., Mercière, A., Planes, S., 2020. Parentage analyses identify local dispersal events and sibling aggregations in a natural population of *Millepora* hydrocorals, a free-spawning marine invertebrate. *Mol. Ecol.* 29, 1508–1522. <https://doi.org/10.1111/mec.15418>
- Dubé, C.E., Planes, S., Zhou, Y., Berteaux-Lecellier, V., Boissin, E., 2017. Genetic diversity and differentiation in reef-building *Millepora* species, as revealed by cross-species amplification of fifteen novel microsatellite loci. *PeerJ* 5, e2936. <https://doi.org/10.7717/peerj.2936>
- Dupont, L., Ellien, C., Viard, F., 2007. Limits to gene flow in the slipper limpet *Crepidula fornicata* as revealed by microsatellite data and a larval dispersal model. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 349, 125–138. <https://doi.org/10.3354/meps07098>
- Earl, D.A., VonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Eckert, G.L., 2003. Effects of the planktonic period on marine population fluctuations. *Ecology* 84, 372–383. [https://doi.org/https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[0372:EOTPPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[0372:EOTPPO]2.0.CO;2)

- Ehlers, A., Worm, B., Reusch, T., 2008. Importance of genetic diversity in eelgrass *Zostera marina* for its resilience to global warming. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 355, 1–7. <https://doi.org/10.3354/meps07369>
- Ellegren, H., Ellegren, N., 2016. Determinants of genetic diversity. *Nat. Publ. Gr.* 17, 422–433. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.58>
- Ellien, C., Thiébaud, E., Dumas, F., Salomon, J.-C., Nival, P., 2004. A modelling study of the respective role of hydrodynamic processes and larval mortality on larval dispersal and recruitment of benthic invertebrates: example of *Pectinaria koreni* (Annelida: Polychaeta) in the Bay of Seine (English Channel). *J. Plankton Res.* 26, 117–132. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh018>
- Eldson, T.S., Wells, B.K., Campana, S.E., Gillanders, B.M., Jones, C.M., Limburg, K.E., Secor, D.H., Thorrold, S.R., Walther, B.D., 2008. Otolith chemistry to describe movements and life-history parameters of fishes: Hypotheses, assumptions, limitations and inferences. *Oceanogr. Mar. Biol.* 46, 297–330.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fernández-Pérez, J., Nantón, A., Arias-Pérez, A., Insua, A., Méndez, J., 2019. Fifteen novel microsatellite loci, developed using next-generation sequencing, reveal the lack of genetic structure in *Donax vittatus* from Iberian Peninsula. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 217, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.11.011>
- Fey, S.B., Siepielski, A.M., Nusslé, S., Cervantes-Yoshida, K., Hwan, J.L., Huber, E.R., Fey, M.J., Catenazzi, A., Carlson, S.M., 2015. Recent shifts in the occurrence, cause, and magnitude of animal mass mortality events. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 1083–1088. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414894112>
- Fleury, P., Bakalowicz, M., de Marsily, G., 2007. Submarine springs and coastal karst aquifers: A review. *J. Hydrol.* 339, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.03.009>
- Fox, C.W., Rauter, C.M., 2003. Bet-hedging and the evolution of multiple mating. *Evol. Ecol. Res.* 5, 273–286.
- Frankham, R., 2003. Genetics and conservation biology. *C. R. Biol.* 326, 22–29. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00023-4](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00023-4)
- Frankham, R., 1999. Quantitative genetics in conservation biology. *Genet. Res.* 74, 237–244. <https://doi.org/10.1017/S001667239900405X>

- Frankham, R., Ralls, K., 1998. Inbreeding leads to extinction. *Nature* 392, 441–442. <https://doi.org/10.1038/33022>
- Ganz, H.H., Burton, R.S., 1995. Genetic differentiation and reproductive incompatibility among Baja California populations of the copepod *Tigriopus californicus*. *Mar. Biol.* 123, 821–827. <https://doi.org/10.1007/BF00349126>
- García-Ayllon, S., 2018. The Integrated Territorial Investment (ITI) of the Mar Menor as a model for the future in the comprehensive management of enclosed coastal seas. *Ocean Coast. Manag.* 166, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2018.05.004>
- García-March, J.R., García-Carrascosa, A.M., Pena, Á.L., 2002. In situ measurement of *Pinna nobilis* shells for age and growth studies: A new device. *Mar. Ecol.* 23, 207–217. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0485.2002.02781.x>
- García-March, J.R., García-Carrascosa, A.M., Peña Cantero, A.L., Wang, Y.-G., 2007. Population structure, mortality and growth of *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 (Mollusca, Bivalvia) at different depths in Moraira bay (Alicante, Western Mediterranean). *Mar. Biol.* 150, 861–871. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0386-1>
- García-March, J.R., Hernandis, S., Vázquez-Luis, M., Prado, P., Deudero, S., Vicente, N., Tena-Medialdea, J., 2020a. Age and growth of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in the western Mediterranean Sea. *Mar. Environ. Res.* 153, 104795. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104795>
- García-March, J.R., Jiménez, S., Sanchis, M.A., Monleon, S., Lees, J., Surge, D., Tena-Medialdea, J., 2016. In situ biomonitoring shows seasonal patterns and environmentally mediated gaping activity in the bivalve, *Pinna nobilis*. *Mar. Biol.* 163, 29. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2812-3>
- García-March, J.R., Marquez-Aliaga, A., Wang, Y., Surge, D., Kersting, D.K., 2011. Study of *Pinna nobilis* growth from inner record: How biased are posterior adductor muscle scars estimates? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 407, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.07.016>
- García-March, J.R., Tena, J., Henandis, S., Vázquez-Luis, M., López, D., Téllez, C., Prado, P., Navas, J.I., Bernal, J., Catanese, G., Grau, A., López-Sanmartín, M., Nebot-Colomer, E., Ortega, A., Planes, S., Kersting, D., Jimenez, S., Hendriks, I., Moreno, D., Giménez-Casalduero, F., Pérez, M., Izquierdo, A., Sánchez, J., Vicente, N., Sanmarti, N., Guimerans, M., Crespo, J.L., Valencia, J.M., Torres, J., Barrajon, A., Álvarez, E., Peyran, C., Morage, T., Deudero, S., 2020b. Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction? *Biol. Conserv.* 243, 108498. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108498>
- García-March, Pérez-Rojas, L., García-Carrascosa, A.M., 2007. Influence of hydrodynamic forces on population structure of *Pinna nobilis* L., 1758 (Mollusca: Bivalvia): The critical

- combination of drag force, water depth, shell size and orientation. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 342, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.09.007>
- Gary, S.F., Fox, A.D., Biastoch, A., Roberts, J.M., Cunningham, S.A., 2020. Larval behaviour, dispersal and population connectivity in the deep sea. *Sci. Rep.* 10, 10675. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67503-7>
- Gasca-pineda, J., Cassaigne, I., Alonso, R.A., Eguiarte, L.E., 2013. Effective Population Size , Genetic Variation , and Their Relevance for Conservation : The Bighorn Sheep in Tiburon Island and Comparisons with Managed Artiodactyls 8, 20–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078120>
- Giacobbe, S., 2002. Epibiontic mollusc communities on *Pinna nobilis* L. (Bivalvia, Mollusca). *J. Nat. Hist.* 36, 1385–1396. <https://doi.org/10.1080/00222930110056892>
- Giantsis, I.A., Mucci, N., Randi, E., Abatzopoulos, T.J., Apostolidis, A.P., 2014. Microsatellite variation of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in central and eastern Mediterranean: genetic panmixia in the Aegean and the Ionian Seas. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 94, 797–809. <https://doi.org/10.1017/S0025315414000174>
- González-Wangüemert, M., Basso, L., Balau, A., Costa, J., Renault, L., Serrão, E.A., Duarte, C.M., Hendriks, I.E., 2019. Gene pool and connectivity patterns of *Pinna nobilis* in the Balearic Islands (Spain, Western Mediterranean Sea): Implications for its conservation through restocking. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 29, 175–188. <https://doi.org/10.1002/aqc.2976>
- González-Wangüemert, M., Costa, J., Basso, L., Duarte, C., Serrão, E., Hendriks, I., 2014. Highly polymorphic microsatellite markers for the Mediterranean endemic fan mussel *Pinna nobilis*. *Mediterr. Mar. Sci.* 16, 31. <https://doi.org/10.12681/mms.949>
- Gonzalez, A., 1998. Metapopulation Dynamics, Abundance, and Distribution in a Microecosystem. *Science* (80-.). 281, 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.2045>
- Graham, E.M., Baird, A.H., Connolly, S.R., 2008. Survival dynamics of scleractinian coral larvae and implications for dispersal. *Coral Reefs* 27, 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00338-008-0361-z>
- Grau, A., Villalba, A., Navas, J.I., Hansjosten, B., Valencia, J.M., García-March, J.R., Prado, P., Follana, G., Morage, T., Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Katharios, P., Pavloudi, C., Nebot-Colomer, E., Tena-Medialdea, J., Lopez-Sanmartín, M., Peyran, C., Čížmek, H., Sarafidou, G., Issaris, Y., Tüney, I., Deudero, S., Planes, S., Catanese, G., 2021. Wide-geographic and long-term analysis of the role of pathogens in the decline of *Pinna nobilis* to critically endangered species. prep.
- Grorud-Colvert, K., Claudet, J., Tissot, B.N., Caselle, J.E., Carr, M.H., Day, J.C., Friedlander,

- A.M., Lester, S.E., de Loma, T.L., Malone, D., Walsh, W.J., 2014. Marine Protected Area Networks: Assessing Whether the Whole Is Greater than the Sum of Its Parts. *PLoS One* 9, e102298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102298>
- Gunderson, L.H., 2000. Ecological Resilience—In Theory and Application. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31, 425–439. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.425>
- Hanski, I., 1998. Metapopulation dynamics. *Nature* 396, 41–49. <https://doi.org/10.1038/23876>
- Hare, M.P., Karl, S.A., Avise, J.C., 1996. Anonymous nuclear DNA markers in the American oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. *Mol. Biol. Evol.* 13, 334–345. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025593>
- Harrison, S., 1991. Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biol. J. Linn. Soc.* 42, 73–88. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1991.tb00552.x>
- Hartfield, M., Bataillon, T., Glémin, S., 2017. The evolutionary interplay between adaptation and self-fertilization. *Trends Genet.* 33, 420–431. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.04.002>
- Haskin, H.H., Ford, S.E., 1982. *Haplosporidium nelsoni* (MSX) on delaware bay seed oyster beds: A host-parasite relationship along a salinity gradient. *J. Invertebr. Pathol.* 40, 388–405. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90178-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90178-1)
- Hastings, A., Botsford, L.W., 2006. Persistence of spatial populations depends on returning home. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6067–6072. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506651103>
- Hedgecock, D., Launey, S., Pudovkin, A.I., Naciri, Y., Lapègue, S., Bonhomme, F., 2007. Small effective number of parents (N_b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* 150, 1173–1182. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0441-y>
- Hedgecock, D., Pudovkin, A.I., 2011. Sweepstakes Reproductive Success in Highly Fecund Marine Fish and Shellfish: A Review and Commentary. *Bull. Mar. Sci.* 87s, 971–1002. <https://doi.org/10.5343/bms.2010.1051>
- Hedrick, P.W., Kalinowski, S.T., 2000. Inbreeding Depression in Conservation Biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31, 139–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.139>
- Hendriks, I., Sintes, T., Bouma, T., Duarte, C., 2008. Experimental assessment and modeling evaluation of the effects of the seagrass *Posidonia oceanica* on flow and particle trapping. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 356, 163–173. <https://doi.org/10.3354/meps07316>
- Hendriks, I.E., Cabanellas-Reboredo, M., Bouma, T.J., Deudero, S., Duarte, C.M., 2011.

Seagrass Meadows Modify Drag Forces on the Shell of the Fan Mussel *Pinna nobilis*. *Estuaries and Coasts* 34, 60–67. <https://doi.org/10.1007/s12237-010-9309-y>

Hendriks, I.E., Deudero, S., Tavecchia, G., 2012. Recapture probability underwater: predicting the detection of the threatened noble pen shell in seagrass meadows. *Limnol. Oceanogr. Methods* 10, 824–831. <https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.824>

Hoarau, G., Rijnsdorp, A.D., Van Der Veer, H.W., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2002. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. *Mol. Ecol.* 11, 1165–1176. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01515.x>

Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T.M., Butchart, S.H.M., Carpenter, K.E., Chanson, J., Collen, B., Cox, N.A., Darwall, W.R.T., Dulvy, N.K., Harrison, L.R., Katariya, V., Pollock, C.M., Quader, S., Richman, N.I., Rodrigues, A.S.L., Tognelli, M.F., Vié, J.-C., Aguiar, J.M., Allen, D.J., Allen, G.R., Amori, G., Ananjeva, N.B., Andreone, F., Andrew, P., Ortiz, A.L.A., Baillie, J.E.M., Baldi, R., Bell, B.D., Biju, S.D., Bird, J.P., Black-Decima, P., Blanc, J.J., Bolaños, F., Bolivar-G., W., Burfield, I.J., Burton, J.A., Capper, D.R., Castro, F., Catullo, G., Cavanagh, R.D., Channing, A., Chao, N.L., Chenery, A.M., Chiozza, F., Clausnitzer, V., Collar, N.J., Collett, L.C., Collette, B.B., Fernandez, C.F.C., Craig, M.T., Crosby, M.J., Cumberlidge, N., Cuttelod, A., Derocher, A.E., Diesmos, A.C., Donaldson, J.S., Duckworth, J.W., Dutson, G., Dutta, S.K., Emslie, R.H., Farjon, A., Fowler, S., Freyhof, J., Garshelis, D.L., Gerlach, J., Gower, D.J., Grant, T.D., Hammerson, G.A., Harris, R.B., Heaney, L.R., Hedges, S.B., Hero, J.-M., Hughes, B., Hussain, S.A., Icochea M., J., Inger, R.F., Ishii, N., Iskandar, D.T., Jenkins, R.K.B., Kaneko, Y., Kottelat, M., Kovacs, K.M., Kuzmin, S.L., La Marca, E., Lamoreux, J.F., Lau, M.W.N., Lavilla, E.O., Leus, K., Lewison, R.L., Lichtenstein, G., Livingstone, S.R., Lukoschek, V., Mallon, D.P., McGowan, P.J.K., Mclvor, A., Moehlman, P.D., Molur, S., Alonso, A.M., Musick, J.A., Nowell, K., Nussbaum, R.A., Olech, W., Orlov, N.L., Papenfuss, T.J., Parra-Olea, G., Perrin, W.F., Polidoro, B.A., Pourkazemi, M., Racey, P.A., Ragle, J.S., Ram, M., Rathbun, G., Reynolds, R.P., Rhodin, A.G.J., Richards, S.J., Rodríguez, L.O., Ron, S.R., Rondinini, C., Rylands, A.B., Sadovy de Mitcheson, Y., Sanciangco, J.C., Sanders, K.L., Santos-Barrera, G., Schipper, J., Self-Sullivan, C., Shi, Y., Shoemaker, A., Short, F.T., Sillero-Zubiri, C., Silvano, D.L., Smith, K.G., Smith, A.T., Snoeks, J., Stattersfield, A.J., Symes, A.J., Taber, A.B., Talukdar, B.K., Temple, H.J., Timmins, R., Tobias, J.A., Tsytsulina, K., Tweddle, D., Ubeda, C., Valenti, S. V., Paul van Dijk, P., Veiga, L.M., Veloso, A., Wege, D.C., Wilkinson, M., Williamson, E.A., Xie, F., Young, B.E., Akçakaya, H.R., Bennun, L., Blackburn, T.M., Boitani, L., Dublin, H.T., da Fonseca, G.A.B., Gascon, C., Lacher, T.E., Mace, G.M., Mainka, S.A., McNeely, J.A., Mittermeier, R.A., Reid, G.M., Rodriguez, J.P., Rosenberg, A.A., Samways, M.J., Smart, J., Stein, B.A., Stuart, S.N., 2010. The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. *Science* (80-.). 330, 1503–1509. <https://doi.org/10.1126/science.1194442>

Höglund, J., Larsson, J.K., Corrales, C., Santafé, G., Baines, D., Segelbacher, G., 2011. Genetic structure among black grouse in Britain: implications for designing conservation units.

- Anim. Conserv. 14, 400–408. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2011.00436.x>
- Hughes, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T.J., Underwood, N., Vellend, M., 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol. Lett.* 11, 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- Hughes, A.R., Stachowicz, J.J., 2004. Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 8998–9002. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402642101>
- Hughes, T.P., Reed, D.C., Boyle, M.-J., 1987. Herbivory on coral reefs: community structure following mass mortalities of sea urchins. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 113, 39–59. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(87\)90081-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90081-5)
- Hultberg, T., Sandström, J., Felton, A., Öhman, K., Rönnerberg, J., Witzell, J., Cleary, M., 2020. Ash dieback risks an extinction cascade. *Biol. Conserv.* 244, 108516. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108516>
- Iacchei, M., Ben-Horin, T., Selkoe, K.A., Bird, C.E., García-Rodríguez, F.J., Toonen, R.J., 2013. Combined analyses of kinship and *Fst* suggest potential drivers of chaotic genetic patchiness in high gene-flow populations. *Mol. Ecol.* 22, 3476–3494. <https://doi.org/10.1111/mec.12341>
- Ifremer, 2014. Réseau de Suivi Lagunaire du Languedoc-Roussillon.
- IOPR, 2003. Premier séminaire international sur la grande nacre de Méditerranée : *Pinna nobilis*. Mémoires Inst. océanographique Paul Ricard 134.
- Iwankow, G., 2015. Influence des herbiers de posidonies (*Posidonia oceanica*) sur la distribution des grandes nacres de Méditerranée (*Pinna nobilis*) le long de la côte rocheuse des Albères. Ecole Pratique des Hautes Etudes.
- Jablonski, D., 1989. The biology of mass extinction: a palaeontological view. *Philos. Trans. R. Soc. London. B, Biol. Sci.* 325, 357–368. <https://doi.org/10.1098/rstb.1989.0093>
- Johnson, S.L., Yund, P.O., 2007. Variation in multiple paternity in natural populations of a free-spawning marine invertebrate. *Mol. Ecol.* 16, 3253–3262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03366.x>
- Jones, A.G., Small, C.M., Paczolt, K.A., Ratterman, N.L., 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 6–30. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x>
- Jones, G.P., Planes, S., Thorrold, S.R., 2005. Coral reef fish larvae settle close to home. *Curr. Biol.* 15, 1314–1318. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.061>
- Jones, O.R., Wang, J., 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 551–555.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x>

- Kang, J.H., Kim, Y.K., Park, J.Y., Noh, E.S., Jeong, J.E., Lee, Y.S., Choi, T.J., 2013. Development of microsatellite markers for a hard-shelled mussel, *Mytilus coruscus*, and cross-species transfer. *Genet. Mol. Res.* 12, 4009–4017. <https://doi.org/10.4238/2013.September.27.2>
- Katsanevakis, S., 2009. Monitoring of the endangered bivalve *Pinna nobilis* in lake Vouliagmeni (Korinthiakos gulf, Greece) from 2004 to 2007. 9th Symposium Oceanogr. Fish. 727–732.
- Katsanevakis, S., 2007a. Growth and mortality rates of the fan mussel *Pinna nobilis* in Lake Vouliagmeni (Korinthiakos Gulf, Greece): a generalized additive modelling approach. *Mar. Biol.* 152, 1319–1331. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0781-2>
- Katsanevakis, S., 2007b. Density surface modelling with line transect sampling as a tool for abundance estimation of marine benthic species: the *Pinna nobilis* example in a marine lake. *Mar. Biol.* 152, 77–85. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0659-3>
- Katsanevakis, S., 2006. Population ecology of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in a marine lake 1, 51–59.
- Katsanevakis, S., Poursanidis, D., Issaris, Y., Panou, A., Petza, D., Vassilopoulou, V., Chaldaiou, I., Sini, M., 2011. “Protected” marine shelled molluscs: thriving in Greek seafood restaurants. *Mediterr. Mar. Sci.* 12, 429. <https://doi.org/10.12681/mms.42>
- Katsares, V., Tsiora, A., Galinou-Mitsoudi, S., Imsiridou, A., 2008. Genetic structure of the endangered species *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) inferred from mtDNA sequences. *Biologia (Bratisl.)*. 63, 412–417. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0061-8>
- Kehoe, R., Frago, E., Sanders, D., 2020. Cascading extinctions as a hidden driver of insect decline. *Ecol. Entomol.* *een.12985*. <https://doi.org/10.1111/een.12985>
- Kennish, M.J., Paerl, H.W., 2010. Coastal Lagoons: critical habitats of environmental change. Edward Elgar Publishing.
- Kersting, D., Mouloud, B., Cizmek, H., Grau, A., Jimenez, C., Katsanevakis, S., Oztürk, B., Tuncer, S., Tunesi, L., Vázquez-Luis, M., Vicente, N., Otero, M., 2019. *Pinna nobilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T160075998A160081499.en>
- Kersting, D.K., García-March, J.R., 2017. Long-term assessment of recruitment, early stages and population dynamics of the endangered Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* in the Columbretes Islands (NW Mediterranean). *Mar. Environ. Res.* 130, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.08.007>
- Kersting, D.K., Vázquez-Luis, M., Mourre, B., Belkhamssa, F.Z., Álvarez, E., Bakran-Petricioli,

- T., Barberá, C., Barrajon, A., Cortés, E., Deudero, S., García-March, J.R., Giacobbe, S., Giménez-Casalduero, F., González, L., Jiménez-Gutiérrez, S., Kipson, S., Llorente, J., Moreno, D., Prado, P., Pujol, J.A., Sánchez, J., Spinelli, A., Valencia, J.M., Vicente, N., Hendriks, I.E., 2020. Recruitment Disruption and the Role of Unaffected Populations for Potential Recovery After the *Pinna nobilis* Mass Mortality Event. *Front. Mar. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.594378>
- Kim, E.M., An, H.S., Kang, J.H., An, C.M., Dong, C.M., Hong, Y.K., Park, J.Y., 2014. New polymorphic microsatellite markers for the Korean manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and their application to wild populations. *Genet. Mol. Res.* 13, 8163–8173. <https://doi.org/10.4238/2014.October.7.11>
- King, K.C., Lively, C.M., 2012. Does genetic diversity limit disease spread in natural host populations? *Heredity (Edinb)*. 109, 199–203. <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.33>
- Kraemer, P., Gerlach, G., 2017. Demerelate : calculating interindividual relatedness for kinship analysis based on codominant diploid genetic markers using R. *Mol. Ecol. Resour.* 17, 1371–1377. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12666>
- Kritzer, J.P., Sale, P.F., 2004. Metapopulation ecology in the sea: from Levins' model to marine ecology and fisheries science. *Fish Fish.* 5, 131–140. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2004.00131.x>
- Laganà, G., Barreca, D., Giacobbe, S., Bellocco, E., 2014. Anaerobiosis and metabolic plasticity of *Pinna nobilis*: Biochemical and ecological features. *Biochem. Syst. Ecol.* 56, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.05.020>
- Lallias, D., Taris, N., Boudry, P., Bonhomme, F., Lapègue, S., 2010. Variance in the reproductive success of flat oyster *Ostrea edulis* L. assessed by parentage analyses in natural and experimental conditions. *Genet. Res. (Camb)*. 92, 175–187. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000248>
- Lamare, M.D., Stewart, B.G., 1998. Mass spawning by the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea) in a New Zealand fiord. *Mar. Biol.* 132, 135–140. <https://doi.org/10.1007/s002270050379>
- Lande, R., 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science (80-)*. 241, 1455–1460. <https://doi.org/10.1126/science.3420403>
- Lattos, A., Giantsis, I.A., Karagiannis, D., Michaelidis, B., 2020. First detection of the invasive Haplosporidian and Mycobacteria parasites hosting the endangered bivalve *Pinna nobilis* in Thermaikos Gulf, North Greece. *Mar. Environ. Res.* 155, 104889. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104889>
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>

- Ledoux, J.-B., Garrabou, J., Bianchimani, O., Drap, P., Féral, J.-P., Aurelle, D., 2010. Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *Mol. Ecol.* 19, 4204–4216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04814.x>
- Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, C.F., Pérez, T., 2010. Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends Ecol. Evol.* 25, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.009>
- Lemer, S., Buge, B., Bemis, A., Giribet, G., 2014. First molecular phylogeny of the circumtropical bivalve family Pinnidae (Mollusca, Bivalvia): Evidence for high levels of cryptic species diversity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 75, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.02.008>
- Lemer, S., Rochel, E., Planes, S., 2011. Correction Method for Null Alleles in Species with Variable Microsatellite Flanking Regions, A Case Study of the Black-Lipped Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *J. Hered.* 102, 243–246. <https://doi.org/10.1093/jhered/esq123>
- Lessios, H.A., 2016. The Great *Diadema antillarum* Die-Off: 30 Years Later. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 8, 267–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033857>
- Lessios, H.A., 1988. Mass mortality of *Diadema antillarum* in the Caribbean: What have we learned? *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 19, 371–393. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.002103>
- Levins, R., 1970. Extinction. *Some Math. Quest. Biol.*
- Levins, R., 1969. Some Demographic and Genetic Consequences of Environmental Heterogeneity for Biological Control. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 15, 237–240. <https://doi.org/10.1093/besa/15.3.237>
- Levitan, D.R., 2018. Do Sperm Really Compete and Do Eggs Ever Have a Choice? Adult Distribution and Gamete Mixing Influence Sexual Selection, Sexual Conflict, and the Evolution of Gamete Recognition Proteins in the Sea. *Am. Nat.* 191, 88–105. <https://doi.org/10.1086/694780>
- 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. <https://doi.org/10.1086/423150>
- Levitan, D.R., 1991. Influence of body size and population density on fertilization success and reproductive output in a free-spawning invertebrate. *Biol. Bull.* 181, 261–268. <https://doi.org/10.2307/1542097>
- Li, Y.-L., Liu, J.-X., 2018. StructureSelector : A web-based software to select and visualize the

- optimal number of clusters using multiple methods. *Mol. Ecol. Resour.* 18, 176–177. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12719>
- Lindenmayer, D.B., Piggott, M.P., Wintle, B.A., 2013. Counting the books while the library burns: why conservation monitoring programs need a plan for action. *Front. Ecol. Environ.* 11, 549–555. <https://doi.org/10.1890/120220>
- Lloret, J., Marín, A., Marín-Guirao, L., 2008. Is coastal lagoon eutrophication likely to be aggravated by global climate change? *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 78, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.01.003>
- López-Márquez, V., García-Jiménez, R., Templado, J., Machordom, A., 2016. Development and characterization of 26 novel microsatellite loci for the trochid gastropod *Gibbula divaricata* (Linnaeus, 1758), using Illumina MiSeq next generation sequencing technology. *PeerJ* 4, e1789. <https://doi.org/10.7717/peerj.1789>
- Lowe, W.H., Allendorf, F.W., 2010. What can genetics tell us about population connectivity? *Mol. Ecol.* 19, 3038–3051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04688.x>
- Lubchenco, J., Palumbi, S.R., Gaines, S.D., Andelman, S., 2003. Plugging a hole in the ocean: The emerging science of marine reserves. *Ecol. Appl.* 13, 3–7. [https://doi.org/https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)013\[0003:PAHITO\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1890/1051-0761(2003)013[0003:PAHITO]2.0.CO;2)
- Lynch, S.A., Armitage, D. V., Coughlan, J., Mulcahy, M.F., Culloty, S.C., 2007. Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae* 115, 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.09.021>
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., Taberlet, P., 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 18, 189–197. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00008-9)
- Marín, A., Fujimoto, T., Arai, K., 2012. Isolation and characterization of 12 microsatellite loci in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* and cross-species amplification in other scallop species (family Pectinidae). *Conserv. Genet. Resour.* 4, 179–182. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9503-7>
- Marina, P., Urra, J., Bueno, J. de D., Rueda, J.L., Gofas, S., Salas, C., 2020. Spermcast mating with release of zygotes in the small dioecious bivalve *Digitaria digitaria*. *Sci. Rep.* 10, 12605. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69457-2>
- Marko, P.B., Hart, M.W., 2018. Genetic Analysis of Larval Dispersal, Gene Flow, and Connectivity, Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198786962.003.0012>
- Marrocco, V., Sicuro, A., Zangaro, F., Pinna, M., 2018. First record of the protected species *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) in the Aquatina Lagoon (NATURA 2000 site IT9150003,

- South-East Italian coastline). *Nat. Conserv.* 28, 51–59. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.28.26112>
- Maturana, C.S., Gérard, K., Díaz, A., David, B., Féral, J.-P., Poulin, E., 2017. Mating system and evidence of multiple paternity in the Antarctic brooding sea urchin *Abatus agassizii*. *Polar Biol.* 40, 787–797. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-2001-3>
- May, S.E., Medley, K.A., Johnson, S.A., Hoffman, E.A., 2011. Combining genetic structure and ecological niche modeling to establish units of conservation: A case study of an imperiled salamander. *Biol. Conserv.* 144, 1441–1450. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.01.013>
- Mazor, T., Possingham, H.P., Kark, S., 2013. Collaboration among countries in marine conservation can achieve substantial efficiencies. *Divers. Distrib.* 19, 1380–1393. <https://doi.org/10.1111/ddi.12095>
- McInerney, C.E., Allcock, A.L., Johnson, M.P., Bailie, D.A., Prodöhl, P.A., 2011. Comparative genomic analysis reveals species-dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in molluscs. *Heredity (Edinb.)* 106, 78–87. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.36>
- Mendo, T., Moltschaniwskyj, N., Lyle, J.M., Tracey, S.R., Semmens, J.M., 2014. Role of density in aggregation patterns and synchronization of spawning in the hermaphroditic scallop *Pecten fumatus*. *Mar. Biol.* 161, 2857–2868. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2551-2>
- Miyawaki, D., Sekiguchi, H., 2000. Long-Term Observations on Larval Recruitment Processes of Bivalve Assemblages on Temperate Tidal Flats. *Benthos Res.* 55, 1–16. https://doi.org/10.5179/benthos1996.55.1_1
- Mora, C., Sale, P.F., 2002. Are populations of coral reef fish open or closed? *Trends Ecol. Evol.* 17, 422–428. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02584-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02584-3)
- Morales-González, S., Giles, E.C., Quesada-Calderón, S., Saenz-Agudelo, P., 2019. Fine-scale hierarchical genetic structure and kinship analysis of the ascidian *Pyura chilensis* in the southeastern Pacific. *Ecol. Evol.* 9, 9855–9868. <https://doi.org/10.1002/ece3.5526>
- Morvezen, R., Charrier, G., Boudry, P., Chauvaud, L., Breton, F., Strand, Ø., Laroche, J., 2016. Genetic structure of a commercially exploited bivalve, the great scallop *Pecten maximus*, along the European coasts. *Conserv. Genet.* 17, 57–67. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0760-y>
- Mouillot, D., Gaillard, S., Aliaume, C., Verlaque, M., Belsher, T., Troussellier, M., Dochi, T., 2005. Ability of taxonomic diversity indices to discriminate coastal lagoon environments based on macrophyte communities. *Ecol. Indic.* 5, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2004.04.004>

- Munday, P.L., Leis, J.M., Lough, J.M., Paris, C.B., Kingsford, M.J., Berumen, M.L., Lambrechts, J., 2009. Climate change and coral reef connectivity. *Coral Reefs* 28, 379–395. <https://doi.org/10.1007/s00338-008-0461-9>
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Najdek, M., Blažina, M., Ezgeta-Balić, D., Peharda, M., 2013. Diets of fan shells (*Pinna nobilis*) of different sizes: fatty acid profiling of digestive gland and adductor muscle. *Mar. Biol.* 160, 921–930. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2144-x>
- Natalotto, A., Sureda, A., Maisano, M., Spanò, N., Mauceri, A., Deudero, S., 2015. Biomarkers of environmental stress in gills of *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) from Balearic Island. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.035>
- Natunewicz, C., Epifanio, C., Garvine, R., 2001. Transport of crab larval patches in the coastal ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 222, 143–154. <https://doi.org/10.3354/meps222143>
- Nie, H., Jiang, L., Gao, Y., Xu, H., Du, S., Yan, X., 2019. Polymorphic Microsatellite Markers for *Solen grandis* and Their Cross-Species Amplification in Three Other Species. *Anim. Biotechnol.* 30, 82–86. <https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1367690>
- Niu, S., Zhai, Y., Wu, R., Zhang, H., Tian, L., Deng, J., Xiao, Y., 2019. Isolation and characterization of 49 polymorphic microsatellite loci for *Decapтерus maruadsi* using SLAF-seq, and cross-amplification to related species. *J. Oceanol. Limnol.* 37, 245–255. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7299-6>
- North, E., Schlag, Z., Hood, R., Li, M., Zhong, L., Gross, T., Kennedy, V., 2008. Vertical swimming behavior influences the dispersal of simulated oyster larvae in a coupled particle-tracking and hydrodynamic model of Chesapeake Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 359, 99–115. <https://doi.org/10.3354/meps07317>
- Novak, B.J., Maloney, T., Phelan, R., 2018. Advancing a New Toolkit for Conservation: From Science to Policy. *Cris. J.* 1, 11–15. <https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0019>
- Oliver, T.H., Heard, M.S., Isaac, N.J.B., Roy, D.B., Procter, D., Eigenbrod, F., Freckleton, R., Hector, A., Orme, C.D.L., Petchey, O.L., Proença, V., Raffaelli, D., Suttle, K.B., Mace, G.M., Martín-López, B., Woodcock, B.A., Bullock, J.M., 2015. Biodiversity and Resilience of Ecosystem Functions. *Trends Ecol. Evol.* 30, 673–684. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.08.009>
- Öndes, F., Kaiser, M.J., Güçlüsoy, H., 2020. Human impacts on the endangered fan mussel, *Pinna nobilis*. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 30, 31–41. <https://doi.org/10.1002/aqc.3237>
- Ouborg, N.J., 2010. Integrating population genetics and conservation biology in the era of

- genomics. *Biol. Lett.* 6, 3–6. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0590>
- Oury, N., Léopold, M., Magalon, H., 2019. Isolation and characterization of microsatellite loci from three widespread tropical sea cucumbers of the genus *Holothuria* (Echinodermata, Holothuroidea), and cross-amplification among them. *Mol. Biol. Rep.* 46, 3501–3510. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04747-1>
- Padedda, B.M., Pulina, S., Satta, C.T., Lugliè, A., Magni, P., 2019. Eutrophication and Nutrient Fluxes in Mediterranean Coastal Lagoons, in: *Encyclopedia of Water*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1002/9781119300762.wsts0161>
- Pakhomova, S., Yakushev, E., Protsenko, E., Rigaud, S., Cossa, D., Knoery, J., Couture, R.-M., Radakovitch, O., Yakubov, S., Krzeminska, D., Newton, A., 2018. Modeling the Influence of Eutrophication and Redox Conditions on Mercury Cycling at the Sediment-Water Interface in the Berre Lagoon. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00291>
- Panarese, R., Tedesco, P., Chimienti, G., Latrofa, M.S., Quaglio, F., Passantino, G., Buonavoglia, C., Gustinelli, A., Tursi, A., Otranto, D., 2019. *Haplosporidium pinnae* associated with mass mortality in endangered *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) fan mussels. *J. Invertebr. Pathol.* 164, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.005>
- Paradis, E., Schliep, K., 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35, 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pedersen, T.L., Pedersen, M.T.L., LazyData, T., Rcpp, I., Rcpp, L., 2017. Package ‘ggraph.’ Retrieved January 1, 2018.
- Pemberton, J., 2008. Wild pedigrees: the way forward. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 613–621. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1531>
- Pérez-Ruzafa, A., De Pascalis, F., Ghezzi, M., Quispe-Becerra, J.I., Hernández-García, R., Muñoz, I., Vergara, C., Pérez-Ruzafa, I.M., Umgieser, G., Marcos, C., 2019a. Connectivity between coastal lagoons and sea: Asymmetrical effects on assemblages’ and populations’ structure. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 216, 171–186. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.02.031>
- Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C., Gilabert, J., 2005. The Ecology of the Mar Menor Coastal Lagoon : a Fast Changing Ecosystem, in: Gönenc, I.E., Wolflin, J.P. (Eds.), *Coastal Lagoons. Ecosystem Processes and Modelling for Sustainable Use and Development*. CRC Press Boca Raton, pp. 392–422.

- Pérez-Ruzafa, A., Pérez-Ruzafa, I.M., Newton, A., Marcos, C., 2019b. Coastal Lagoons: Environmental Variability, Ecosystem Complexity, and Goods and Services Uniformity, in: Coasts and Estuaries. Elsevier, pp. 253–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814003-1.00015-0>
- Petrenko, A., Leredde, Y., Marsaleix, P., 2005. Circulation in a stratified and wind-forced Gulf of Lions, NW Mediterranean Sea: in situ and modeling data. *Cont. Shelf Res.* 25, 7–27. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2004.09.004>
- Peyran, C., Boissin, E., Morage, T., Nebot-Colomer, E., Iwankow, G., Planes, S., 2021a. Genetic homogeneity of the critically endangered fan mussel, *Pinna nobilis*, throughout lagoons of the Gulf of Lion (North-Western Mediterranean Sea). *Sci. Rep.* 11, 7805. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87493-4>
- Peyran, C., Morage, T., Nebot-Colomer, E., Iwankow, G., Planes, S., 2021b. On the brink of extinction: unexpected residual habitats raise hope for the survival of the fan mussel, *Pinna nobilis*, along the Occitan coast (north-western Mediterranean Sea). prep.
- Peyran, C., Planes, S., Tolou, N., Iwankow, G., Boissin, E., 2020. Development of 26 highly polymorphic microsatellite markers for the highly endangered fan mussel *Pinna nobilis* and cross-species amplification. *Mol. Biol. Rep.* <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05338-1>
- Pievani, T., 2014. The sixth mass extinction: Anthropocene and the human impact on biodiversity. *Rend. Lincei* 25, 85–93. <https://doi.org/10.1007/s12210-013-0258-9>
- Pineda, J., Hare, J., Sponaugle, S., 2007. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography* 20, 22–39. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.27>
- Pirog, A., Jaquemet, S., Blaison, A., Soria, M., Magalon, H., 2016. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from *Galeocerdo cuvier* (tiger shark) and cross-amplification in *Carcharhinus leucas*, *Carcharhinus brevipinna*, *Carcharhinus plumbeus* and *Sphyrna lewini*. *PeerJ* 4, e2041. <https://doi.org/10.7717/peerj.2041>
- Planes, S., Jones, G.P., Thorrold, S.R., 2009. Larval dispersal connects fish populations in a network of marine protected areas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5693–5697. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808007106>
- Prado, P., Andree, K.B., Trigos, S., Carrasco, N., Caiola, N., García-March, J.R., Tena, J., Fernández-Tejedor, M., Carella, F., 2020. Breeding, planktonic and settlement factors shape recruitment patterns of one of the last remaining major population of *Pinna nobilis* within Spanish waters. *Hydrobiologia* 847, 771–786. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04137-5>
- Prado, P., Caiola, N., Ibáñez, C., 2014. Habitat use by a large population of *Pinna nobilis* in

- shallow waters. *Sci. Mar.* 78, 555–565. <https://doi.org/10.3989/scimar.04087.03A>
- Prado, P., Grau, A., Catanese, G., Cabanes, P., Carella, F., Fernández-Tejedor, M., Andree, K.B., Añón, T., Hernandis, S., Tena, J., García-March, J.R., 2021. *Pinna nobilis* in suboptimal environments are more tolerant to disease but more vulnerable to severe weather phenomena. *Mar. Environ. Res.* 163, 105220. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105220>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.
- Puckett, B.J., Eggleston, D.B., Kerr, P.C., Luettich, R.A., 2014. Larval dispersal and population connectivity among a network of marine reserves. *Fish. Oceanogr.* 23, 342–361. <https://doi.org/10.1111/fog.12067>
- Puechmaille, S.J., 2016. The program STRUCTURE does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 608–627. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512>
- Pusack, T.J., Christie, M.R., Johnson, D.W., Stallings, C.D., Hixon, M.A., 2014. Spatial and temporal patterns of larval dispersal in a coral-reef fish metapopulation: evidence of variable reproductive success. *Mol. Ecol.* 23, 3396–3408. <https://doi.org/10.1111/mec.12824>
- Queller, D.C., Goodnight, K.F., 1989. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution (N. Y.)* 43, 258. <https://doi.org/10.2307/2409206>
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rabaoui, L., Mejri, R., Tlig-Zouari, S., Bahri, L., Ben Hassine, O.K., Tsigenopoulos, C.S., 2011. Genetic variation among populations of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) along the Tunisian coastline. *Hydrobiologia* 678, 99–111. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0827-9>
- Rabaoui, L., Tlig-Zouari, S., Cosentino, A., Ben Hassine, O.K., 2009. Associated fauna of the fan shell *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) in the northern and eastern Tunisian coasts. *Sci. Mar.* 73, 129–141. <https://doi.org/10.3989/scimar.2009.73n1129>
- Rabaoui, L., Tlig-Zouari, S., Katsanevakis, S., Ben Hassine, O.K., 2010. Modelling population density of *Pinna nobilis* (Bivalvia) on the eastern and southeastern coast of Tunisia. *J. Molluscan Stud.* 76, 340–347. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyq023>
- Rabaoui, L., Zouari, S.T., Ben Hassine, O.K., 2008. Two species of crustacea (Decapoda) associated with the fan mussel, *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 (Mollusca, Bivalvia) 81, 433–446. <https://doi.org/http://www.jstor.org/stable/20111407>.

- Raufaste, N., Bonhomme, F., 2000. Properties of Bias and Variance of Two Multiallelic Estimators of FST. *Theor. Popul. Biol.* 57, 285–296. <https://doi.org/10.1006?tpbi.2000.1457>
- Reading, R.P., Clark, T.W., Kellert, S.R., 2002. Towards an endangered species reintroduction paradigm. *Endanger. Species Updat.* 19, 142–146.
- Redford, K.H., Brooks, T.M., Nicholas, B.W., Adams, J.S., 2019. Genetic frontiers for conservation: an assessment of synthetic biology and biodiversity conservation: technical assessment, Genetic frontiers for conservation: an assessment of synthetic biology and biodiversity conservation: technical assessment. IUCN, International Union for Conservation of Nature. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2019.05.en>
- Reed, D.H., Frankham, R., 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conserv. Biol.* 17, 230–237.
- Reid, K., Hoareau, T., Bloomer, P., 2012. High-throughput microsatellite marker development in two sparid species and verification of their transferability in the family Sparidae. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 740–752. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03138.x>
- Renault, L., Chiggiato, J., Warner, J.C., Gomez, M., Vizoso, G., Tintoré, J., 2012. Coupled atmosphere-ocean-wave simulations of a storm event over the Gulf of Lion and Balearic Sea. *J. Geophys. Res. Ocean.* 117, 1–25. <https://doi.org/10.1029/2012JC007924>
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution (N. Y.)* 43, 223–225. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04220.x>
- Richardson, C.A., Kennedy, H., Duarte, C.M., Kennedy, D.P., Proud, S. V., 1999. Age and growth of the fan mussel *Pinna nobilis* from south-east Spanish Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows. *Mar. Biol.* 133, 205–212. <https://doi.org/10.1007/s002270050459>
- Richardson, C.A., Kennedy, H., Duarte, C.M., Proud, S.V., 1997. The occurrence of *Pontonia pinnophylax* (Decapoda: Natantia: Pontoninae) in *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia: Pinnidae) from the Mediterranean. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 77, 1227–1230. <https://doi.org/10.1017/S0025315400038741>
- Robertson, A., Hill, W.G., 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: Sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107, 703–718.
- Robinson, N.M., Dexter, N., Brewster, R., Maple, D., MacGregor, C., Rose, K., Hall, J., Lindenmayer, D.B., 2020. Be nimble with threat mitigation: lessons learned from the reintroduction of an endangered species. *Restor. Ecol.* 28, 29–38. <https://doi.org/10.1111/rec.13028>
- Rodríguez-Gallego, L., Achkar, M., Defeo, O., Vidal, L., Meerhoff, E., Conde, D., 2017. Effects of land use changes on eutrophication indicators in five coastal lagoons of the

- Southwestern Atlantic Ocean. Estuar. Coast. Shelf Sci. 188, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.02.010>
- Rodríguez-Moreno, M., Zapata, F.A., Ramírez-Calero, S., van Herwerden, L., Feldheim, K., 2017. Highly polymorphic microsatellite loci for the Acapulco damselfish, *Stegastes acapulcoensis*, and cross amplification in three congeneric species. Mar. Biodivers. 49, 481–486. <https://doi.org/10.1007/s12526-017-0761-9>
- Ronce, O., 2007. How Does It Feel to Be Like a Rolling Stone? Ten Questions About Dispersal Evolution. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 38, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095611>
- Rouanet, E., Trigos, S., Vicente, N., 2015. From youth to death of old age: the 50-year story of a *Pinna nobilis* fan mussel population at Port-Cros Island (Port-Cros National Park, Provence, Mediterranean Sea). 209-Sci. Rep. Port-Cros natl. Park 29, 209–222.
- Rousset, F., 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Resour. 8, 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Rumrill, S.S., 1990. Natural mortality of marine invertebrate larvae. Ophelia 32, 163–198. <https://doi.org/10.1080/00785236.1990.10422030>
- Russ, G. R., Alcala, C.A., 1996. Do marine reserves export adult fish biomass ? Evidence from Apo Island, Central Philippines. Mar. Ecol. Prog. Ser. 132, 1–9.
- Russo, P., 2012. Segnalazione di una grande colonia di *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) nella Laguna di Venezia. Contrib. Not. SIM 31, 31–34.
- Saenz-Agudelo, P., Jones, G.P., Thorrold, S.R., Planes, S., 2011. Connectivity dominates larval replenishment in a coastal reef fish metapopulation. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 278, 2954–2961. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2780>
- Salles, O., 2016. Potentiel évolutif d'une population naturelle de poissons coralliens à fort auto-recrutement dans un environnement variable. Thèse Dr. Biodiversité, Génétique Evol.
- Salles, O.C., Maynard, J.A., Joannides, M., Barbu, C.M., Saenz-Agudelo, P., Almany, G.R., Berumen, M.L., Thorrold, S.R., Jones, G.P., Planes, S., 2015. Coral reef fish populations can persist without immigration. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1311>
- Salles, O.C., Pujol, B., Maynard, J.A., Almany, G.R., Berumen, M.L., Jones, G.P., Saenz-Agudelo, P., Srinivasan, M., Thorrold, S.R., Planes, S., 2016. First genealogy for a wild marine fish population reveals multigenerational philopatry. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 13245–13250. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611797113>

- Sandonnini, J., Del Pilar Ruso, Y., Cortés Melendreras, E., Barberá, C., Hendriks, I.E., Kersting, D.K., Giménez Casalduero, F., 2021. The emergent fouling population after severe eutrophication in the Mar Menor coastal lagoon. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 44, 101720. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101720>
- Sanna, D., Cossu, P., Dedola, G.L., Scarpa, F., Maltagliati, F., Castelli, A., Franzoi, P., Lai, T., Cristo, B., Curini-Galletti, M., Francalacci, P., Casu, M., 2013. Mitochondrial DNA Reveals Genetic Structuring of *Pinna nobilis* across the Mediterranean Sea. *PLoS One* 8, e67372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067372>
- Sanna, D., Dedola, G.L., Scarpa, F., Lai, T., Cossu, P., Curini-Galletti, M., Francalacci, P., Casu, M., 2014. New mitochondrial and nuclear primers for the Mediterranean marine bivalve *Pinna nobilis*. *Mediterr. Mar. Sci.* 15, 416. <https://doi.org/10.12681/mms.459>
- Šarić, T., Župan, I., Aceto, S., Villari, G., Palić, D., De Vico, G., Carella, F., 2020. Epidemiology of Noble Pen Shell (*Pinna nobilis* L. 1758) Mass Mortality Events in Adriatic Sea Is Characterised with Rapid Spreading and Acute Disease Progression. *Pathogens* 9, 776. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100776>
- Saunders, M.I., Brown, C.J., Foley, M.M., Febria, C.M., Albright, R., Mehling, M.G., Kavanaugh, M.T., Burfeind, D.D., 2016. Human impacts on connectivity in marine and freshwater ecosystems assessed using graph theory: a review. *Mar. Freshw. Res.* 67, 277. <https://doi.org/10.1071/MF14358>
- Scarpa, F., Sanna, D., Azzena, I., Cossu, P., Casu, M., 2021. From dark to light and back again: is *Pinna nobilis*, the largest Mediterranean bivalve, on the brink of extinction? *Veterinaria* 1–14. <https://doi.org/10.51607/22331360.2021.70.1.1>
- Scarpa, F., Sanna, D., Azzena, I., Mugetti, D., Cerruti, F., Hosseini, S., Cossu, P., Pinna, S., Grech, D., Cabana, D., Pasquini, V., Esposito, G., Cadoni, N., Atzori, F., Antuofermo, E., Addis, P., Sechi, L.A., Prearo, M., Peletto, S., Mossa, M.A., Saba, T., Gazale, V., Casu, M., 2020. Multiple non-species-specific pathogens possibly triggered the mass mortality in *Pinna nobilis*. *Life* 10, 238. <https://doi.org/10.3390/life10100238>
- Schlotterer, C., Ritter, R., Harr, B., Brem, G., 1998. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1269–1274. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025855>
- Seddon, P.J., Griffiths, C.J., Soorae, P.S., Armstrong, D.P., 2014. Reversing defaunation: Restoring species in a changing world. *Science* (80-.). 345, 406–412. <https://doi.org/10.1126/science.1251818>
- Šegvić-Bubić, T., Žužul, I., Talijančić, I., Ugrin, N., Lepen Pleić, I., Žuvić, L., Stagličić, N., Grubišić, L., 2020. Translocation and Aquaculture Impact on Genetic Diversity and Composition of Wild Self-Sustainable *Ostrea edulis* Populations in the Adriatic Sea. *Front. Mar. Sci.* 7,

- 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00084>
- Selkoe, K.A., Gaines, S.D., Caselle, J.E., Warner, R.R., 2006. Current shifts and kin aggregation explain genetic patchiness in fish recruits. *Ecology* 87, 3082–94. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[3082:csakae\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[3082:csakae]2.0.co;2)
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9, 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Seyfried, L., Estournel, C., Marsaleix, P., Richard, E., 2019. Dynamics of the North Balearic Front during an autumn tramontane and mistral storm: air–sea coupling processes and stratification budget diagnostic. *Ocean Sci.* 15, 179–198. <https://doi.org/10.5194/os-15-179-2019>
- Skalamera, J., Renaud, F., Raymond, M., de Meeûs, T., 1999. No evidence for genetic differentiation of the mussel *Mytilus galloprovincialis* between lagoons and the seaside. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 178, 251–258. <https://doi.org/10.3354/meps178251>
- Smith, C.J., Papadopoulou, K.N., Carballo-Cárdenas, E., van Tatenhove, J.P.M., 2021. Marine restoration in the Mediterranean: red coral and fan mussel discourses, uncertainty and reaching restoration targets. *Mar. Policy* 128, 104488. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2021.104488>
- Snoeijs-Leijonmalm, P., Schubert, H., Radziejewska, T., 2017. Biological Oceanography of the Baltic Sea, Biological Oceanography of the Baltic Sea. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0668-2>
- Soong, K., Chang, D., Chao, S., 2005. Presence of spawn-inducing pheromones in two brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 292, 195–201. <https://doi.org/10.3354/meps292195>
- Soulé, M.E., 1985. What Is Conservation Biology? *Bioscience* 35, 727–734. <https://doi.org/10.2307/1310054>
- Strathmann, R.R., Hughes, T.P., Kuris, A.M., Lindeman, K.C., Morgan, S.G., Pandolfi, J.M., Warner, R.R., 2002. Evolution of local recruitment and its consequences for marine populations. *Bull. Mar. Sci.* 70, 377–396.
- Strayer, D.L., Caraco, N.F., Cole, J.J., Findlay, S., Pace, M.L., 1999. Transformation of Freshwater Ecosystems by Bivalves. *Bioscience* 49, 19. <https://doi.org/10.2307/1313490>
- Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15, 199–203. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01825-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01825-5)
- 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.
- Swearer, S.E., Trembl, E.A., Shima, J.S., 2019. A review of biophysical models of marine larval dispersal, in: *Oceanography and Marine Biology*.
- Syasina, I.G., Vashchenko, M.A., Zhadan, P.M., Karaseva, E.M., 1996. State of the gonads and development of offspring of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* from polluted areas in Peter the Great Bay, the sea of Japan. *Russ. J. Mar. Biol.* 22, 233–240.
- Szpiech, Z.A., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2008. ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics* 24, 2498–2504. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn478>
- Tarnowska, K., Chenuil, A., Nikula, R., Féral, J., Wolowicz, M., 2010. Complex genetic population structure of the bivalve *Cerastoderma glaucum* in a highly fragmented lagoon habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 406, 173–184. <https://doi.org/10.3354/meps08549>
- Tavaré, S., Balding, D.J., Griffiths, R.C., Donnelly, P., 1997. Inferring Coalescence Times From DNA Sequence Data. *Genetics* 145, 505–518. <https://doi.org/10.1093/genetics/145.2.505>
- Teske, P.R., Sandoval-Castillo, J., van Sebille, E., Waters, J., Beheregaray, L.B., 2016. Oceanography promotes self-recruitment in a planktonic larval disperser. *Sci. Rep.* 6, 34205. <https://doi.org/10.1038/srep34205>
- Thiault, L., Kernaléguen, L., Osenberg, C.W., Lison de Loma, T., Chancerelle, Y., Siu, G., Claudet, J., 2019. Ecological evaluation of a marine protected area network: a progressive-change BACIPS approach. *Ecosphere* 10, e02576. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2576>
- Thorson, G., 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Rev.* 25, 1–45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1950.tb00585.x>
- Trigos, S., García-March, J.R., Vicente, N., Tena, J., Torres, J., 2014a. Utilization of muddy detritus as organic matter source by the fan mussel *Pinna nobilis*. *Mediterr. Mar. Sci.* 15, 667. <https://doi.org/10.12681/mms.836>
- Trigos, S., García-March, J.R., Vicente, N., Tena, J., Torres, J., 2014b. Utilization of muddy detritus as organic matter source by the fan mussel *Pinna nobilis*. *Mediterr. Mar. Sci.* 15, 667. <https://doi.org/10.12681/mms.836>
- Trigos, S., Vicente, N., 2019. Occurrence of association of *Pinna nobilis* with two decapod species in Mediterranean french waters. *Thalass. An Int. J. Mar. Sci.* 35, 151–154. <https://doi.org/10.1007/s41208-018-0103-0>
- Trigos, S., Vicente, N., 2018. Population Status of *Pinna nobilis* in four protected areas of

France and Monaco. *Vie Milieu* 68, 145–149.

- Trigos, S., Vicente, N., Prado, P., Espinós, F.J., 2018. Adult spawning and early larval development of the endangered bivalve *Pinna nobilis*. *Aquaculture* 483, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.015>
- Tsatiris, A., Papadopoulos, V., Makri, D., Topouzelis, K., Manoutsoglou, E., Hasiotis, T., Katsanevakis, S., 2018. Spatial distribution, abundance and habitat use of the endemic Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* in Gera Gulf, Lesvos (Greece): comparison of design-based and model-based approaches. *Mediterr. Mar. Sci.* 19, 642. <https://doi.org/10.12681/mms.14156>
- Tsatsakis, A.M., Nawaz, M.A., Kouretas, D., Balias, G., Savolainen, K., Tutelyan, V.A., Golokhvast, K.S., Lee, J.D., Yang, S.H., Chung, G., 2017. Environmental impacts of genetically modified plants: A review. *Environ. Res.* 156, 818–833. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.011>
- Twitchett, R.J., 2006. The palaeoclimatology, palaeoecology and palaeoenvironmental analysis of mass extinction events. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 232, 190–213. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2005.05.019>
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Barraón, A., García-March, J.R., Grau, A., Hendriks, I.E., Jiménez, S., Kersting, D., Moreno, D., Pérez, M., Ruiz, J.M., Sánchez, J., Villalba, A., Deudero, S., 2017. S.O.S. *Pinna nobilis*: A Mass Mortality Event in Western Mediterranean Sea. *Front. Mar. Sci.* 4, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00220>
- Vázquez-luis, M., March, D., Alvarez, E., Alvarez-Berastegui, D., Deudero, S., 2014. Spatial distribution modelling of the endangered bivalve *Pinna nobilis* in a Marine Protected Area. *Mediterr. Mar. Sci.* 15, 626. <https://doi.org/10.12681/mms.796>
- Vázquez-Luis, M., Nebot-Colomer, E., Deudero, S., Planes, S., Boissin, E., 2021. Natural hybridization between pen shell species: *Pinna rudis* and the critically endangered *Pinna nobilis* may explain parasite resistance in *P. nobilis*. *Mol. Biol. Rep.* 48, 997–1004. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06063-5>
- Veliz, D., Duschene, P., Bourget, E., Bernatchez, L., 2006. Genetic evidence for kin aggregation in the intertidal acorn barnacle (*Semibalanus balanoides*). *Mol. Ecol.* 15, 4193–4202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03078.x>
- Viaroli, P., Bartoli, M., Giordani, G., Naldi, M., Orfanidis, S., Zaldivar, J.M., 2008. Community shifts, alternative stable states, biogeochemical controls and feedbacks in eutrophic coastal lagoons: a brief overview. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 18, S105–S117.

<https://doi.org/10.1002/aqc.956>

- Wacker, S., Larsen, B.M., Jakobsen, P., Karlsson, S., 2018. High levels of multiple paternity in a spermcast mating freshwater mussel. *Ecol. Evol.* 8, 8126–8134. <https://doi.org/10.1002/ece3.4201>
- Wake, D.B., Vredenburg, V.T., 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 11466–11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- Warner, R.R., Cowen, R.K., 2002. Local retention of production in marine populations: evidence, mechanisms, and consequences. *Bull. Mar. Sci.* 70, 245–249.
- Watson, G., Bentley, M., Gaudron, S., Hardege, J., 2003. The role of chemical signals in the spawning induction of polychaete worms and other marine invertebrates. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 294, 169–187. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00264-8)
- Weersing, K., Toonen, R., 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 393, 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps08287>
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution (N. Y.)* 38, 1358. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- Wesselmann, M., González-Wangüemert, M., Serrão, E.A., Engelen, A.H., Renault, L., García-March, J.R., Duarte, C.M., Hendriks, I.E., 2018. Genetic and oceanographic tools reveal high population connectivity and diversity in the endangered pen shell *Pinna nobilis*. *Sci. Rep.* 8, 4770. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23004-2>
- White, J.W., Carr, M.H., Caselle, J.E., Washburn, L., Woodson, C.B., Palumbi, S.R., Carlson, P.M., Warner, R.R., Menge, B.A., Barth, J.A., Blanchette, C.A., Raimondi, P.T., Milligan, K., 2019. Connectivity, Dispersal, and Recruitment. *Oceanography* 32, 50–59.
- Williams, B.K., 2011. Passive and active adaptive management: Approaches and an example. *J. Environ. Manage.* 92, 1371–1378. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.039>
- Wilson, A.J., Ferguson, M.M., 2002. Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications, and practical considerations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1696–1707. <https://doi.org/10.1139/f02-127>
- Woodcock, P., Cottrell, J.E., Buggs, R.J.A., Quine, C.P., 2018. Mitigating pest and pathogen impacts using resistant trees: a framework and overview to inform development and deployment in Europe and North America. *For. An Int. J. For. Res.* 91, 1–16. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpx031>
- Yackulic, C.B., Nichols, J.D., Reid, J., Der, R., 2015. To predict the niche, model colonization and extinction. *Ecology* 96, 16–23. <https://doi.org/10.1890/14-1361.1>
- Ye, Y., Yan, C., Senanan, W., Guo, B., Xu, K., Lü, Z., 2020. Genetic Population Structure of the

- Hard Clam *Meretrix meretrix* Along the Chinese Coastlines Revealed by Microsatellite DNA Markers. *Front. Mar. Sci.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00516>
- Young, C.M., 1990. Larval ecology of marine invertebrates: A sesquicentennial history. *Ophelia* 32, 1–48. <https://doi.org/10.1080/00785236.1990.10422023>
- Zakhama-Sraieb, R., Sghaier, Y.R., Omrane, A., Charfi-Cheikhrouha, F., 2011. Density and Population Structure of *Pinna nobilis* (Mollusca , Bivalvia) in the Ghar El Melh Lagoon (N-E Tunisia). *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer Salammbó* 38, 65–71.
- Zhan, A., Hu, J., Hu, X., Hui, M., Wang, M., Peng, W., Huang, X., Wang, S., Lu, W., Sun, C., Bao, Z., 2009. Construction of microsatellite-based linkage maps and identification of size-related quantitative trait loci for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). *Anim. Genet.* 40, 821–831. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01920.x>
- Zhang, B., Oakes, A.D., Newhouse, A.E., Baier, K.M., Maynard, C.A., Powell, W.A., 2013. A threshold level of oxalate oxidase transgene expression reduces *Cryphonectria parasitica*-induced necrosis in a transgenic American chestnut (*Castanea dentata*) leaf bioassay. *Transgenic Res.* 22, 973–982. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9708-5>
- Zhang, D.-X., 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends Ecol. Evol.* 19, 507–509. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.020>
- Žuljević, A., Despalatović, M., Cvitković, I., Morton, B., Antolić, B., 2018. Mass spawning by the date mussel *Lithophaga lithophaga*. *Sci. Rep.* 8, 10781. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28826-8>

ANNEXES



© D. Fioramonti

Annexe 1

Inferred family structure of a critically endangered species, *Pinna nobilis*, using molecular analyses: implications for conservation

Elisabet Nebot-Colomer¹, Matie Vázquez-Luis¹, Emilie Boissin², Claire Peyran², Salud Deudero¹, Serge Planes²

¹Instituto Español de Oceanografía (IEO). Centro Oceanográfico de Baleares. Muelle de Poniente s/n, 07015. Palma de Mallorca, Spain

²PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, Université de Perpignan, 58 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

Acknowledgements

This research was partially funded by research Project “Estado de conservación del bivalve amenazado, *Pinna nobilis*, en el Parque Nacional del Archipiélago de Cabrera” (024/2010), “Organismo Autónomo de Parques Nacionales Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino”; and EsMarEs (Ministerio para la Transición Ecológica, Spanish Government). Thanks are due to the staff of Cabrera National Park for giving permission and facilities. Maite Vázquez-Luis was supported by a postdoctoral contract Juan de la Cierva-Incorporación (IJCI-2016-29329) of Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades

Abstract

Knowledge on genetic structure and connectivity patterns of keystone and vulnerable species is essential for the preservation of species and the structure and functioning of ecosystems. Here we focus on the genetic structure and connectivity patterns of the endemic and critically endangered bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758). During autumn 2016, the species suffered a mass mortality event (MME) spreading in the whole Mediterranean Sea. In the current scenario, several works are in progress to protect *P. nobilis* from extinction. In order to propose proper conservation measures for its recovery (translocations, restocking), knowledge of genetic structure and connectivity at a local level is an urgent need. Using 19 microsatellite markers, we gathered genotypic information from 771 individuals of 9 localities in the marine protected area of Cabrera National Park. A high number of individuals related have been found despite the low percentage of sampled individuals, concurring with the lack of genetic structure at the scale of the MPA and pointing to high levels of connectivity of all sampled sites in the National Park. The high percentage of families with 2 members could be due to the reproductive characteristics of the species (external fecundation), to the difficulty of sampling a high percentage of the population (due to the high densities existing previous to the MME), the existence of pelagic larvae (dispersal process); and to the high mortality rates of the first years. However, the existence of families with a total of 8 members living in up to four different sites points out the high connectivity across the National Park. Moreover, based on results obtained, the fully protected area (Santa Maria) seems to be a source site with high number of connections to the rest of the sites within the National Park, making it a key site for future restocking programs.

Keywords: bivalve, kinship analyses, connectivity, parentage analysis, dispersal, self-recruitment, family structure

Population genetic and dynamics for marine conservation in a habitat fragmented species: the case of *Pinna rudis*.

Matie Vázquez-Luis¹, Elvira Alvarez¹, Elisabet Nebot-Colomer¹, Claire Peyran¹, Emilie Boissin², Salud Deudero¹, Serge Planes²

¹Instituto Español de Oceanografía (IEO). Centro Oceanográfico de Baleares. Muelle de Poniente s/n, 07015. Palma de Mallorca, Spain

²PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, Université de Perpignan, 58 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

Annexe 3

A specific gene expression signature in *Pinna nobilis* resistant for *Haplosporidium pinnae*

Pauline Salis¹, Claire Peyran¹, Titouan Morage¹, Simon de Bernard², Julien Nourikyan², Stéphane Coupé³, Robert Bunet⁴, Serge Planes*^{1,5}

¹PSL Research University: EPHE - UPVD - CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

²Altrabio, F-69007 Lyon, France

³Mediterranean Institute of Oceanography, University of Toulon, France

⁴Institut Océanographique Paul Ricard, France

⁵Laboratoire d'Excellence "CORAIL", Perpignan, France

Author Contributions

TM and CP performed sampling of *Pinna nobilis* tissue. PS and CP performed biomolecular experiments. JN and SDB performed transcriptomic analysis. RB and SC provided *Pinna nobilis* genome. PS and SP designed the study and wrote the article.

Compliance with ethical standards

The sampling was non-lethal and approved by the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) of Occitanie (prefectural order n°2018-s-24).

Acknowledgments

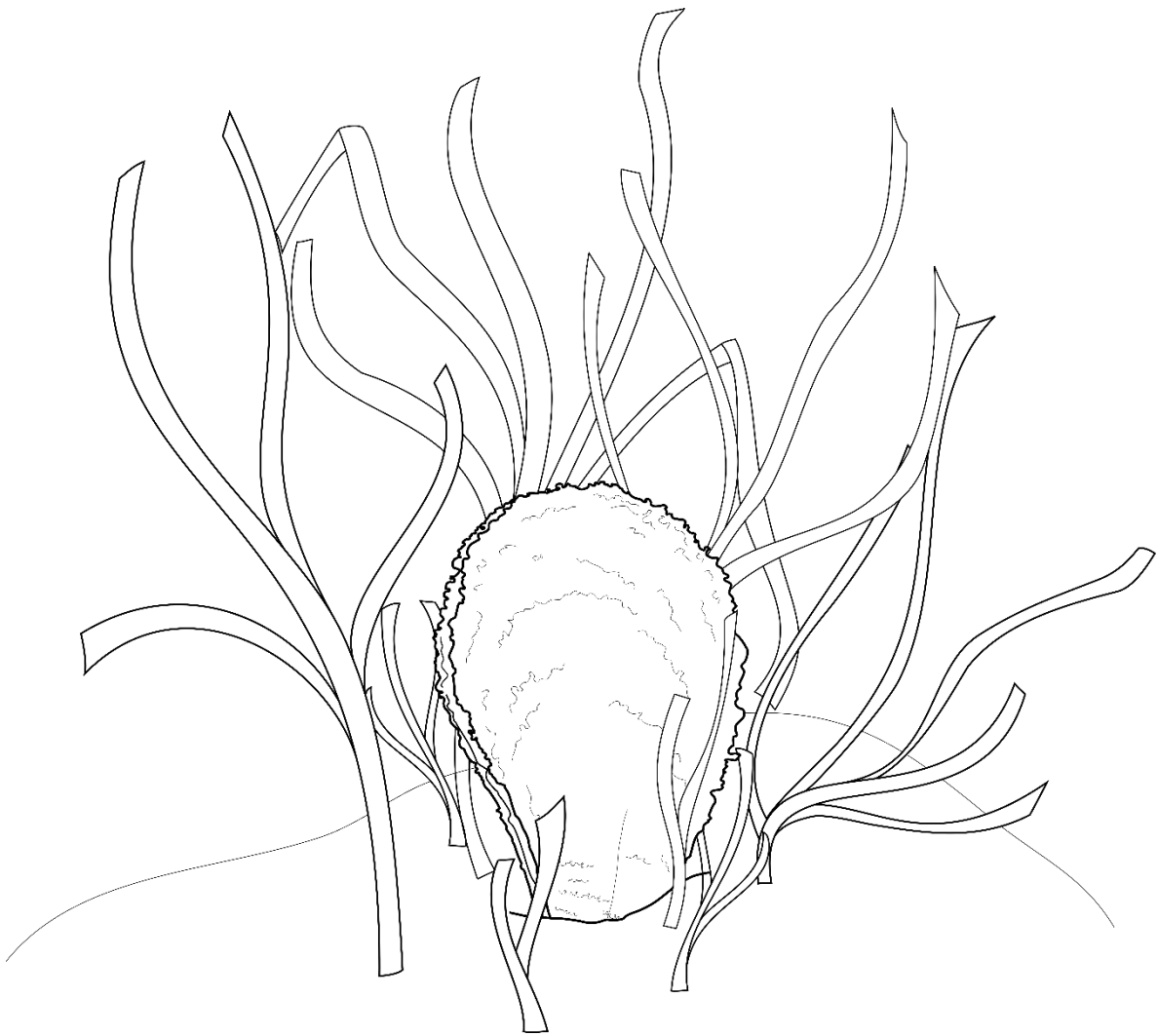
This research was implemented thanks to the financial support of the Region Occitanie, the General Council of Pyrénées-Orientales and the French Ministry for Ecological Transition. We are grateful for the support of the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de

l'Aménagement et du Logement) Occitanie and all of the ports involved in the study: the ports of Sète, Port-la-Nouvelle, Port-Vendres and Frontignan. We also thank the staff from the Cerbère-Banyuls Natural Marine Reserve and the Agathoise Coast Marine Protected Area for their collaboration and permission to work within their protected areas.

Abstract

In the past century, recently emerged infectious diseases have become major drivers of species decline and extinction. The endemic Mediterranean Sea bivalve *Pinna nobilis* is impacted since 2016 by a mass mortality event affecting specimens of all sizes, depth ranges and habitat types, changing the species status at the national level from “Vulnerable” to “Critically Endangered”. This mass mortality, that affects ca. 100% of *P. nobilis* individuals has been reported to be associated to an infection by the haplosporidan parasite *Haplosporidium pinnae*. In this study, we report that few wild *P. nobilis* individuals remain alive in a strongly affected area in Cerbère (France) suggesting a form of resistance to the parasite. As a first step to understand the underlying mechanisms it would be valuable to identify and monitor the gene expression pattern linked to these cases of resistances. We sampled mantle tissue of wild *P. nobilis* individuals considered as resistant as well as individuals considered as susceptible found in coastal areas still non-affected zone. As no transcriptome data is available for this species, we first performed a *de novo* transcriptome assembly and annotated the expressed genes. Comparison of the transcriptomes between resistant and susceptible individuals highlight a specific gene expression signature of the resistant phenotype. We found in particular differential expression of genes involved in immunity and in skin integrity in the resistant *P. nobilis*. These therefore data provide a first hint to understand how some individuals escape the pathogenicity associated with pathogenic infection.

Keywords: *Pinna nobilis*; Comparative transcriptomics; *Haplosporidium pinnae*; Resistance; Mass mortality



Résumé :

Les systèmes marins côtiers sont généralement discontinus et constitués d'une mosaïque de paysages sous-marins différents, créant ainsi des distributions parfois très fragmentées chez les espèces qui les colonisent. Les espèces marines côtières sont donc structurées en réseaux de populations connectées entre elles *via* la dispersion larvaire. Comprendre le fonctionnement et la connectivité entre les populations d'une espèce est indispensable pour adapter les stratégies de conservation. La grande nacre, *Pinna nobilis*, est une espèce endémique de la mer Méditerranée qui fait aujourd'hui face à une crise majeure qui menace sa survie. Depuis Octobre 2016, des mortalités de masse sont signalées sur ses populations, à travers toute la mer Méditerranée, causées par un protozoaire parasite, *Haplosporidium pinnae*. Il s'agit d'un événement sans précédent, que ce soit par le taux de mortalité (près de 100 %) ou la vitesse de propagation, et qui pourrait conduire à l'extinction de l'espèce. En se focalisant sur le littoral Occitan, cette thèse apporte des connaissances sur la biologie et l'écologie de l'espèce mais aussi sur son fonctionnement et les processus qui permettent le maintien de ses populations afin de proposer des priorités de conservation. Ainsi, nous avons mis en évidence la diversité d'habitats colonisés par l'espèce ainsi que l'importance des lagunes car elles abritent près de 90 % des grandes nacres, sur le littoral Occitan, et semblent servir d'habitat refuge à l'espèce en limitant l'infestation par le parasite. A l'aide de marqueurs microsatellites nouvellement développés, nous avons montré une structure génétique très homogène sur toute la côte, ce qui implique un certain niveau de connectivité et laisse penser qu'une grande partie de la diversité génétique de l'espèce reste préservée dans les lagunes. En se focalisant sur la population de la baie de Peyrefite, dans la Réserve Naturelle Marine de Cerbère-Banyuls, et grâce à une analyse de parenté, nous avons apporté des connaissances sur la dynamique démographique et les processus de repeuplement de l'espèce. L'ensemble de cette thèse permet de définir des recommandations qui seront utiles à la mise en place de mesures de conservation adaptées, indispensables pour la survie de l'espèce.

Mots clés : Conservation ; Dispersion larvaire ; Microsatellites ; Structure génétique ; Connectivité

Population genetics of the fan mussel, *Pinna nobilis*, in Occitanie, to identify conservation priorities in a pandemic context.

Abstract:

In marine systems, coastal environments are viewed as discontinuous and made up of a mosaic of diversified seascapes, leading to highly fragmented species distributions. Coastal marine species are thus structured in networks of populations that are connected to each other through larval dispersal. Understanding functioning and connectivity patterns between populations of a given species is essential to adapt conservation strategies. The fan mussel, *Pinna nobilis*, endemic to the Mediterranean Sea, is facing today a major crisis threatening its survival. Starting in October 2016, mass mortalities caused by the protozoan parasite *Haplosporidium pinnae* have been reported through the entire Mediterranean Sea. This is an unprecedented situation for which neither the mortality rates (around 100%) nor the speed of propagation have ever been recorded for a marine species, and it could lead to the potential extinction of *P. nobilis*. By focusing on the Occitan coast, this work provides knowledge on the biology and ecology of the species but also on the processes which allow the replenishment of its populations in order to suggest priorities for conservation. We highlighted the wide diversity of habitats colonized by the species and the importance of lagoons as they shelter 90 % of fan mussels recorded on the Occitan coast, and seem to provide natural refuge as only the lagoon populations remain unaffected by *H. pinnae*. Using newly developed microsatellite markers, we highlighted a very homogeneous genetic structure over the entire coast, which implies some connectivity and suggests that most of the genetic diversity of the species remains preserved in the lagoons. By focusing on the population of Peyrefite Bay, in the Marine Protected Area of Cerbère-Banyuls, through parentage analysis, we provided knowledge on the demographic dynamics and the repopulation processes of the species. Based on the present work, we defined recommendations that will help to design adapted conservation measures that will be essential for the survival of the species.

Keywords: Conservation; Larval dispersal; Microsatellite markers; Genetic structure; Connectivity

