

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM



FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

Laboratoire de physiologie animale appliqué

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en
Sciences de la Mer

Spécialité : Connaissance, Valorisation et Gestion de la Biodiversité Marine Côtière

Thème

**Phylogénie et phylogéographie de quelques espèces
d'holothuries aspidochirotés de la côte algérienne (Ouest et
centre)**

Présenté par : M. MANSOURI Toufik

La composition du jury de soutenance

Nom et Prénom	Grade	Qualité	Appartenance Administrative
LOTMANI Brahim	Pr	Président	Université de Mostaganem
HALBOUCHE Miloud	Pr	Examineur	Université de Mostaganem
BOUDERBALA Mohamed	Pr	Examineur	Université d'Oran
TAIBI Nasr-Eddine	MCA	Examineur	Université de Mostaganem
MEZALI Karim	Pr	Encadreur	Université de Mostaganem

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2014/2015

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu de m'avoir donné le courage, la force et la patience pour accomplir ce travail.

Je n'ai sûrement pas les mots suffisants ni le vocabulaire assez étoffé pour témoigner les vifs remerciements à M. Mezali Karim, mon encadreur, Professeur au département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture de l'Université de Mostaganem. L'ensemble de ce travail n'aurait jamais été possible sans votre soutien. Je ne pourrais oublier l'importante documentation bibliographique que vous m'avez fourni et les connaissances concernant la systématique des holothuries que vous m'avez inculqué. Je ne saurais oublier votre aide précieuse dans la mise en forme et la structuration du document. Vous m'avez accordé votre confiance et vous avez cru en moi. Alors recevez M. Mezali Karim, ici toute ma reconnaissance.

*J'adresse mes plus sincères remerciements à M. **LOTHMANI Brahim**, Vice Doyen chargé de la post graduation et de la Recherche Scientifique de la FSNV et Professeur au Département de Biologie à l'Université de Mostaganem pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de mon mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.*

*Mes sincères remerciements vont également à M. **HALBOUCHE Miloud**, Professeur au Département d'Agronomie de l'Université de Mostaganem pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde gratitude.*

*Je tiens également à remercier très chaleureusement M. **TAIBI Nasr-Eddine**, Maître de conférences "A" au département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'il me soit permis de lui exprimer mes respects les plus profonds et ma reconnaissance pour m'avoir transmis ces connaissances précieuses sur le monde marin.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent aussi à M. **BOUDERBALA Mohamed**, Professeur à l'Université d'Oran pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.*

Remerciements

*Je tiens à remercier d'une façon toute particulière M. **BOUZAZA Zouheir** qui m'a aidé pendant tout ce travail, je le remercie encore pour ses encouragements et pour le temps précieux qu'il m'a consacré toutes les fois que cela était nécessaire.*

J'adresse l'expression de ma profonde reconnaissance à tous les Professeurs et Enseignants qui nous ont tant appris à travers ce Magister et qui se sont dévoués à nous initier au domaine de la recherche scientifique.

Résumé

Dans la présente étude nous avons révisé la systématique de quelques espèces d'holothuries aspidochirotés de la côte algérienne en utilisant une partie de base de données fournie par Mezali (2008). L'étude détaillée des données morphologiques, anatomiques, endosquelettiques et moléculaires, nous a permis : 1) d'identifier quelques individus d'une espèce invasive d'origine Atlantique [*Holothuria (Roweothuria) arguinensis* (Koehler et Vaney, 1906)] déjà signalée par Mezali et Thandar (2014) ; 2) de séparer *Holothuria (Roweothuria) poli* des autres espèces ; 3) de discuter le statut taxonomique d'*Holothuria (Holothuria) stellati* longuement débattue dans la littérature et 4) d'apporter des précisions sur les deux morphotypes d'*Holothuria (Holothuria) tubulosa* (A & B) déjà signalés par Mezali (2008). Notre étude a été basée sur l'examen approfondi de l'endosquelette (sclérites) des holothuries étudiées en utilisant des techniques de géométrie morphologiques modernes ainsi que plusieurs méthodes statistiques et bioinformatiques. *Holothuria (H.) tubulosa* B dont les caractéristiques morphologiques, anatomiques, endosquelettiques et moléculaires sont totalement différents d'*Holothuria (H.) tubulosa* classique (noté A) déjà décrite par Koehler (1921). Les méthodes statistiques utilisées (classification ascendante hiérarchique et l'analyse canonique) nous ont permis de valider ce résultat. En effet, l'analyse canonique a montré des différences nettes et hautement significatives entre les deux morphotypes d'*Holothuria (H.) tubulosa* (A et B). Ce dernier résultat corrobore avec celui de l'analyse moléculaire et confirme qu'il s'agit de deux espèces cryptiques bien différentes. Une analyse phylogéographique a été abordée en utilisant quelques séquences d'ADN disponible dans Genbank et BOLD.

Mots clés : Holothuries aspidochirotés, Sclérites, Espèces cryptiques, Classification, phylogéographie, Analyse canonique.

A b s t r a c t

In this study, we have revised the systematics of some aspidochirote holothurians of the Algerian coast, using a part of a database provided by Mezali (2008). The detailed study of the morphological, anatomical, molecular and endoskeletal data, allowed us to: 1) identify a few individuals of an invasive species of Atlantic origin [*Holothuria (Roweothuria) arguinensis* (Koehler et Vaney, 1906)], already signaled by Mezali et Thandar (2014) ; 2) separate *Holothuria (Roweothuria) poli* of other species ; 3) discuss the taxonomic status of *Holothuria (Holothuria) stellati*, extensively debated for a long time in the literature and 4) give some precision on the two morphotypes of *Holothuria (Holothuria) tubulosa* (A & B) previously reported by Mezali (2008). Our study was based on a thorough review of the endoskeleton (ossicles) of sea cucumbers, studied using modern morphological geometry technics and several statistics and bioinformatics methods. *Holothuria (Holothuria) tubulosa* B whose morphological, anatomical, endoskeletal and molecular characteristics are totally different from the classic *Holothuria (H.) tubulosa* (rated A) already described by Koehler (1921). The statistical methods (hierarchical clustering and canonical analysis) allowed us to validate this result. Indeed, the canonical analysis showed highly significant and distinct differences between the two morphotypes of *Holothuria (H.) tubulosa* (A and B). This previous result corroborates with that of the molecular analysis and confirms that those two cryptic species are well different. A phylogeographic analysis was tackled using some DNA sequences available in GenBank and Bold.

Key words: Aspidochirote holothurians, Ossicles, Cryptic species, Classification, Phylogeography, Canonical analysis

في هذه الدراسة، قمنا بمراجعة تصنيف بعض من أصناف خيار البحر الأسبيدوكيروتيدي (*aspidochirote*) للساحل الجزائري باستعمال جزء من قاعدة البيانات المقدمة من (Mezali (2008). الدراسة التفصيلية للمعطيات المورفولوجية، التشريحية، الداخل هيكلية والجزئية، سمحت لنا بـ: (1) تحديد بعض الأفراد من الأصناف الغازية من المحيط الأطلسي [*Holothuria (R.) arguinensis* ; Koehler et Vaney (1906)] ، هذا الصنف سبق وأن تمت الإشارة لوجوده من طرف (Mezali et Thandar (2014). (2) فصل *Holothuria (R.) poli* من الأنواع الأخرى. (3) مناقشة الوضعية التصنيفية لـ *Holothuria (H.) stellati* التي تم مناقشتها على نطاق واسع من قبل العلماء. (4) إضافة بعض الدقة حول morphotypes من *Holthuria (Holothuria)* [*tubulosa* A & B] المذكورة سابقا من قبل (Mezali (2008). استندت دراستنا على استعراض شامل للهيكل الداخلي (العظيمات) من خيار البحر المدروس باستخدام تقنيات الهندسة المورفولوجية الحديثة والعديد من الطرق الإحصائية و البيولوجيا المعلوماتية. *Holothuria (H.) tubulosa* B الذي له خصائص مورفولوجية، تشريحية، داخل هيكلية وجزئية مختلفة تماما عن *Holothuria (H.) tubulosa* (A) الكلاسيكية والتي سبق وصفها من طرف (Koehler (1921). الأساليب الإحصائية (المجموعات الهرمية والتحليل الكانونيكي) سمحت لنا من التحقق من صحة هذه النتيجة . في الواقع، أظهر التحليل الكانونيكي فروقات عالية وذات دلالات إحصائية قوية ما بين morphotypes الاثنين من *Holothuria (Holothuria) tubulosa* A & B. هذه النتيجة الأخيرة تتوافق مع التحليل الجزئي وتؤكد بأنهما صنفين مختلفين مشفرين (يصعب التفريق بينهما). تناولنا أيضا دراسة للتوزع الجغرافي باستعمال بعض سلاسل الحمض النووي في بنك الجينات (Genbank) و Bold.

الكلمات المفتاحية: خيار البحر الأسبيدوكيروتيدي (*aspidochirote*) ، العظيمات، اصناف مشفرة، التصنيف، التوزع الجغرافي، التحليل الكانونيكي.

Liste des figures

Figure 1 : Principes et séquence de différents modes de spéciation (Macé, 2009 ; modifiée par Mansouri)	5
Figure 2 : Modèles de dispersion en populations géographiquement subdivisées. Les taux de migration sont proportionnels à l'épaisseur des flèches (Plouviez, 2009).	10
Figure 3 : Variations de la force de l'isolement par la distance avec la capacité de dispersion larvaire moyenne (en nombre de sites atteints par génération, la distance entre sites étant constante) adaptée de (Palumbi, 2003, <i>In</i> Plouviez, 2009).	11
Figure 4 : Différents types de métapopulation, D'après [Harrison et Hastings, 1996, <i>In</i> Plouviez, 2009].	12
Figure 5 : Carte de la Mer Méditerranée ainsi que ses sous bassins (Bozec, 2006).	14
Figure 6 : Schéma illustrant les bilans de chaleur, de volume et de sel en Méditerranée (Myers et Haines, 2002; modifiée).	15
Figure 7 : Schéma de la circulation thermohaline de la Mer Méditerranée montrant la branche principale zonale formant les eaux intermédiaires et les branches secondaires méridiennes formant les eaux profondes (Lascaratos <i>et al.</i> , 1999 ; modifiée par Mansouri).	16
Figure 8 : Circulation de surface du bassin Ouest Méditerranéen (Millot, 1999 ; modifiée par Mansouri).	18
Figure 9 : Circulation à 200m du bassin Ouest Méditerranéen (Millot, 1999 ; modifiée par Mansouri).	18
Figure 10 : Schéma de la circulation de surface du bassin Est proposé par (Hamad <i>et al.</i> , 2005 ; modifiée par Mansouri).	19
Figure 11 : Schéma de la circulation de surface du bassin Méditerranéen décrit par Pinardi et Masetti (2000) suite aux observations des campagnes (POEM 2005) (Modifiée par Mansouri).	20
Figure 12 : Cladogramme, illustrant la classification des classes d'échinodermes (Janies, 2001).	22
Figure 13 : Anatomie externe d'une holothurie aspidochirote (Samyn <i>et al.</i> , 2006).	24
Figure 14 : Anatomie interne d'une holothurie aspidochirote montrant les principaux organes (<i>In</i> Samyn <i>et al.</i> , 2006).	25
Figure 15 : <i>Holothuria (P.) forskali</i> projetant ses tubes de Cuvier. Photo prise en Italie par Roberto Pillon Mai, 2011.	26
Figure 16 : Les différentes formes de tentacules des holothuries (Pawson, 2010).	27
Figure 17 : Les corpuscules turriformes (Samyn <i>et al.</i> , 2006).	33
Figure 18 : Les boucles (Samyn <i>et al.</i> , 2006).	34
Figure 19 : Les plaques perforées (Samyn <i>et al.</i> , 2006).	35
Figure 20 : Les bâtonnets de l'espèce <i>Holothuria (H.) mammata</i> (Zavodnik, 2003).	35
Figure 21 : Les différentes étapes dans la préparation des spicules (<i>In</i> Samyn <i>et al.</i> , 2006). ..	37
Figure 22 : Reproduction sexuée chez <i>H. tubulosa</i> (Bertoncini <i>et al.</i> , 2008).	39
Figure 23 : Différents stades larvaires chez <i>H. (H.) scabra</i> (Agudo, 2007).	40
Figure 24 : Individus <i>Holothuria (F.) hilla</i> après scission (Lee <i>et al.</i> , 2008).	40
Figure 25 : Préparation d'holothuries (Samyn <i>et al.</i> , 2006).	42
Figure 26 : Aquaculture des holothuries ; Nutrition des géniteurs de <i>Holothuria (H.) Scabra</i> (Agudo, 2007).	44

Figure 27 : Localisation des 3 stations de la partie centrale de la côte Algérienne (Google earth modifiée par Mansouri).	48
Figure 28 : Localisation de la station de Stidia (Mansouri, 2015).	49
Figure 29 : Images des sclérites d'un individu de <i>H. (R.) poli</i> observé au microscope photonique grossissement 20 (avec l'échelle) (Mezali, 2008).	50
Figure 30 : Exemple d'une classification ascendante hiérarchique.	55
Figure 31 : Exemple d'agglomération progressive de 5 points.....	57
Figure 32 : Exemple de réseau d'haplotypes (Muths, 2006).....	63
Figure 33 : Morphologie externe d'un individu de <i>Holothuria (H.) tubulosa</i> appartenant au groupe A (individu de la station de Stidia) (Mezali, 2008 ; modifiée par Mansouri)	67
Figure 34 : Morphologie externe d'un individu de <i>Holothuria (H.) tubulosa</i> appartenant au groupe B (Mezali, 2008)	68
Figure 35 : Morphologie externe d'un individu de <i>Holothuria (Holothuria) stellati</i> (Mezali, 2008).....	69
Figure 36 : Morphologie externe d'un individu de <i>Holothuria (Roweothuria) poli</i> (Mezali, 2008 ; modifiée par Mansouri).	70
Figure 37 : Sclérites de la face dorsale de <i>H. (H) tubulosa A</i>	72
Figure 38 : Sclérites de la face ventrale de <i>H. (H) tubulosa A</i>	73
Figure 39 : Sclérites des podia (C) et tentacules (D) de <i>H. (H) tubulosa B</i>	74
Figure 40 : Sclérites de la face dorsale de <i>H. (H) tubulosa B</i>	76
Figure 41 : Sclérites de la face ventrale de <i>H. (H) tubulosa B</i>	77
Figure 42 : Sclérites des podia (C) et tentacules (D) de <i>H. (H) tubulosa B</i>	78
Figure 43 : Sclérites de la face dorsale de <i>H. (H) stellati</i>	80
Figure 44 : Sclérites de la face ventrale de <i>H. (H) stellati</i>	81
Figure 45 : Sclérites des podia (C) et tentacules (D) de <i>H. (H.) stellati</i>	82
Figure 46 : Sclérites de la face dorsale de <i>H. (R) poli</i>	84
Figure 47 : Sclérites de la face ventrale de <i>H. (R.) poli</i>	85
Figure 48 : Sclérites des podia (C) et des tentacules de <i>H. (R.) poli</i>	86
Figure 49 : Dendrogramme représentant la distance entre les groupes d'espèces par analyse clustering des sclérites (carré de la distance euclidienne, méthode de Ward).	90
Figure 50 : Deuxième fonction canonique en fonction de la première fonction canonique. Nuage de points des composantes canonique de <i>H. (H.) stellati</i> , <i>H. (H.) tubulosa A</i> , <i>H. (R) poli</i> , <i>H. (H.) tubulosa B</i>	93
Figure 51 : (A) : Valeurs moyennes de la variable forme allongée des boucles de la face ventrale des deux espèces : <i>H. (H.) tubulosa B</i> & <i>H. (H.) tubulosa A</i> . (B) : Valeurs moyennes de la variable longueur des boucles de la face dorsale pour les mêmes espèces.	94
Figure 52 : Arbre phylogénétique établi pour les quatre espèces d'holothuries aspidochirotes étudiées par la méthode de Maximum vraisemblance (100 replicat bootstraps).	97
Figure 53 : Réseaux d'haplotypes représentant les relations minimales entre les différents haplotypes des quatre espèces d'holothuries séquencées.	100
Figure 54 : Arbre phylogénétique établi par la méthode « ML » représentant les espèces de <i>H. (R.) arguinensis</i> étudiées avec les individus de <i>H. (R.) arguinensis</i> tirées de Genbank.	103
Figure 55 : (A) : Position géographique des Iles Canaries et de la station d'Algarve (Portugal) (Google earth, modifiée par Mansouri). (B) : Réseau d'haplotypes représentant les relations	

minimales entre les différents haplotypes de l'espèce exotique *H. (R.) arguinensis* étudiée et comparées aux données tirées de Genbank avec les stations des échantillons. 105

Liste des tableaux

Tableau 1 : Systématique des holothuries Aspidochirotés.	23
Tableau 2 : Famille des Holothuroiidae (Samyn <i>et al.</i> , 2005 ; 2006 ; O’Loughlin <i>et al.</i> , 2007).	28
Tableau 3 : Composition chimique des sclérites d’ <i>Holothuria Impasiens (forskali)</i> d’après Hampton (1958).	32
Tableau 4 : Différents types de mesures effectuées sur les sclérites des holothuries étudiées.	52
Tableau 5 : Effectifs d’individus pour chaque espèce et/ou populations d’holothuries aspidochirotés échantillonnés dans les stations étudiées.	65
Tableau 6 : Valeurs moyennes des mesures effectuées sur les sclérites de la face dorsale pour les espèces étudiées : <i>Holothuria (H.) stellati</i> , <i>Holothuria (H.) tubulosa A</i> , <i>Holothuria (H.) tubulosa B</i> et <i>Holothuria (R.) poli</i>	88
Tableau 7 : Valeurs moyennes des mesures effectuées sur les sclérites de la face ventrale pour espèces étudiées : <i>Holothuria (H.) stellati</i> , <i>Holothuria (H.) tubulosa A</i> , <i>Holothuria (H.) tubulosa B</i> , <i>Holothuria (R.) poli</i>	89
Tableau 8 : Analyse discriminante pas-à-pas ascendante réalisée à partir des mesures sur les sclérites (boucles et tourelles) de <i>Holothuria (H.) tubulosa A</i> , <i>Holothuria (H.) stellati</i> , <i>Holothuria (R.) poli</i> et <i>Holothuria (H.) tubulosa B</i>	91
Tableau 9 : Synthèse analyse pas-à-pas ascendante réalisée à partir des mesures sur les sclérites (boucles et tourelles) de <i>Holothuria (H.) tubulosa A</i> , <i>Holothuria (H.) stellati</i> , <i>Holothuria (R.) poli</i> et <i>Holothuria (H.) tubulosa B</i>	91
Tableau 10 : Coefficients standardisés des fonctions discriminantes canoniques.	92
Tableau 11 : Matrice de structure factorielle, Corrélations entre variables et fonctions linéaires discriminantes.	93
Tableau 12 : Moyennes des Variables Canonique (Fonctions aux barycentres des groupes).	93
Tableau 13 : Abréviations des espèces d’holothuries étudiées (les séquences d’ADN).	95
Tableau 14 : Diversité génétique pour l’ensemble des espèces d’holothuries.	98
Tableau 15 : Test de McDonald et Kreitman (1991) entre les différentes populations d’holothuries.	98

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre 01 : Synthèse Bibliographiques

I. Quelques notions d'écologie.....	3
I.1. Concept de l'espèce.....	3
I.2. Population et niche écologique.....	3
I.3. Différents modes de spéciation.....	4
I.3.1. Spéciation péripatrique.....	4
I.3.2. Spéciation parapatrique.....	4
I.3.3. Spéciation sympatrique.....	4
I.3.4. Spéciation allopatrique.....	4
I.4. Biogéographie et phylogéographie.....	5
I.5. Modèles de dispersion en populations géographiquement subdivisées.....	8
I.5.1. Modèle en îles.....	8
I.5.2. Modèle en pas japonais.....	8
I.5.3. Modèle d'isolement par la distance.....	8
I.5.4. Modèle avec matrice de migration libre.....	9
II. Mer Méditerranée comme zone d'étude.....	12
II.1. Circulation de la Mer Méditerranée.....	15
II.1.1. Circulation du Bassin Ouest Méditerranéen.....	17
II.1.2. Circulation du Bassin Est Méditerranéen.....	18
III. Aperçu sur les échinodermes et les espèces étudiées.....	21
III.1. Echinodermes.....	21
III.1.1. Relation phylogénétique.....	21
III.2. "Concombres de mer" ou holothuries (cas des Aspidochirotés).....	23
III.2.1. Systématique.....	23
III.2.2. Généralités sur les holothuries.....	23
III.2.3. Identification des holothuries aspidochirotés.....	25
III.2.4. Ordre des aspidochirotida.....	26
III.2.5. Famille des Holothuroiidae (Holothuroidea : Aspidochirotida).....	28
III.2.5.1. Diagnose.....	28
III.2.5.2. Genre <i>Holothuria</i> Linnaeus (1767).....	29
III.2.5.2.1. Diagnose.....	29

III.2.5.3. Sous-genre de <i>Holothuria</i> (Rowe, 1969)	30
III.2.5.4. Sous-genre <i>Lessnothuria</i> (Deichmann, 1958).....	30
IV. Endosquelette (sclérites)	31
IV.1. Composition chimiques des sclérites	31
IV.2. Sclérites des holothuries aspidochirotes	32
IV.2.1. Corpuscules turriformes	33
IV.2.2. Boucles.....	33
IV.2.2.1. Ellipsoïde fenestré et Pseudo-bouton	34
IV.2.3. Plaques perforées	34
IV.2.3.1. Plaque terminale.....	34
IV.2.4. Bâtonnets.....	35
IV.3. Préparation des spicules	36
IV.3.1. Pour la microscopie photonique.....	36
IV.3.2. Pour la microscopie électronique	37
V. Ecologie.....	38
V.1. <i>Holothuria (Holothuria) tubulosa</i>	38
V.2. <i>Holothuria (Roweothuria) poli</i>	38
V.3. <i>Holothuria (Holothuria) stellati</i>	38
V.4. <i>Holothuria (Roweothuria) arguinensis</i>	38
V.4. Reproduction et cycle de vie	39
VI. Valeur économique des holothuries	41
VI.1. Pêche et commercialisation (Bêche-de-mer)	41
VI.2. Valeur pharmaceutique	42
VI.3. Aquaculture.....	43

Chapitre 02 : Matériel et Méthodes

I. Objectifs de l'étude	45
I.1. Étude de l'endosquelette (sclérites)	45
I.2. Étude des séquences d'ADN.....	46
II. Présentation des sites d'étude	47
II.1. Description de stations étudiées	47
II.1.1. Station de Sidi-Fredj.....	47

II.1.2. Station de Tamantefoust	47
II.1.3. Station de Figuier-plage.....	48
II.1.4. Station de Stidia.....	49
III. Base de données	50
III.1. Données endosqueletique	50
III.2. Analyse des images	50
III.2.1. Méthode ancienne.....	50
III.2.2. Nouvelle méthode.....	51
III.2.3. Mesures adoptées (les variables)	51
III.3. Analyse statistiques des données morphologique (sclérites)	53
III.3.1. Calcul de la moyenne arithmétique	53
III.3.2. Calcul de la variance et de l'écart-type	53
III.3.3. Classification automatique	54
III.3.3.1. Clustering	54
III.3.3.2. Classification hiérarchique	54
III.3.3.3. Classification ascendante hiérarchique (CAH)	55
III.3.3.3.1. Avantages du CAH.....	56
III.3.3.3.2. Définition du critère de distance	57
III.3.3.3.3. Méthode de Ward	57
III.3.4. Analyse discriminante	57
III.3.4.1. Analyse pas-à-pas ascendante	58
III.3.4.1.1. Test de pouvoir discriminant.....	58
III.3.5. Analyse canonique	59
III.3.5.1. Définition	59
III.3.5.2. Analyse canonique discriminante (Analyse factorielle discriminante).....	59
III.3.5.2.1. Description et but	59
III.4. Données d'ADN.....	60
III.4.1. Choix des marqueurs moléculaires	60
III.4.2. Nettoyage et alignement.....	60
III.4.3. Alignement	61
III.4.4. Étude phylogénétique	61
III.4.4.1. Modèles d'évolution.....	61
III.4.4.1.1. Modèle de Kimura à 2 paramètres	62

III.4.5. Étude phylogéographique.....	62
---------------------------------------	----

Chapitre 03 : Résultats et Discussions

I. Taxinomie et identification des espèces étudiées	65
I.1. Descriptions morphologiques et anatomiques des espèces d'holothuries révisées.	66
I.1.1. <i>Holothuria (Holothuria) tubulosa</i> groupe A.....	66
I.1.2. <i>Holothuria (Holothuria) tubulosa</i> B.....	67
I.1.3. <i>Holothuria (Holothuria) stellati</i>	69
I.1.4. <i>Holothuria (Roweothuria) poli</i>	70
I.2. Résultats des descriptions de l'endosquelette (sclérites) des espèces d'holothuries révisées	71
I.2.1. Sclérites de <i>Holothuria (Holothuria) tubulosa</i> A	71
I.2.1.1. Corpuscules turriformes.....	71
I.2.1.2. Boucles.....	71
I.2.1.3. Pédicelles de la face ventrale (podia).....	71
I.2.1.4. Bâtonnets des tentacules	73
I.2.2. Sclérites de <i>Holothuria (Holothuria) tubulosa</i> B	75
I.2.2.1. Corpuscules turriformes.....	75
I.2.2.2. Boucles.....	75
I.2.2.3. Pédicelles de la face ventrale (Podia)	77
I.2.2.4. Bâtonnets des tentacules	77
I.2.3. Sclérites de <i>Holothuria (Holothuria) Stellati</i>	79
I.2.3.1. Corpuscules turriformes.....	79
I.2.3.2. Boucles.....	79
I.2.3.3. Pédicelles ventraux	81
I.2.3.4. Bâtonnets des tentacules	81
I.2.4. Sclérites de <i>Holothuria (Roweothuria) poli</i>	83
I.2.4.1. Corpuscules turriformes.....	83
I.2.4.2. Boucles.....	83
I.2.4.3. Pédicelles ventraux	85
I.2.3.4. Bâtonnets des tentacules	85
I.3. Résultats des mensurations effectuées sur les sclérites des holothuries étudiées	87
I.3.1. Analyse cluster.....	87

Sommaire

I.3.2. Analyse discriminante.....	90
I.3.2.1. Interprétation de l'analyse discriminante pas-à-pas ascendante	92
I.3.3. Analyse canonique	92
I.3.3.1. Interprétation des résultats de l'analyse canonique.....	94
II. Phylogénie et phylogéographie des espèces d'holothuries étudiées	95
II.1. Comparaison des données de séquences d'ADN fournis avec ceux du Genbank.....	95
II.2. Arbre phylogénétique des espèces d'holothuries étudiées	96
II.3. Tests moléculaires et l'étude phylogéographique par les haplotypes.....	98
II.3.1. Test de McDonald et Kreitman	98
II.3.2. Phylogéographie	99
II.3.2.1. Discussion de la phylogéographie des différentes espèces d'holothuries	99
III. Discussion générale.....	101
IV. Discussion de la phylogéographie de l'espèce <i>H. (R.) arguinensis</i>	102
Conclusion.....	106
Référence bibliographique.....	109

Annexes

Introduction

Introduction

Les holothuries, communément appelées « concombres de mer », sont des invertébrés marins du groupe des échinodermes ; elles coexistent avec les étoiles de mer et les oursins. On dénombre plus de 1400 d'espèces d'holothuries; elles s'observent dans tous les océans, de la zone littorale aux profondeurs les plus extrêmes (Kerr et *al.*, 2001). Elles sont généralement benthiques à l'exception de certaines Elapipodes pélagiques. Bien que certaines espèces se trouvent sur les substrats durs (roches, anfractuosités, récifs coralliens) ou en épibioses sur des phanérogames ou des invertébrés marins, elles sont surtout caractéristiques des fonds meubles, pouvant vivre soit à leur surface, soit, de manière temporaire ou permanente, dans le sédiment. La répartition des différents groupes dans les zones littorales est marquée par la prédominance des espèces appartenant à l'ordre des aspidochirotés dans les zones intertropicales ainsi des dendrochirotés aux latitudes tempérées et élevées (Conand, 1989; 1994).

Elles sont très diversifiées dans les récifs coralliens et les biotopes qui leurs sont associés (lagons, herbiers à phanérogames marines) mais elles sont également très abondantes dans les abysses où elles constituent plus de 90% de la biomasse totale (Pawson, 1970; Belyaev, 1972; Hendler et *al.*, 1995; Hadel et *al.*, 1999).

Les holothuries font partie des principaux bioturbateurs de sédiments (Uthicke, 2001) : elles sont aux sédiments marins ce que les « vers de terre » sont aux terres émergées. La plupart des holothuries sont des détritivores: elles ingèrent le substrat et en retirent les éléments nécessaires à leur croissance (matière organique) (Uthick, 1999). Cela empêche l'accumulation de matières organiques et peut aider à contrôler les agents pathogènes. Certaines holothuries s'enfouissent dans les substrats meubles et, par ce comportement, elles permettent aussi l'oxygénation des couches sédimentaires profondes qui sont plus réduites¹.

Le rôle écologique de ces espèces est largement bien maîtrisé par les scientifiques mais la taxonomie de plusieurs groupes d'holothuries est encore balbutiante, et, au cours des dix dernières années, certaines espèces ont été redéfinies². La description de ces espèces est fondée essentiellement sur leur endosquelette formé essentiellement de sclérites calcaires microscopiques, dispersées dans les différentes parties de leurs corps. Cependant, ces sclérites peuvent montrer des variations considérables, rarement considérées dans les descriptions récentes. La forme des sclérites au niveau de la face dorsale et ventrale, les pieds ambulacraires et les ten-

¹ <http://www.polyaquaculture.mg/index.php> (24/09/2013)

² *La bêche-de-mer - Bulletin de la CPS n°27 - Juin 2008*

taicules sont traditionnellement rapportés (Mezali, 2008). Depuis les travaux de Semper (1868), il y a une prépondérance des études écologiques, plutôt que des révisions taxonomiques de ces espèces.

Les holothuries sont relativement bien connues aujourd'hui sur le plan anatomique (Feral et Massin, 1982). Les holothuries méditerranéennes ont été décrites par pas mal d'auteurs dont les plus appropriés sont les travaux réalisés par Koehler (1921), Tortonese (1965) et Rowe (1969). Par contre, les approches de systématique moléculaire et de phylogénétique viennent de commencer avec les travaux de Kerr et Kim (2001), Kerr *et al.* (2005), Samyn *et al.* (2005), et Borrero *et al.* (2009; 2010). Le biotope particulier et leur tendance cryptique font qu'elles sont particulièrement difficiles à échantillonner, limitant ainsi les possibilités d'étude de leur abondance, distribution et répartition (Mezali, 2008).

En Algérie, les études portant sur la phylogénie et la phylogéographie dans le milieu marin sont rare voire anecdotiques. Jusqu'à ce jour, nous signalons : 1) l'étude préliminaire de Mezali (2007) sur la phylogénie d'un gastéropode marin *Patella ferruginea*; 2) l'étude détaillée de Mezali (2008) sur la phylogénie des holothuries aspidochiotes de la côte algérienne et 3) ceux de Bouzaza et Mezali (2011) et Bouzaza (2012) consacrées à la contribution phylogénétique de quelques invertébrés benthiques de la côte algérienne.

Les travaux présentés dans ce mémoire consistent en la révision systématique des holothuries aspidochiotes méditerranéennes (notamment les holothuries d'une partie de la côte algérienne). Pour réaliser cette révision nous avons utilisé une partie des données déjà obtenues par Mezali (2008)

Notre étude a été abordée selon deux axes principaux : le premier axe concerne l'étude et la caractérisation morphologique de l'endosquelette (sclérites) et le deuxième axe concerne l'étude de séquences d'ADN des holothuries en vue d'une étude phylogénétique et phylogéographique (la construction d'arbres phylogénétiques et de réseaux d'aplotypes). Nous avons renforcé notre base de données en utilisant des données d'ADN sur les mêmes espèces d'holothuries des autres sites de la région Méditerranéenne retrouvé sur le net (Logiciel Bold³ et Genbank⁴) et ceci pour mieux cerner l'étude phylogénétique et phylogéographique. A travers cette étude nous sommes familiarisés aux logiciels couramment utilisés en bioinformatique.

³ www.boldsystems.org

⁴ www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Chapitre 01 :
Synthèse Bibliographique

I. Quelques notions d'écologie

I.1. Concept de l'espèce

L'espèce est une notion difficile à appréhender et relativement fluctuante selon qu'on se réfère à un groupe d'êtres vivants ou à un autre. Comme toute création de l'esprit en vue d'interpréter la nature, elle est un calque de la culture de son créateur. On peut considérer dans une première approche qu'il s'agit de l'unité fondamentale du vivant.

Il existe plusieurs définitions de l'espèce. Sur un plan biologique au sens large (dynamique), la plus communément admise est la définition d'Ernst Mayr (1942) « un groupe de populations naturelles réellement ou potentiellement interfécondes, isolé de tout autre groupement analogue » Ainsi, on peut considérer qu'un postulat majeur de la notion d'espèce est l'isolement reproductif, c'est à dire l'isolement né des barrières qui vont s'opposer à ce que des êtres vivants appartenant à des groupes différents puissent engendrer une progéniture viable et féconde. De cette notion de groupe différent naît l'aspect circulaire de la réflexion autour de l'espèce : la présence de l'isolement reproductif est évaluée à partir de la définition de groupes mais les groupes sont eux-mêmes définis par cette barrière.

Les barrières peuvent être prézygotiques ou postzygotiques. Les premières seront d'ordre comportementales (parades par exemple), physiologiques (modes de copulation,) ou morphologiques (aspect) alors que les secondes empêcheront l'œuf de devenir adulte (incompatibilité fœto-maternelle chez les Vivipares). On peut aisément se rendre compte que l'espèce ne revêt pas du tout la même signification selon qu'on songe à un Procaryote, où les flux de gènes horizontaux sont monnaie courante, ou à un Mammifère chez qui ces transferts ne peuvent avoir lieu que par l'intermédiaire de virus et dans une bien moins grande mesure (Macé, 2009).

I.2. Population et niche écologique

Avec les mêmes précautions que précédemment à propos de l'espèce, on peut dire qu'une population est un groupe d'individus partageant un même site où ils exploitent une même ressource et/ou s'y reproduisent entre eux. Par ailleurs, La niche écologique est décrite comme l'ensemble des conditions de l'environnement qui permettent à une espèce de former des populations viables (Macé, 2009).

I.3. Différents modes de spéciation

On considère schématiquement que la spéciation peut survenir selon quatre modes principaux (Fig.1)

I.3.1. Spéciation péripatrique

Au cours de laquelle de petits isolats en périphérie de distribution voient leurs échanges limités avec la population-mère. Ce type de spéciation est lié à l'effet fondateur et la dérive génétique et on l'observe tout particulièrement lors de goulets d'étranglement (Fig. 1).

I.3.2. Spéciation parapatrique

Deux populations divergent mais il existe une zone hybride (Macé, 2009). Cependant, le « fitness⁵ » réduit des hybrides diminuerait peu à peu le flux de gènes jusqu'à la spéciation définitive (Fig. 1).

I.3.3. Spéciation sympatrique

Se produit lorsque qu'il y a divergence au sein d'un même habitat. L'exemple le plus communément cité est la spécialisation des insectes en fonction de la plante hôte (Salzburger *et al.*, 2005 ; Snoeks et Carvalho, 2004, *In* Macé, 2009). Les mécanismes invoqués pour cette spéciation sont la polyploïdisation et la formation d'hybrides (Fig. 1).

I.3.4. Spéciation allopatrique

L'allopatrie est un terme biogéographique qui désigne des organismes dont les répartitions sont entièrement disjointes (Macé, 2009). Si ces organismes sont des espèces-sœurs, cette distribution est généralement le fruit d'une spéciation dite allopatrique (Fig. 1).

La spéciation allopatrique, aussi connue sous le nom de spéciation géographique, naît de l'existence (préalable ou a posteriori) d'une barrière extrinsèque (vicariance) et aboutit à des populations puis à des espèces plus ou moins non interfécondes. L'exemple le plus popularisé de ce type de spéciation est celui des Pinsons des Galápagos. Elle peut ainsi survenir lorsqu'une espèce est subdivisée en deux grandes populations par exemple par un événement géologique (tectonique, ou autre) ou lorsqu'un petit groupe d'individus colonise un nouvel habitat à la périphérie de l'aire de répartition de l'espèce. Dans le premier cas, en raison de la plus

⁵ On définit le Fitness ou "valeur sélective" ou "succès reproducteur" - comme une mesure de la capacité d'un génotype à se reproduire, en comparaison avec les autres génotypes. Il montre donc à quel point un génotype est favorisé par la sélection (Felsenstein, 2004a).

grande force des phénomènes sélectifs dans les grandes populations, l'évolution des génomes aboutissant à l'isolement reproductif s'opère par le biais des phénomènes adaptatifs. En revanche, cette évolution est moins bien comprise dans le cas d'une spéciation péripatrique qui pourrait s'opérer par le biais de la dérive génétique. Cependant, des cas de figure intermédiaires entre ces deux situations extrêmes semblent s'observer sur le terrain, comme l'isolement ou la fragmentation (Macé, 2009).

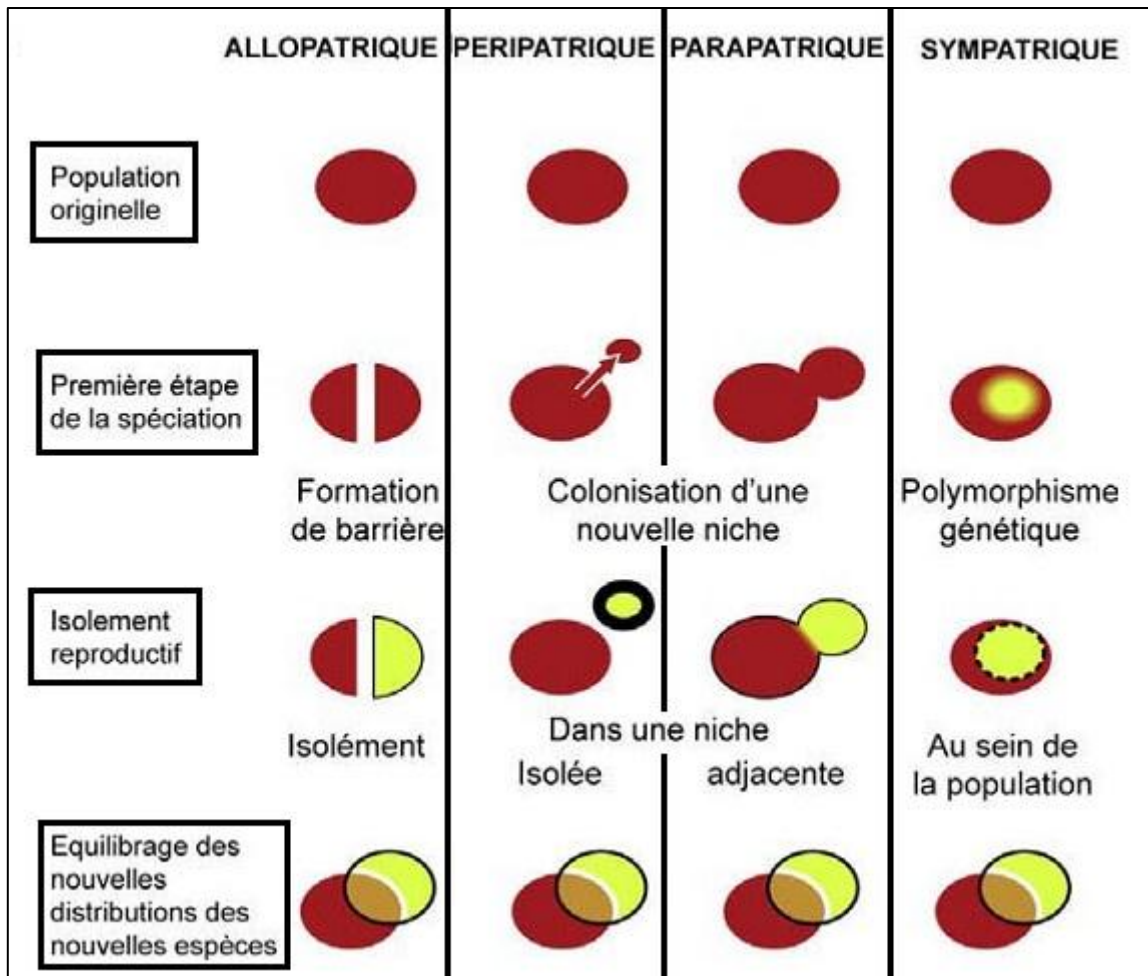


Figure 1 : Principes et séquence de différents modes de spéciation (Macé, 2009 ; modifiée par Mansouri)

I.4. Biogéographie et phylogéographie

Subdiviser le monde vivant en multiples unités taxonomiques a permis aux scientifiques de mieux en appréhender sa diversité. Dès lors, des patrons communs de distribution géographique ont pu être mis en évidence entre taxons, posant ainsi la question des raisons historiques ayant conduit à cette répartition particulière. Repérer ces distributions communes à l'échelle des peuplements et identifier les processus historiques, environnementaux et biolo-

giques, qui les ont façonnées, tel est l'objectif de la biogéographie (Myers et Giller, 1988, *In* Plouviez, 2009).

L'étude des compositions faunistiques et floristiques a déjà permis l'identification de nombreuses provinces biogéographiques, aussi bien en milieu terrestre (Cox, 2001, *In* Plouviez, 2009) qu'en milieu aquatique. Si les barrières biogéographiques terrestres sont, du moins au premier abord, souvent relativement faciles à établir (correspondant à la séparation des continents par les océans ou à l'existence de montagnes ou de déserts), l'interconnexion des océans ainsi que la difficulté d'accessibilité de ce milieu rend plus complexe la visualisation de barrières à la dispersion et donc la définition de provinces biogéographiques marines.

L'adaptation des organismes à un environnement donné est également à prendre en considération lors de la définition de provinces biogéographiques, rendant la tâche relativement complexe. La profondeur des océans peut ainsi jouer un rôle fondamental dans l'étude de la biogéographie en limitant l'impact des changements climatiques sur la distribution des espèces (Cox et Moore 2000, *In* Plouviez, 2009). En effet, en cas de changement de température, par exemple, les espèces peuvent atteindre leur « *preferendum* » thermique par migration latitudinale, comme en milieu terrestre, mais également par migration bathymétrique (en milieu terrestre, l'altitude peut également jouer ce rôle mais les points élevés restent relativement localisés). La subdivision d'une région ancestrale mère en deux provinces biogéographiques filles peut être la conséquence de mécanismes divers. De nombreuses hypothèses ont ainsi été proposées pour expliquer ces subdivisions :

- ✓ des changements paléo-environnementaux liés aux mouvements tectoniques des plaques [(théorie paléogéographique, Emsley, 1965, *In* Plouviez, 2009)] ou aux oscillations climatiques (théorie des refuges permettant aux zones géographiques les plus stables d'abriter certains taxons lors de contextes climatiques défavorables, Haffer, 1969, *In* Plouviez, 2009) ;
- ✓ d'autres barrières physiques à la dispersion qui fragmentent l'habitat tels que des courants océaniques, un fleuve, un désert ;
- ✓ des gradients environnementaux (Endler 1982, *In* Plouviez, 2009) qui, par sélection naturelle, peuvent engendrer des gradients de distribution des taxons.

Quelle que soit l'hypothèse, les capacités de dispersion et d'adaptation des espèces jouent un rôle fondamental dans leur répartition géographique et permettent de coloniser de nouveaux territoires, de survivre aux conditions locales de nouveaux habitats et s'y maintenir. Ainsi, définir une province biogéographique implique que de multiples espèces ne présentent pas les capacités de dispersion et/ou une valeur sélective suffisante pour atteindre la province biogéographique voisine et s'y établir. Néanmoins, certaines espèces, de par leur nature plus ubiquiste, sont capables de traverser une barrière biogéographique (Plouviez, 2009).

Cela ne signifie pas pour autant qu'elles ne sont pas affectées par la barrière biogéographique, certains individus pouvant être plus dispersifs ou mieux adaptés aux contraintes de l'environnement. Pour évaluer l'impact intraspécifique de ces contraintes, il est donc nécessaire d'examiner le polymorphisme de ces espèces et d'apprécier les différences potentielles pouvant exister entre populations situées de part et d'autre de la barrière biogéographique (ségrégation allélique pour un caractère donné). L'utilisation d'outils moléculaires permet de comparer un nombre plus important de caractères considérés neutres (certains sites nucléotidiques), qu'une approche morphologique, par exemple, et maximise la probabilité de détecter cet impact potentiel. Ainsi, une analyse de la structure génétique de ces populations peut permettre de détecter une concordance entre barrière génétique et barrière biogéographique, et ainsi indiquer que cette dernière a également eu un effet d'isolement sur l'espèce étudiée (exemple: la barrière biogéographique de Cap Canaveral, qui sépare les faunes de l'Atlantique et du Golfe du Mexique) (Plouviez, 2009).

La phylogéographie a pour objectif de comprendre les processus qui gouvernent la distribution géographique des lignées intraspécifique (Avice *et al.* 1987, *In* Plouviez, 2009) par l'étude de l'histoire évolutive de leurs gènes. Le processus de subdivision phylogéographique le plus couramment admis peut ainsi se décliner en plusieurs étapes : (1) un isolement géographique en allopatrie dépendant notamment du modèle de dispersion de l'espèce considérée et de la force de la barrière rencontrée ; pouvant engendrer, accumulation de mutations de part et d'autre de la barrière et dérive génétique, et/ou mal adaptation géographique, (2) un isolement génétique correspondant à cette subdivision géographique.

I.5. Modèles de dispersion en populations géographiquement subdivisées

Si le modèle panmictique⁶ correspond à un appariement sans contrainte des individus au sein de la ou des populations considérées (indice de différenciation génétique $F_{st} = 0$), à l'inverse, certaines populations subdivisées géographiquement peuvent n'échanger aucun migrant et conduire à une augmentation significative de la différenciation génétique par dérive (Hartl et Clark 2007, *In* Plouviez, 2009). De nombreux modèles intermédiaires impliquant un échange de migrants sous contraintes ont alors été décrits, selon un degré plus ou moins variable de connectivité des populations géographiquement subdivisées.

I.5.1. Modèle en îles

Wright (1931, 1937, *In* Plouviez, 2009) intègre la connectivité dans son modèle en îles (Fig. 2-A) en y ajoutant un paramètre de migration entre les populations étudiées. Ainsi, toutes les populations sont supposées présenter le même taux de migration "m" avec l'ensemble des autres populations. La différenciation entre les populations (mesurée par le "Fst") peut ainsi permettre d'estimer la fraction d'individus ($N \times m$) échangés entre populations (migrants) par la relation [$F_{st} = 1/(1+4Nm)$] sous l'hypothèse d'un état d'équilibre entre la migration et la dérive à chaque génération (populations démographiquement stables au cours du temps). Néanmoins, supposer que deux populations proches échangent entre elles autant de migrants que deux populations éloignées ne semble pas très réaliste. C'est pourquoi, d'autres modèles intègrent la notion de proximité géographique entre populations (Plouviez, 2009).

I.5.2. Modèle en pas japonais

Le modèle en pas japonais [(ou "stepping stone", Kimura 1953, *In* Plouviez, 2009) (Fig. 2-B)] considère que la dispersion ne s'effectue qu'entre populations voisines selon un même taux de migration "m" (celui-ci étant nul entre populations non adjacentes).

I.5.3. Modèle d'isolement par la distance

Le modèle d'isolement par la distance (Wright 1943, Malécot 1950, *In* Plouviez, 2009) (Fig. 2-C) présente, quant à lui, un taux de migration proportionnel à la distance entre individus considérés. Ainsi, ce modèle permet la connectivité entre individus provenant de populations

⁶ Cette hypothèse suppose que les individus ne choisissent pas leur partenaire sexuel ni en fonction de leur génotype, ni en fonction de leur phénotype = panmixie et que la rencontre des gamètes se fait au hasard = pangamie (Fleury, 2008)

proches mais également, dans une moindre mesure, entre populations plus distantes (Wright 1943, *In* Plouviez, 2009). Il suppose néanmoins que seule la distance est responsable du coefficient d'apparentement entre individus et n'intègre pas la présence potentielle d'une rupture abrupte de la migration par une barrière à la dispersion.

I.5.4. Modèle avec matrice de migration libre

Le modèle avec matrice de migration libre (Bodmer et Cavalli-Sforza 1968, *In* Plouviez, 2009) (Fig. 2-D) permet de fixer un taux de migration différent entre chaque paire de populations, avec des flux pouvant être asymétriques. Ainsi, selon les paramètres de migration choisis, ce modèle peut prendre en compte à la fois l'isolement par la distance mais également de possibles barrières à la dispersion (migration réduite entre deux groupes de populations). Les modèles en îles, en pas japonais et d'isolement par la distance, constituent des cas particuliers du modèle avec matrice de migration libre. Néanmoins, intégrant les avantages de tous les modèles précédents, ce dernier nécessite l'estimation d'un nombre important de paramètres [$(n(n-1))$ paramètres de migration avec "n" correspondant au nombre de populations]. C'est pourquoi il n'est que rarement utilisé.

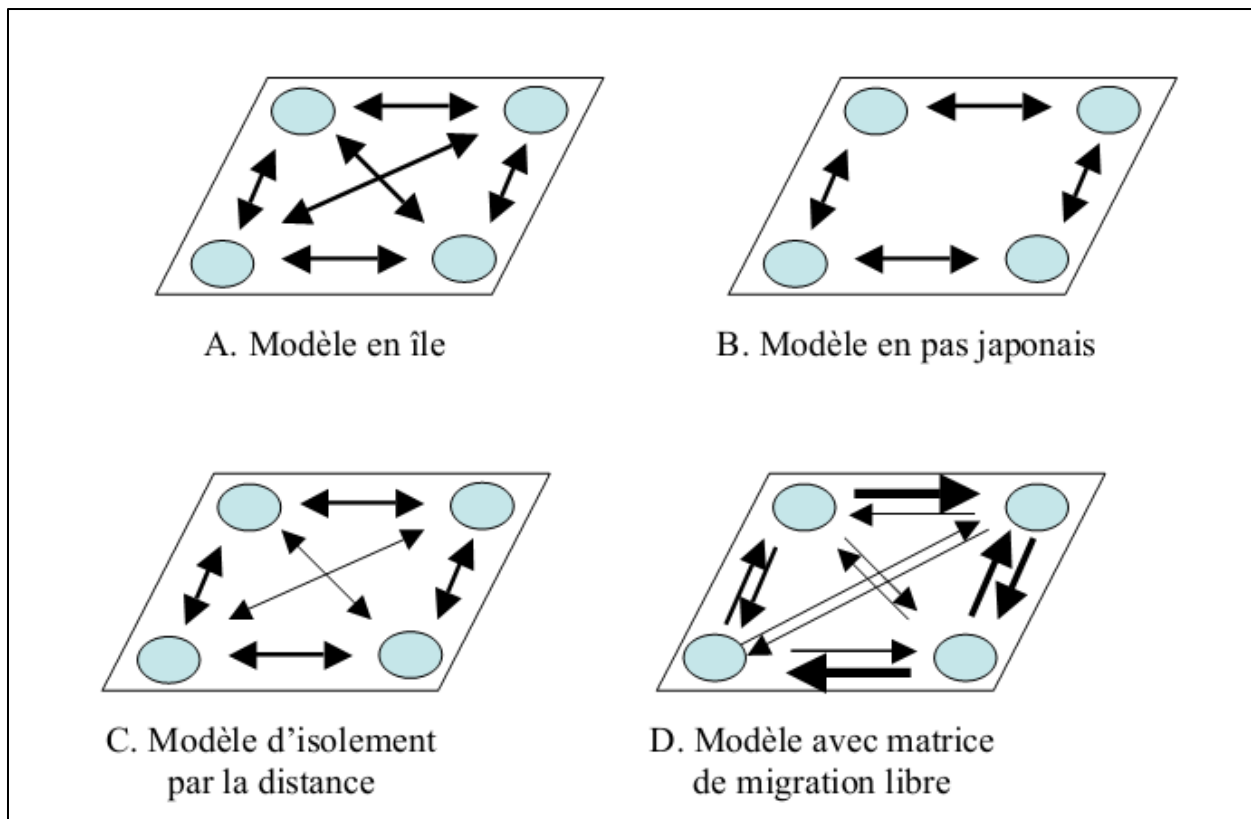


Figure 2 : Modèles de dispersion en populations géographiquement subdivisées. Les taux de migration sont proportionnels à l'épaisseur des flèches (Plouviez, 2009).

Selon les capacités de dispersion d'une espèce, un ajustement à un modèle de populations peut permettre de mieux appréhender son évolution dans le temps et l'espace. Ainsi, une espèce à forte capacité de dispersion sera moins soumise à l'isolement par la distance qu'une espèce à capacité de dispersion réduite et tendra à suivre un modèle en îles (Plouviez, 2009). Les espèces à capacité de migration très faible seront, quant à elles, plus proches d'un modèle d'isolement par la distance ou d'un modèle en pas japonais (suivant la fragmentation de l'habitat). L'isolement par la distance sera d'autant plus marqué que les capacités de dispersion des espèces seront faibles (Palumbi 2003, *In* Plouviez, 2009). (Fig. 3).

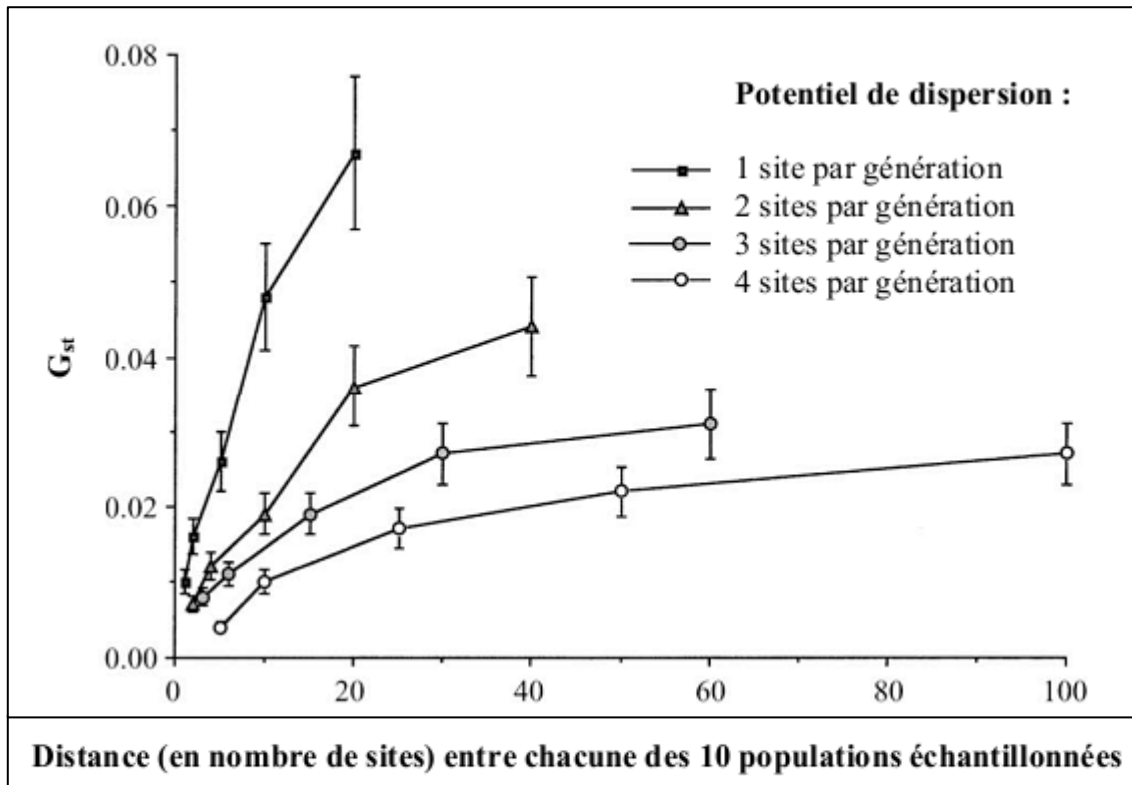


Figure 3 : Variations de la force de l'isolement par la distance avec la capacité de dispersion larvaire moyenne (en nombre de sites atteints par génération, la distance entre sites étant constante) adaptée de (Palumbi, 2003, *In* Plouviez, 2009). Valeurs du G_{st} (analogue du F_{st} et mesurant la proportion de variabilité génétique qui est distribuée entre populations) simulées sur 10 locus bi-alléliques

Si ces modèles permettent de décrire la connectivité entre populations à un temps donné, ils n'intègrent cependant pas la nature dynamique des populations dans le temps. Les modèles de métapopulation (modèle initial proposé par Levin 1970 puis différents modèles dérivés revus dans [Harrison et Hastings 1996, *In* Plouviez, 2009] (Fig. 4) ont été introduits afin de tenir compte de la variabilité dynamique locale des populations en y intégrant la possibilité d'extinction et de recolonisation de ces populations par de nouveaux migrants (notion de colonisateurs).

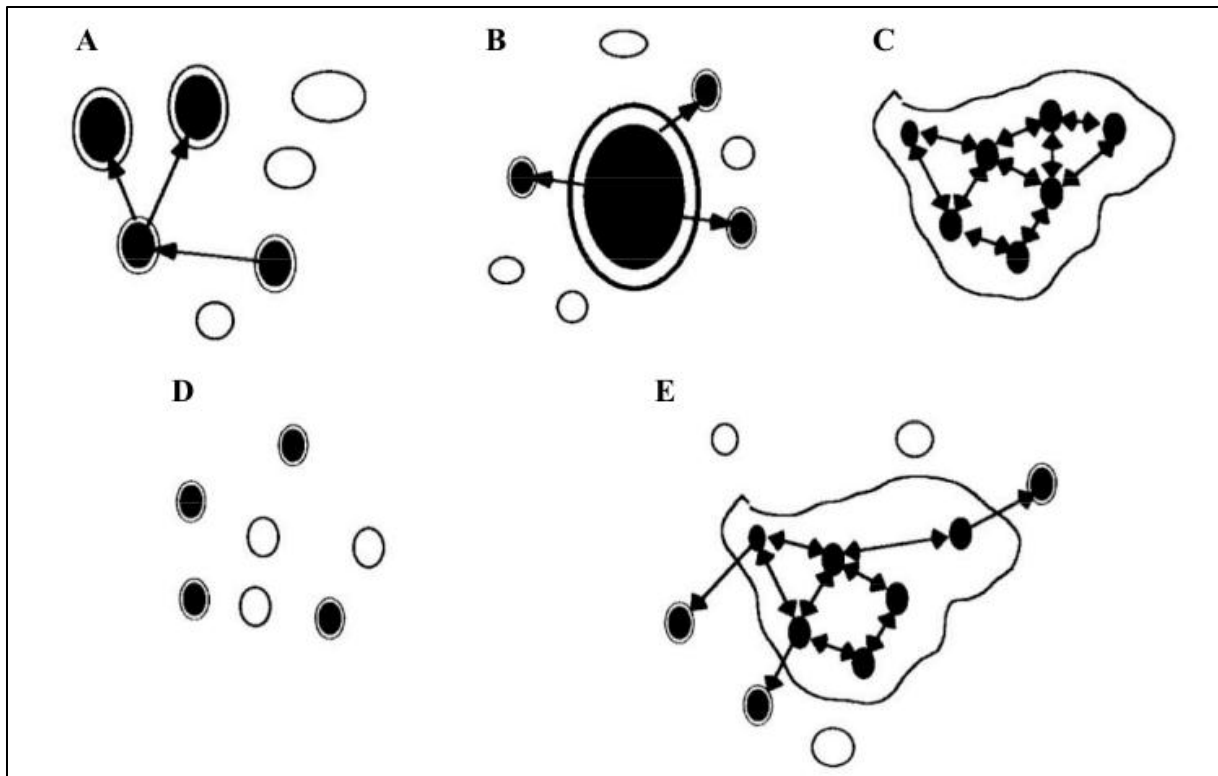


Figure 4 : Différents types de métapopulation. (A) type « classique » (Levins) ; (B) type « source-puits » ; (C) type « population fragmentée » ; (D) métapopulation en déséquilibre ; (E) cas intermédiaire combinant (A) et (D). Symboles remplis : habitats occupés ; symboles vides : habitats vierges ; flèches : dispersion; lignes noires entourant les symboles remplis : limite de distribution des populations locales. D'après [Harrison et Hastings, 1996, *In* Plouviez, 2009].

II. La Mer Méditerranée comme zone d'étude

La Mer Méditerranée est située à la frontière entre l'Europe et l'Afrique. Cette situation géographique la soumet à différents climats: un climat tempéré pour ses côtes européennes et un climat aride voire désertique le long des côtes Africaines et Moyen-Orientales (Fig. 5). Sa partie Sud est située à la position extrême de la partie descendante de la cellule de Hadley ce qui explique le climat désertique de la région. Une légère variation de la position de cette cellule peut ainsi avoir des conséquences considérables sur le climat du bassin Méditerranéen. Situé à la convergence de deux plaques tectoniques, le bassin Méditerranéen possède une orographie accidentée. Ainsi la plaque africaine se rapproche de plus en plus de la plaque eurasienne soulevant les reliefs situés sur les côtes Nord de la Méditerranée. Au Sud-Ouest, nous pouvons voir le massif de l'Atlas se déployer le long des côtes du Maghreb (Fig. 5), puis plus au Nord, les Pyrénées, le Massif Central et les Alpes en France (Bozec, 2006).

Ces trois dernières chaînes montagneuses, très rapprochées, forment deux canaux de circulation où le vent s'engouffre gagnant ainsi en intensité sur le Golfe du Lion. Ces vents, le Mistral (par le couloir Rhodanien) et la Tramontane (entre le massif central et les Pyrénées), jouent un rôle prépondérant dans le pré-conditionnement de la formation d'eau profonde dans le Golfe du Lion. En Mer Adriatique, nous retrouvons la même configuration entre les Alpes Autrichiennes et les Alpes Dinariques créant un passage pour les vents continentaux soufflant du Nord-Est ou "vent Bora" refroidissant fortement les eaux situées au nord de la Mer Adriatique. Plus l'est, les vents Etésien provenant de Russie soufflent du Nord-Est entre les montagnes Turques et Grecques sur le nord de la Mer Egée avant de s'infléchir vers le Sud-Est au niveau de la mer de Crète (Bozec, 2006).

La Mer Méditerranée peut être divisée en deux principaux sous-bassins possédant des caractéristiques très différentes. Le bassin Ouest est formé de la Mer d'Alboran, du bassin algérien, du bassin Liguro-Provençal et enfin du bassin Tyrrhénien (Fig. 5). Le bassin Ouest est directement relié au détroit de Gibraltar et donc à l'océan global. Cette particularité soumet les eaux de ce bassin aux fluctuations des caractéristiques des eaux Atlantiques entrantes. Les eaux du bassin Ouest sont plus froides et moins salées que celles du bassin Est. Ce dernier se compose du bassin Ionien, de la Mer Adriatique, du bassin Levantin et de la Mer Egée. Soumis à un climat beaucoup plus continental et aride, l'évaporation au-dessus de cette région est importante, amenant à une salinité moyenne de plus de 38.45 en surface (Bozec, 2006).



Figure 5 : Carte de la Mer Méditerranée ainsi que ses sous bassins. Les flèches marquent les couloirs de vent. Elle présente une extension longitudinale d'environ 4000 km sur une extension latitudinale de 800 km et s'étend d'environ 7° W à 37° E en longitude et de 29° N à 46° en latitude (Bozec, 2006).

La forte évaporation due au climat aride auquel est soumis la Méditerranée est à l'origine de la densité plus importante de ses eaux comparées à celles originaires de l'Océan Atlantique. Cette particularité fait de la Mer Méditerranée un bassin de concentration (Fig. 6). La conservation du sel est assurée à travers les échanges à Gibraltar impliquant les eaux moins salées de l'Atlantique ($S_1 = 36.2$) et les eaux plus salées ($S_2 = 38.4$) sortant de la Méditerranée en profondeur (Tchernia, 1978). Le bilan d'évaporation net, positif sur le bassin, provoque une perte de masse d'eau équivalente à 0.61 m/an sur l'ensemble du bassin (Bryden et Kinder, 1991). Cette perte est compensée par l'apport d'eau de la Mer Noire en Mer Egée et de l'Océan Atlantique par le détroit de Gibraltar. La Méditerranée présente également un déficit de chaleur d'environ 7 W/m^2 en moyenne annuelle (Béthoux, 1979). Ce déficit est compensé par les échanges entre les eaux plus chaudes Atlantiques pénétrant dans le bassin en surface (q_1) et les eaux plus froides sortant en profondeur au détroit (q_2) (Fig. 6). Durant sa progression dans la Mer Méditerranée, l'eau Atlantique transfère un flux de chaleur positif vers l'atmosphère.

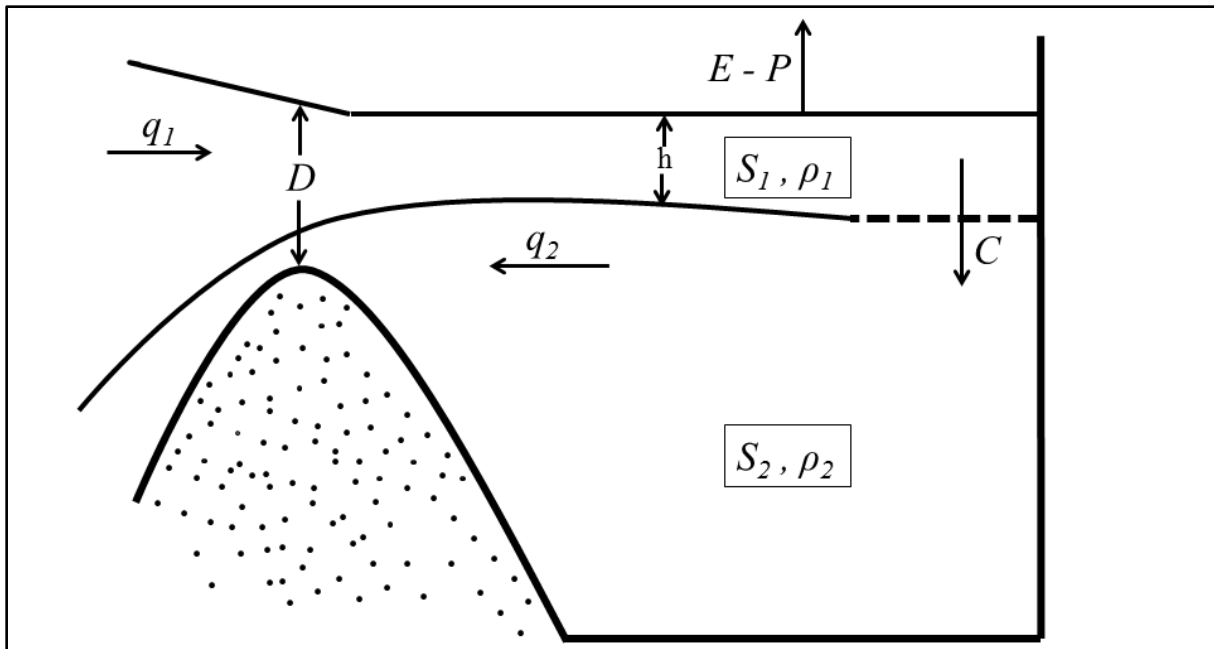


Figure 6 : Schéma illustrant les bilans de chaleur, de volume et de sel en Méditerranée. $E - P$: Bilan Evaporation-Précipitation; q_1 et q_2 : Transport entrant et sortant du bassin ; S_1 et S_2 : Salinité des couches de surface et profonde ; ρ_1 et ρ_2 : Densité des couches de surface et profonde ; D : Profondeurs à Gibraltar ; h : Hauteur de la couche de surface ; C : convection. (Myers et Haines, 2002 ; modifiée).

II.1. Circulation de la Mer Méditerranée

En conséquence de sa situation géographique (bassin semi-fermé), la Mer Méditerranée possède sa propre circulation thermohaline. Cette circulation est principalement contrôlée par le gradient de densité entre l'Océan Atlantique et la Mer Méditerranée. Ainsi, la circulation thermohaline (CTH) peut tout d'abord être décrite par sa branche chaude: le flux Atlantique entrant. Durant leur périple à travers le bassin Méditerranéen, les eaux Atlantiques deviennent plus denses sous l'influence du forçage atmosphérique. Ces modifications conduisent à la formation d'eaux profondes et intermédiaires qui alimentent à leur tour la branche froide de la CTH (Fig. 7). Associées à cette branche principale zonale, il existe deux sous-branches de circulation mais cette fois méridiennes: l'une dans le bassin Ouest et l'autre dans le bassin Est. Ces sous-branches n'ont pas une moindre importance car elles sont alimentées par la formation d'eau profonde (Lascaratos *et al.*, 1999).

Suivant le schéma classique, trois masses d'eau sont formées en Méditerranée: l'eau Levantine intermédiaire ou "Levantine Intermediate Water" (LIW), l'eau Adriatique profonde ou "Adriatic Deep Water" (ADW) qui se transforme ensuite en eau profonde de Méditerranée Est

ou "Eastern Mediterranean Deep Water" (EMDW) durant son transfert vers le fond du bassin Ionien, et enfin l'eau profonde de Méditerranée ouest ou "Western Mediterranean Deep Water" (WMDW) (Fig' 7). Toutes ces masses d'eaux contribuent à la branche froide de la CTH. Le temps de renouvellement des eaux profondes a été estimé à 100 ans et celui de la LIW à 10-20 ans (Stratford et Williams, 1997).

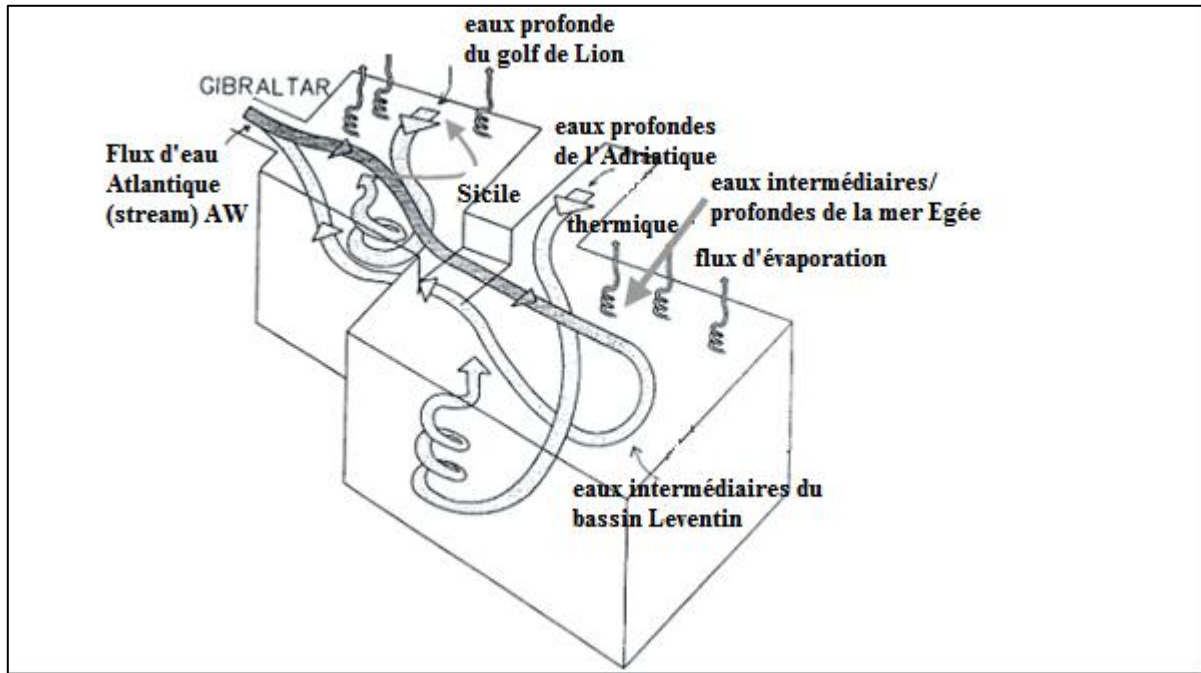


Figure 7 : Schéma de la circulation thermohaline de la Mer Méditerranée montrant la branche principale zonale formant les eaux intermédiaires et les branches secondaires méridiennes formant les eaux profondes (Lascaratos *et al.*, 1999 ; modifiée par Mansouri).

Ces formations de masses d'eau ont montré d'importants changements dans les récentes décennies. En effet, ce schéma classique de la CTH Méditerranéenne a été récemment révisé après les observations collectées durant les campagnes POEM ("Physical Oceanography of the Eastern Mediterranean", Malanotte-Rizzoli et Robinson, 1988) et MATER (Klein *et al.*, 1999). Plus précisément, elles ont mis en évidence la formation d'une nouvelle masse d'eau dans la Mer Egée, assez dense pour remplacer la "EMDW" sur le fond du bassin Ionien, précédemment alimenté par la "ADW". De nombreuses études ont décrit cet événement appelé "Eastern Mediterranean Transient" ou "Big Transient" (Lascaratos *et al.*, 1999). Elles ont montré, entre autres, que cet événement transitoire pouvait découler du forçage atmosphérique anormalement fort au-dessus de la Mer Egée durant cette période (Samuel *et al.*, 1999 ; Rupo-

Io *et al.*, 2003). Nous voyons ainsi que la convection océanique dépend fortement du forçage atmosphérique et de sa variabilité.

II.1.1. Circulation du Bassin Ouest Méditerranéen

En 1999, Millot nous présente deux schémas décrivant la circulation de surface et à 200m du bassin Ouest grâce aux données récoltées au cours des campagnes effectuées durant les années 1980-90 et de données satellites. Ces schémas présentés (Fig. 8 ; 9), nous montrent une circulation globalement cyclonique, avec une circulation vers l'Est le long des côtes Sud du bassin et vers l'Ouest le long des côtes Nord.

Tout d'abord en surface (Fig. 8), l'eau Atlantique entre dans le bassin Méditerranéen par le détroit Gibraltar et la gyre d'Alboran (Vargas-Yanez *et al.*, 2000). Elle s'écoule ensuite le long des côtes algériennes, formant le courant algérien. L'instabilité de ce courant conduit à la création de tourbillons anticycloniques. Au niveau du détroit de Sicile, le courant se sépare en deux branches: l'une passe le détroit tandis que l'autre entre dans le bassin Tyrrhénien en longeant les côtes de Sicile et d'Italie jusqu'au détroit de Corse. Cette dernière rejoint la gyre Liguro-Provençale formée par le courant Liguro-Provençal et le front Nord-Baléare. Poursuivant son chemin le long des côtes Espagnoles, le courant retourne vers la mer d'Alboran avant d'être repris par le courant Algérien. L'intérieur du bassin est ponctué de tourbillons anticycloniques et cycloniques générés par les instabilités des courants ou par le vent comme le tourbillon situé à l'Est de la Corse (Bozec, 2006).

En profondeur, à 200m (Fig. 9), la signature des courants de surface comme le courant Liguro-Provençal au Nord et le courant Algérien sur les côtes Sud reste très marquée (Fig. 9). Nous retrouvons également les tourbillons entre les Baléares et la Sardaigne toujours présents à cette profondeur. Au détroit de Sicile, la "LIW" formée dans le bassin Levantin pénètre dans le bassin Ouest. Elle s'écoule ensuite dans le bassin Tyrrhénien le long des côtes Est. Contournant la Corse par le Nord et la Sardaigne par le Sud, elle pénètre ensuite dans le Golfe du Lion, site de formation de la "WMDW" (Bozec, 2006).

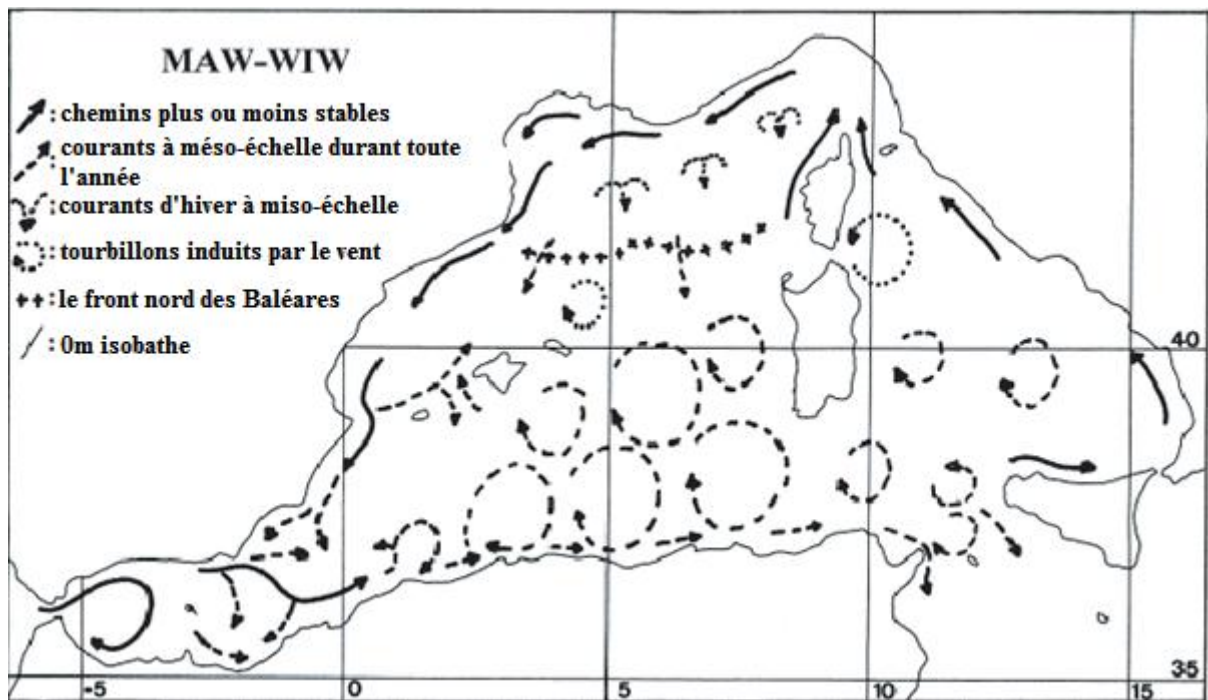


Figure 8 : Circulation de surface du bassin Ouest Méditerranéen (Millot, 1999 ; modifiée par Mansouri)

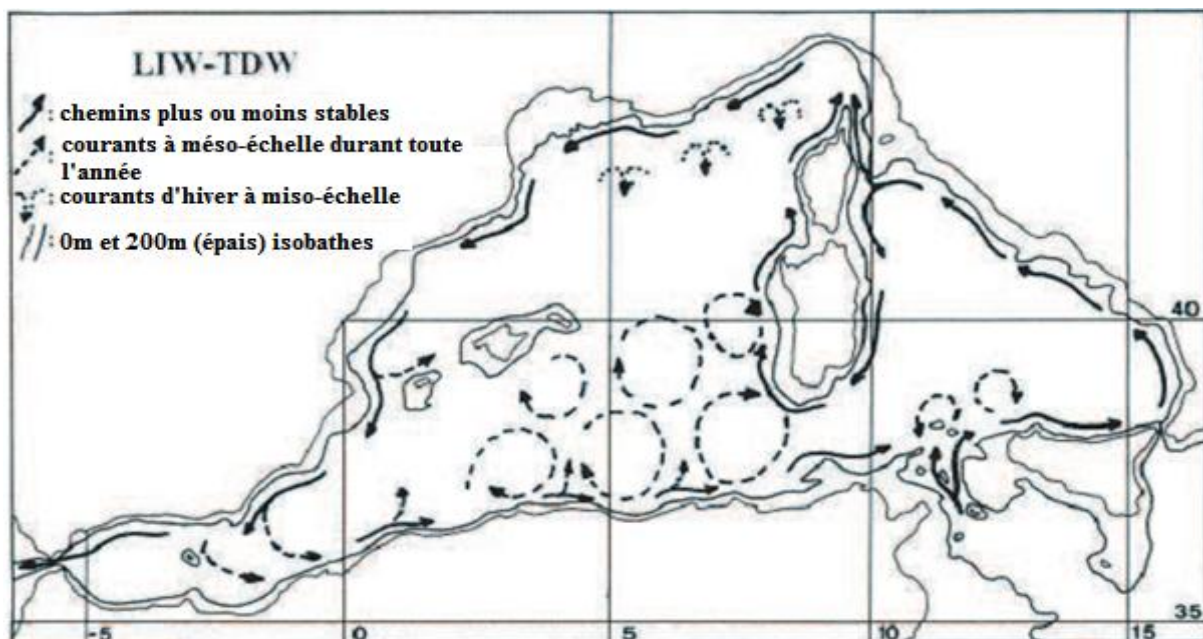


Figure 9 : Circulation à 200m du bassin Ouest Méditerranéen (Millot, 1999 ; modifiée par Mansouri).

II.1.2. Circulation du Bassin Est Méditerranéen

Alors que l'ensemble de la communauté Méditerranéenne s'accorde sur les principales caractéristiques de la circulation du bassin Ouest (Fig. 8 ; 11), il existe une controverse concernant

la circulation du bassin Est. Analysant des images satellites infrarouges, Hamad *et al.* (2005) nous montrent un écoulement passant le détroit de Sicile et se divisant ensuite en deux courants distincts: l'un vers le nord du bassin Ionien et l'autre vers l'Est longeant les côtes Nord africaines, jalonnées de structures tourbillonnaires, jusqu'aux côtes moyennes-orientales (Fig. 10). Certaines de ces structures sont quasi permanentes telles la gyre de Mersa-Matruh (ΣLW) et de Shykmona (ΣLE). Le courant progresse ensuite vers le Nord longeant les côtes du Liban et de la Syrie puis forme le courant d'Asie Mineure ("Asia Minor Current" : AMC). Il s'écoule alors vers l'Ouest contournant l'île de Chypre toujours en suivant la côte jusqu'à la région de Rhodes, site de formation de la "LIW" (Gyre de Rhodes). Le courant poursuit ensuite vers l'Ouest, passant soit au Nord soit au Sud de la Crète suivant la présence ou non du tourbillon d'Ierapetra (I). Le courant remonte ensuite vers le Nord jusqu'à la Mer Adriatique.

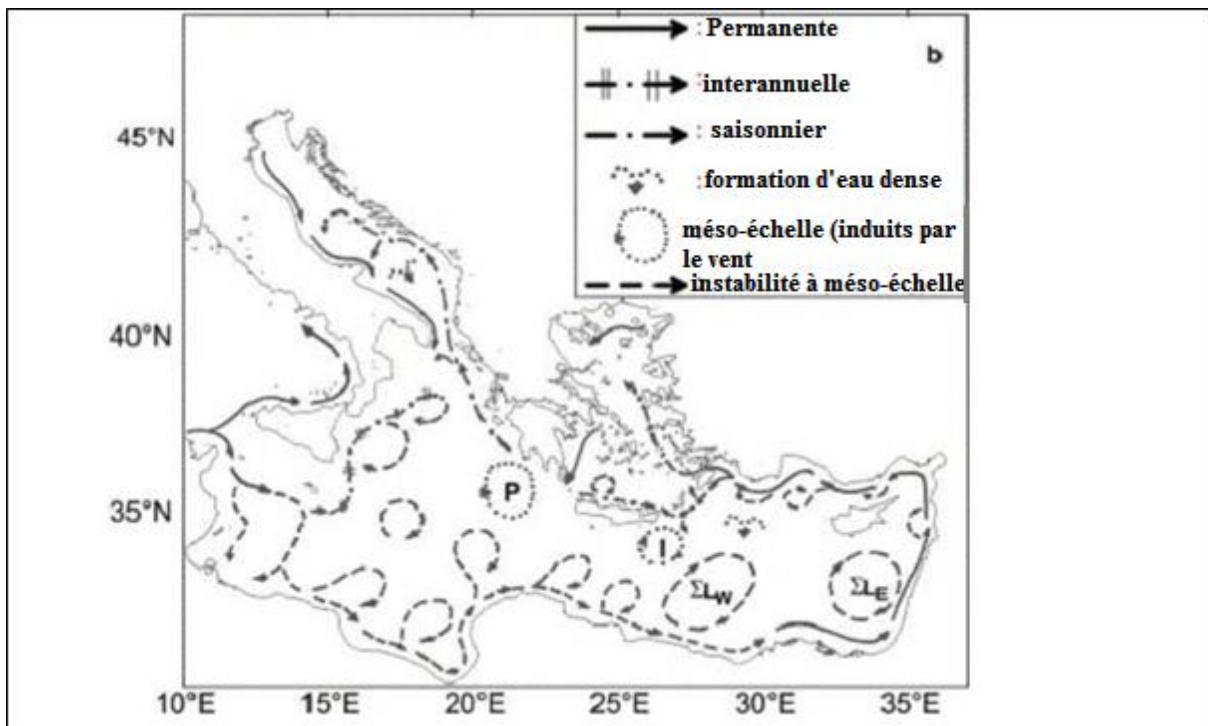


Figure 10 : Schéma de la circulation de surface du bassin Est proposé par (Hamad *et al.*, 2005 ; modifiée par Mansouri).

Cette description est en accord avec les premiers schémas de la circulation Méditerranéenne établis par Nielsen (1912) ou Lacombe et Tchernia (1972). Cependant, elle s'oppose au schéma proposé suite aux campagnes POEM (1985-1995). En effet, plusieurs études décrivent l'existence d'un courant passant par le centre des bassins Ionien ("Atlantic Ionian Stream") et Levantin ("Mid-Mediterranean Jet (MMJ)") (Fig.11, Robinson et Golnaraghi, 1994). Les va-

riations saisonnières de ce courant montreraient alors en hiver une circulation contournant effectivement Chypre. Cependant, en été, une circulation moins intense avec une inflexion du courant vers l'Ouest se mettrait en place au Sud-Est de l'île (Fig. 11). Ainsi, il apparaîtrait clairement une gyre au large de Rhodes s'étendant des îles grecques à Chypre en Hiver et se rétractant en été (Fig. 11).

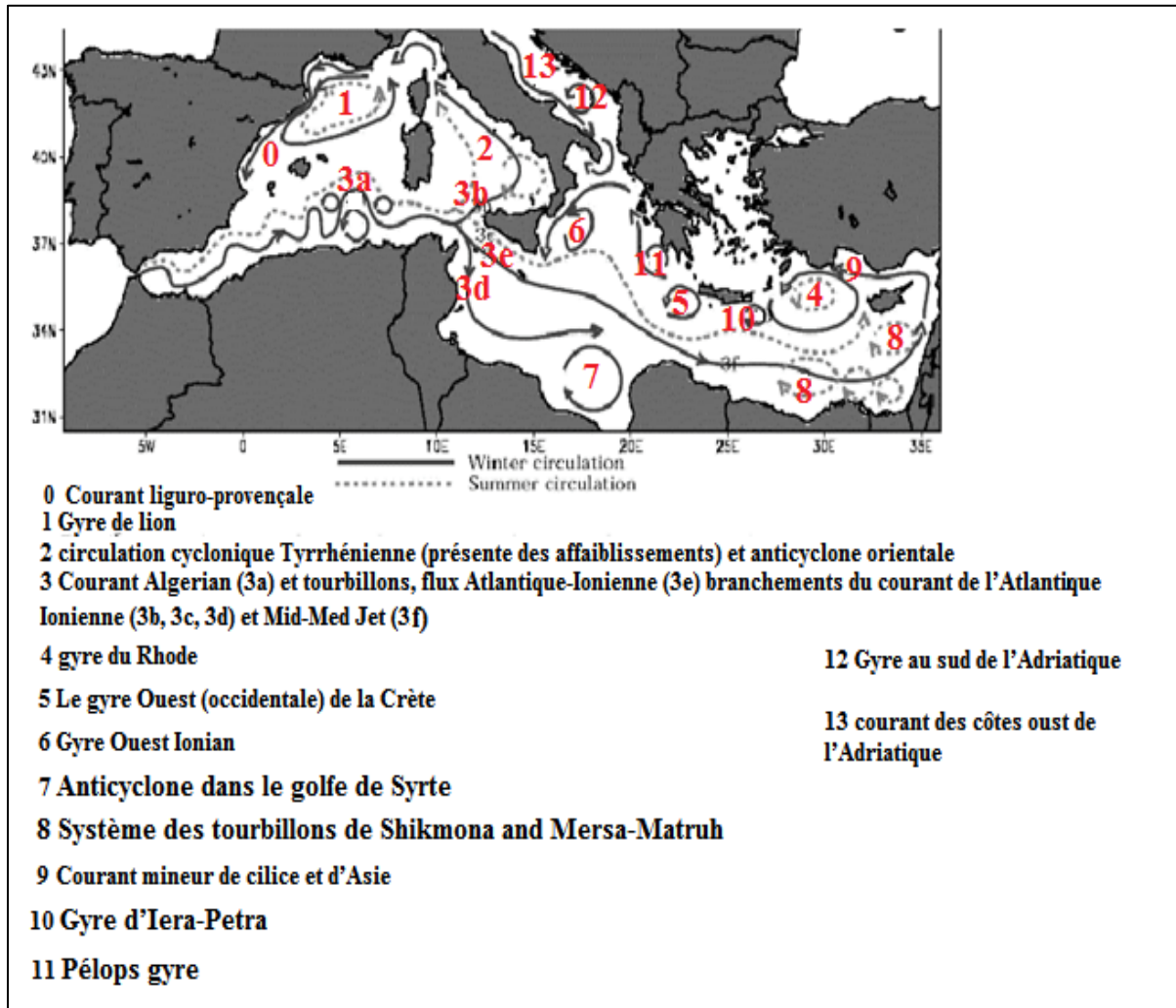


Figure 11: Schéma de la circulation de surface du bassin Méditerranéen décrit par Pinardi et Masetti (2000) suite aux observations des campagnes (POEM 2005) (Modifiée par-Mansouri).

III. Aperçu sur les échinodermes et les espèces étudiées

III.1. Echinodermes

Le nom échinoderme vient de deux termes grecs: echinos (=épineux) et derma (=peau), ceci en raison des structures calcaires épineuses que l'on retrouve dans la peau. Exclusivement marins, ils constituent l'un des phylums le mieux caractérisé du règne animal (*In Mezali, 2008*). Ils ont tous une organisation à peu près équivalente et présentent quatre caractères uniques pour le groupe :

- Ils ont une symétrie pentaradiée (d'ordre 5) parfois masquée par une symétrie bilatérale ;
- ils possèdent un squelette intradermique formé de nombreuses plaques ou spicules calcaires ;
- ils présentent un appareil aquifère encore appelé système ambulacraire. Celui-ci est formé d'un système de canaux internes connectés à des extensions externes. Cet appareil particulier n'existe dans aucun autre groupe du règne animal. Il assure principalement le mouvement et la nutrition des animaux (Nichols, 1969, *In Mezali, 2008*) ;
- Ils sont enfin caractérisés par leurs tissus très flexibles appelés tissu conjonctif variable qui leur permet de changer volontairement et rapidement leur rigidité.

Les échinodermes actuels sont répartis en cinq classes très différentes d'aspect:

- Les astérides ou étoiles de mer (Classe Asteroidea) ;
- Les ophiures (Classe Ophiuroidea) ;
- Les échinides ou oursins de mer (Classe Echinoidea) ;
- Les crinoïdes ou lys de mer (Classe Crinoidea) représentés par les comatules en milieu récifal ;
- les holothuries ou concombres de mer (Classe Holothuroidea).

III.1.1. Relation phylogénétique

La relation phylogénétique entre ces cinq classes a récemment fait l'objet de plusieurs études par différents groupes de chercheurs (Mezali, 2008).

Tous s'accordent sur le fait que les cinq classes constituent des groupes monophylétiques. Les crinoïdes représentent la ligne évolutive la plus ancienne ; Les autres classes sont étroitement apparentées formant le groupe Eleutherozoa. La classe des holothuries est le groupe frère de

la classe des échinides avec lequel il forme le groupe Echinozoa. Les relations de parenté entre les astérides et les ophiures restent floues, mais les dernières études semblent indiquer que les astérides et les ophiures forment le groupe Asterozoa (Fig. 12).

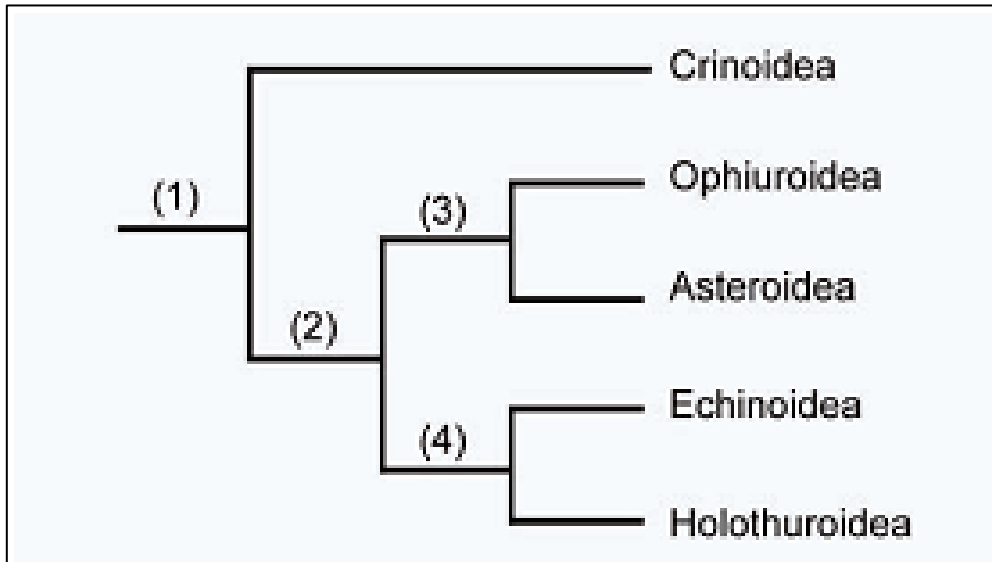


Figure 12 : Cladogramme, illustrant la classification des classes d'échinodermes. (1). phylum Echinodermata ; (2). superclasse Eleutherozoa ; (3). superclasse Asterozoa ; (4). superclasse Echinozoa (Janies, 2001).

En ce qui concerne les holothuries, il est clair que c'est la dernière classe qui s'est différenciée. Mais, même si ce groupe monophylétique est considéré comme récent, les premiers fossiles remontent à l'Ordovicien inférieur, c'est-à-dire à 460-500 million d'années (Gilliland, 1993 ; Reich, 1999, 2001).

III.2. "Concombres de mer" ou holothuries (cas des Aspidochirotés)

III.2.1. Systématique

Le tableau 1 décrit la systématique des holothuries Aspidochirotés

Tableau 1 : Systématique des holothuries Aspidochirotés.

Phylum (Embranchement)	Echinodermata Klein (1734)
Sous-phylum	Eleutherozoa Bather (1900)
Super classe	Cryptosyringida Smith (1984)
Classe	Holothuroidea De Blainville (1834)
Sous-classe	Aspidochirotacea Brandt (1835)
Ordre	Aspidochirotida Grube (1840)
Famille	Holothuriidea Ludwig (1894)
Genre	<i>Holothuria</i> Linnaeus (1758)

III.2.2. Généralités sur les holothuries

Une holothurie ne peut être mieux comparée qu'à un gros ver cylindrique (Koehler, 1921). Sa taille est très variable (de quelques mm à plus de 3 m) (Samyn *et al.*, 2006). La bouche, entourée d'un cercle de tentacules, se trouve à l'une des extrémités, et l'anus à l'autre extrémité du cylindre (Koehler, 1921). Pour comprendre l'organisation d'une holothurie, on peut supposer un Oursin dont le squelette serait réduit à de petites plaques microscopiques isolées, et qu'on aurait étiré de manière à convertir son corps sphérique en un corps cylindrique. Les radius et les inter-radius, au lieu de correspondre aux méridiens d'une sphère, seraient donc placés suivant dix génératrices du cylindre (Koehler, 1921).

Les holothuries présentent souvent une symétrie bilatérale qui masque la symétrie radiaire pentamérique avec une face ventrale appelée "trivium" et une face dorsale appelée bivium (Fig. 13). Le trivium est couvert de nombreux pieds ambulacraires (ou podia) terminés par une ventouse. Ce sont des structures qui permettent à l'animal de se fixer et de se déplacer sur le substrat, Ce trivium présente l'aspect d'une semelle (Toulemont, 1982). Sur le bivium, il existe également des podia sans ventouse, appelés papilles. Le nombre ainsi que l'arrangement des podia et des papilles varient selon le taxon. (Samyn *et al.*, 2006).

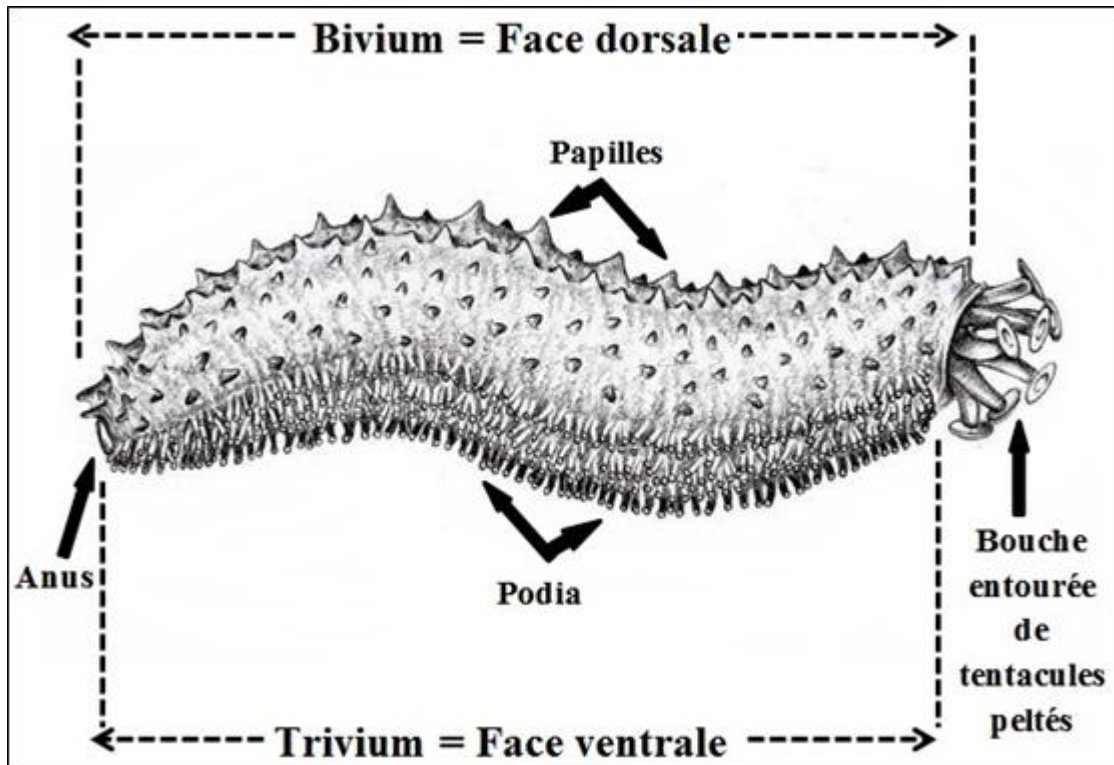


Figure 13 : Anatomie externe d'une holothurie aspidochirote (Samyn *et al.*, 2006).

Les podia et les papilles sont en rapport avec les cinq canaux radiaires qui, avec l'anneau aquifère pourvu d'une ou plusieurs vésicules de Poli et de un ou de plusieurs canaux de sable, constituent le système aquifère (Fig. 14). Contrairement aux autres échinodermes, ce système s'ouvre la plupart du temps dans la cavité interne à hauteur de la plaque madréporique. De consistance souvent molle les holothuries ont un squelette réduit à une couronne calcaire péripharyngienne et à de microscopiques pièces calcaires, disséminées dans leur peau et autres tissus. La couronne calcaire est formée de pièces radiales et de pièces interradianales macroscopiques. La réduction du squelette est largement compensée par le système musculaire. Ce dernier est constitué de cinq bandes musculaires longitudinales, en position radiale, qui sont antérieurement attachées aux pièces radiales de la couronne calcaire et postérieurement au cloaque via les muscles rétracteurs du cloaque.

Le coelome de l'holothurie (Fig. 14) est une vaste cavité remplie d'un liquide (le liquide coelomique) proche de l'eau de mer dans lequel se trouvent le tube digestif, les poumons et les gonades. Le tube digestif fait une grande boucle et occupe la majeure partie de la cavité générale du corps. Il s'ouvre antérieurement au niveau de la bouche qui est entourée de tentacules, podia modifiés servant à l'ingestion des particules alimentaires, et se termine postérieurement par un anus. Peu avant l'anus, le tube digestif s'enfle en un cloaque dans lequel débouchent

arbres respiratoires appelés improprement "poumons", organes en forme de buisson plus ou moins touffu qui pompent et rejettent l'eau de mer par l'anus. À la base des arbres respiratoires de certaines espèces d'holothuries (seulement dans la famille des Holothuriidae) on peut observer des tubes souvent blanchâtres, dits tubes de Cuvier, pouvant être projetés à l'extérieur par l'anus. Sous la pression de l'eau injectée dans les tubes, ils s'allongent considérablement, formant autour de l'agresseur un réseau extraordinairement résistant et collant (Conand, 1989 ; Samyn *et al.*, 2006).

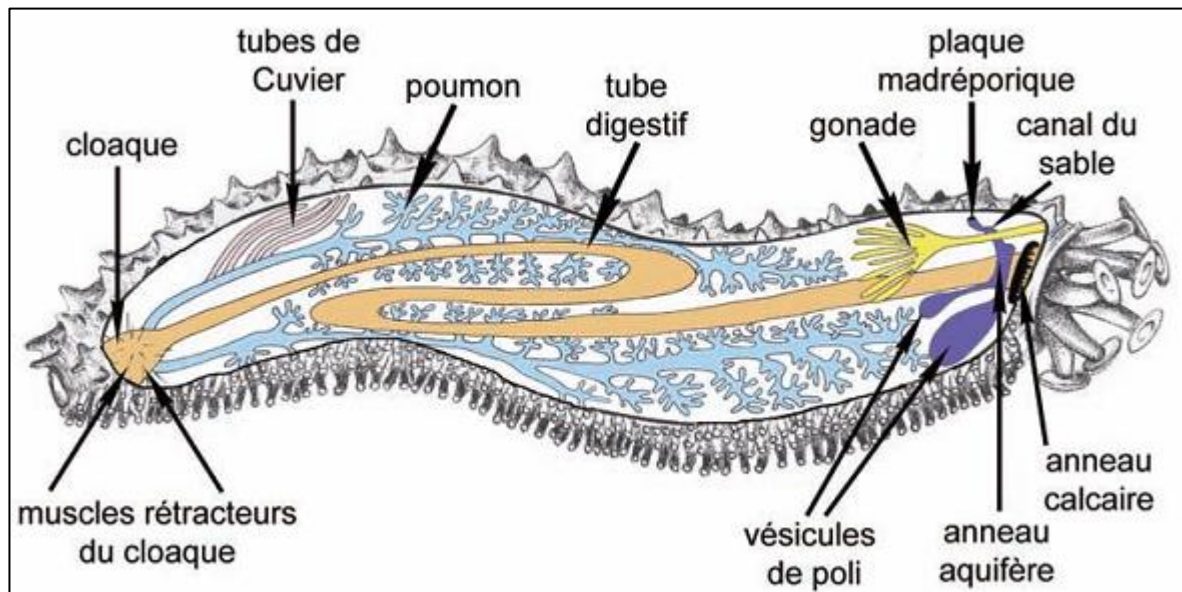


Figure 14 : Anatomie interne d'une holothurie aspidochirote montrant les principaux organes (In Samyn *et al.*, 2006).

III.2.3. Identification des holothuries aspidochirotés

La détermination des holothuries est plus difficile que celle des autres Échinodermes, il est peu de groupes chez lesquels les erreurs de détermination se soient montrées aussi nombreuses, et chez les quels la synonymie soit aussi compliquée (Koehler, 1921).

L'identification de tous les genres et espèces d'holothuries dépend presque entièrement de la forme de leurs structures endosquelettiques (sclérites), de la forme de l'anneau calcaire et de l'arrangement des pieds ambulacraires (Pawson et Felle, 1965).

Le nombre de vésicules de poli et les organes de Cuvier (Fig. 15) sont une distinction d'une importance majeure pour la détermination des espèces du genre *Holothuria* (Koehler, 1921).



Figure 15 : *Holothuria (P.) forskali* projetant ses tubes de Cuvier. Photo prise en Italie par Roberto Pillon Mai, 2011.

D'autres caractères anatomiques variables selon les espèces telle que: le nombre et l'arrangement des tentacules ; la présence ou l'absence des «dents anales» ou papilles et les «canaux en pierre» sont rarement employés d'une manière satisfaisante dans la classification (Pawson, 1966).

Les caractères extérieurs fournissent, chez les animaux vivants, des indications qui sont surtout précises chez les Aspidochirotés (Koehler, 1921).

Il est indispensable, pour faire la détermination, d'abord de compter les tentacules, puis d'ouvrir l'animal pour examiner les organes internes, et enfin d'étudier les sclérites (Koehler, 1921).

III.2.4. Ordre des aspidochirotida

Dans cet Ordre on distingue 3 familles, 35 genres et 340 espèces (Kerr, 2000).

L'ordre des Aspidochirotés est caractérisé par des holothuries pédifères chez lesquelles on distingue les caractéristiques suivantes :

- Le corps est allongé, cylindrique, avec une sole ventrale en général peu accusée ;
- Appendices ambulacraires généralement disposés sans ordre et se présentant le plus souvent sous forme de pédicelles sur la face ventrale et de papilles sur la face dorsale (Koehler 1921) ;

- Les ramifications des tentacules sont peltées (Fig. 16) et forment ainsi une sorte de disque terminal (Cherbonnier, 1955 ; Mezali, 2008) ;
- Des organes arborescents (arbres respiratoire)
- Les tubes de Cuvier sont soit absents, soit développés ou extrêmement abondants ;
- Les muscles pharyngiens rétracteurs sont absents (Koehler, 1921) ;
- Le canal hydrophore s'ouvre et se ferme à l'extérieur ;
- Les spicules calcaires sont simples et se présentent sous forme de corpuscules crépus, de tourelle plus ou moins développées, de boucles noduleux et de bâtonnets pointus ;
- Le mésentère appartenant à la troisième boucle de l'intestin, tourne dans l'inter-radius ventral droit.

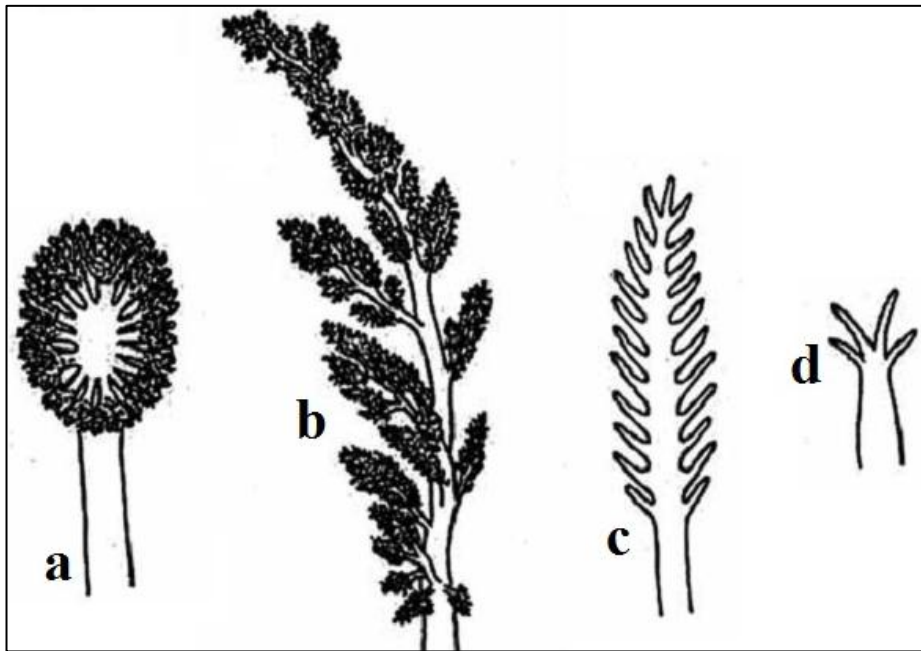


Figure 16 : Les différentes formes de tentacules des holothuries. a. Pelletées ; b. dendritiques; c. Pennées; d. Digitées. (Pawson, 2010).

III.2.5. Famille des Holothuroiidae

La famille des Holothuriidae est l'une des trois familles établis dans l'ordre important des Aspidochirotida, cette famille représente 11% de la diversité total de la classe Holothuroidea (Borrero-Pérez *et al.*, 2009).

Cette famille est le plus souvent caractérisée par des espèces tropicales, des eaux peu profondes (Borrero-Pérez *et al.*, 2010). 187 espèces ont été identifiées dans cette famille et sont généralement classées dans cinq genres nominaux (Samyn *et al.*, 2005 ; 2006; O'Loughlin *et al.*, 2007) (Tab. 2). Mais en 2015 ce chiffre augmente vers 190 espèces (Thandar, *Comm. personnelle*).

Tableau 2 : Famille des Holothuroiidae (Samyn *et al.*, 2005 ; 2006 ; O'Loughlin *et al.*, 2007).

<i>Holothuria</i> Linnaeus (1767)	150 espèces
<i>Actinopyga</i> Bronn (1860)	17 espèces
<i>Bohadschia</i> Jaeger (1833)	11 espèces
<i>Labidodemas</i> Selenka (1867)	8 espèces
<i>Pearsonothria</i> Semper (1868)	1

III.2.5.1. Diagnose

La famille des Holothuriidae est caractérisée par :

- Un corps souvent épais, de forme allongée plus ou moins cylindrique, rarement aplati dans le sens dorso-ventral (Koehler, 1921 ; Cherbonnier, 1955; Mezali, 2008) ;
- Une bouche en position terminale et ventrale (Deichmann, 1958 ; Mezali, 2008) ;
- Vingt à trente tentacules, et généralement 20 en moyenne chez la majorité des espèces (Deichmann, 1958) ;
- Des pieds ambulacraires de la face ventrale présentent une plaque calcaire à leur base et un nombre variable de bâtonnets et de plaque de soutien (Deichmann, 1958) ;
- Des organes génitaux formant une touffe simple (Deichmann, 1958) et situés seulement sur le côté gauche du mésentère dorsal (Cherbonnier, 1955) ;
- Un ou plusieurs canaux hydrophores courts dont la plaquette madréporique est libre dans la cavité générale interne du corps (Koehler, 1921; Cherbonnier, 1955) ;
- Deux organes arborescents ou respiratoires bien développés (Cherbonnier, 1955 ; Mezali, 2008) et reliés au tube digestif par le rete mirabile (Deichmann, 1958) ;

- La présence ou l'absence d'organes de cuvier ;
- Des sclérites diversifiés représentés par des tourelles, boucles ou dérivés des bâtonnets aigus (Mortensen, 1927, *In* Mezali, 2008). Dans la plupart des formes, les tourelles sont disposées en couche dans la partie externe du derme, ces tourelles peuvent être absentes ou réduites. La couche intérieure du derme est constituée de boutons (réguliers ou irréguliers, rugueux ou lisses), de bâtonnets, de rosettes et de plaques (Deichmann, 1958).

III.2.5.2. Genre *Holothuria* Linnaeus (1767)

Le genre *Holothuria* comprend 390 espèces nominales dont 150 actuelles (O'loughlin *et al.*, 2007).

III.2.5.2.1. Diagnose

Les espèces appartenant au genre *Holothuria* se distinguent par les caractéristiques suivantes :

- La forme du corps est très variable. Elle peut être vermiforme ou cylindrique, ou aplatie sur la face ventrale et arquée sur la face dorsale (Rowe, 1969 ; Mezali, 2008)
- La taille du corps est peut atteindre 450 à 600 mm. (Rowe, 1969 ; Mezali, 2008) ;
- La paroi du corps est d'une épaisseur peu variable (Rowe, 1969 ; Mezali, 2008) ;
- Les appendices ambulacraires sont disposés sans ordre et se présentent le plus souvent sous forme de pédicelles sur la face dorsale du corps (Koehler, 1921; Rowe, 1969 ; Mezali, 2008) ;
- La bouche est terminale ou ventrale (Mortensen, 1927 *In* Mezali, 2008) ;
- Les ampoules tentaculaires sont bien développées (Mortensen, 1927 *In* Mezali, 2008)
- L'anneau calcaire est plus ou moins développé, généralement avec des plaques radiales 2 à 3 fois plus longues que les plaques interradianales. La marge antérieure de l'anneau calcaire est rarement dentelée. Par contre, la marge postérieure est onduleuse (excepté chez le sous-genre *Theelothuria* où les plaques radiales sont fabriquées postérieurement) (Rowe, 1969 ; Mezali, 2008) ;
- L'absence des dents anales (Rowe, 1969 ; Mezali, 2008) ;
- Les tentacules sont en nombre de 17 à 30. On note habituellement un nombre moyen de 20 tentacules (Rowe, 1969 ; Mezali, 2008) ;

- Les arbres respiratoires sont reliés au tube digestif par un rete mirabile (Mortensen, 1927, *In* Mezali, 2008) ;
- La présence d'un seul faisceau de tubes génitaux placés à gauche du mésentère dorsal (Koehler, 1921) ;
- Les organes de Cuvier peuvent être présents (Mortensen, 1927 *In* Mezali, 2008) ;
- Les sclérites sont de diverses formes et différemment développées. Les tourelles sont présentes, sauf dans le sous-genre *Selenkothuria* où elles sont absentes chez cinq espèces (Rowe, 1969).

III.2.5.3. Sous-genre de *Holothuria* (Rowe, 1969)

Comprend 8 espèces (Rowe, 1969). Espèce-type : *Holothuria tubulosa* Gmelin (1790).

✓ Les espèces incluse dans le sous genre *Holothuria*

Nous allons citer les espèces qui font partie de notre étude seulement.

1. *Holothuria mamamta* Grube, 1840.
2. *Holothuria stelatti* Delle Chiaje, 1823.
3. *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1791).

III.2.5.4. Sous-genre *Lessnothuria*, (Deichmann, 1958)

Ce sous-genre a été transféré au sous genre *Roweothuria* par Thandar (1988)

Comprend 6 espèces. Espèce type : *Holothuria pardalis* Selenka (1867) désignée par Deichmann (1958). Autre espèce incluse : *Holothuria Poli* Delle Chiaje (1823).

✓ Les espèces incluses

Holothuria (R.) arguinensis (Koehler et Vaney, 1906).

Holothuria (H.) dakarensi.

IV. Endosquelette (sclérites)

Les échinodermes possèdent généralement un tégument rigide et un endosquelette élaboré en calcite riche en magnésium (Raup, 1966). Dans la classe des Holothuroideae, le squelette intégrumental constitué d'ossicules microscopiques formés dans des sclérocytes syncytiaux à plusieurs noyaux, présents dans la couche dermique du tégument (Stricker, 1986). Ces ossicules peuvent se présenter sous de multiples formes, des plus simples (bâtonnets) aux plus élaborées (formes allant de plaques perforées à des plaques ornées). La couronne calcaire, structure formée par des plaques calcifiées entourant le pharynx, fait également partie de l'endosquelette de ces animaux (Conand, 1990). Ces structures calcaires revêtent une grande importance pour l'identification systématique des espèces d'holothuries (Pawson et Fell, 1965).

Toutefois, les sclérites se modifient en cours de croissance de l'animal et pourront être très différents chez les juvéniles et les adultes d'une même espèce (Massin, 1994 ; Cutress, 1996). Ces différences concernent surtout la taille et/ou l'architecture des éléments (plus grand, plus petit, plus complexe, plus simple), mais elles peuvent aussi être liées à la disparition précoce et/ou l'apparition tardive de certains d'entre eux.

De plus, les sclérites ne sont pas uniformes dans toute la paroi du corps de l'holothurie. Il existe une différence notable entre les sclérites de la face ventrale et celles de la face dorsale du corps (Massin, 1994). Les sclérites ont des formes très variées notamment celles des organes internes du corps. On distingue une vingtaine de types de spicules différents, mais généralement fixes pour chaque espèces (*In* Mezali, 2008).

On compte environ 21 millions de spicules chez un même individu, qui soutiennent la paroi du corps et tous les autres éléments squelettiques d'échinodermes (Koehler, 1921).

IV.1. Composition chimiques des sclérites

Les sclérites des holothuries sont constituées d'un complexe de carbonate de calcium (CaCO₃), de Magnésium (Mg), du Phosphate et d'éléments traces (Hampton, 1958) (Tab. 3).

Dans le tableau suivant, Hampton (1958) a décrit la composition chimique des sclérites d'une holothurie aspidochirote typique ; *Holothuria Impasiens (forskali)*.

Tableau 3: Composition chimique des sclérites d'*Holothuria Impasiens (forskali)* d'après Hampton (1958).

Radicaux	Pourcentage	m.equiv *
Ca	35.18	1.765
Mg	3.36	0.276
CO ₃	60.80	2.026
PO ₄	0.29	0.009
Cu, Fe, Pb, Sr, ZN	Traces ^α	Total Cations 2.032
Ba, Bi, SO ₄	-	Total Anions 2.035
Protéines	-	
Résidus d'acides insoluble	0,01	
Total		99.64 %

* Basé on 100 mg. Échantillon.

α: pourcentage pour chaque radical < 0.001%.

Clarke et Kamm (1917) ont montré que dans les eaux chaudes une partie de la teneur en Calcium des coquilles marines peut être substitué par le Magnésium. Ces auteurs ont même démontré cela chez les Astéroïdes. En effet, plusieurs espèces d'Astéries montrent un enrichissement progressif de Magnésium suite à une augmentation de la température. Ces mêmes auteurs ont démontré aussi que la proportion de Carbonate de Magnésium augmente de 11 à plus de 14% dans les eaux tropicales.

On note que le même phénomène a été observé chez les holothuries par Hampton (1958).

IV.2. Sclérites des holothuries aspidochirotés

Les holothuries aspidochirotés présentent en générale quatre catégories de sclérites (Samyn *et al.*, 2006) :

1. Les corpuscules turriformes (tables ou tourelles) ;
2. Les boucles (boutons) ;
3. Les plaques perforées ;
4. Les bâtonnets (baguettes).

IV.2.1. Corpuscules turriformes

Les corpuscules turriformes ou tourelles sont formés d'un disque perforé surmonté d'une flèche formée de quatre piliers qui peuvent être reliés entre eux par une ou plusieurs entretoises et qui sont à leur tour surmontés d'une couronne d'épines (Fig. 17) (Samyn *et al.*, 2006). La taille de la tourelle est déterminée en fonction de la proportion diamètre du disque/hauteur pillier. Elle est haute lorsque la hauteur de la tourelle excède le diamètre du disque, moyenne lorsqu'elle équivaut au diamètre du disque et basse lorsqu'elle lui est inférieure (les tourelles peuvent être réduites à un disque avec ou sans nodules) (Samyn *et al.*, 2006).

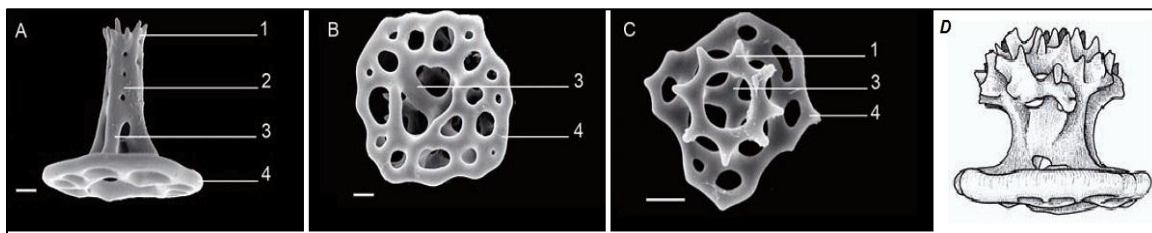


Figure 17 : Les corpuscules turriformes (Samyn *et al.*, 2006). A et D. vue latéral ; B. vue de dessous ; C. vue du dessus. 1= couronne ; 2 = entretoise ; 3 = pillier ; 4 = disque. Echelle A-C = 10 µm.

IV.2.2. Boucles

Les boutons, appelées aussi boutons sont des ossicules percés par un nombre variable de trous, réguliers ou irréguliers, qui sont généralement disposés par pair (Samyn *et al.*, 2006). Le bord du bouton peut être lisse, épineux, noueux, droit, sinueux ou irrégulier ; sa surface est lisse ou noduleuse ; son épaisseur est variable (Fig. 18). Chez les aspidochirotida et une minorité de stichopodidae les boutons sont généralement ovales à rectangulaires, avec un bord lisse, noduleux ou occasionnellement épineux ; les trous sont généralement disposés en deux rangées (parfois une ou plus de deux) parallèles à l'axe central et sans trou terminal. Le nombre de trous varie de 2 à plus de 20 (voir plaque). Les boutons diffèrent les uns des autres par le nombre et la largeur des trous, par la structure du bord et par la nature de la surface. Les boutons particulièrement rugueux peuvent se transformer en ellipsoïdes fenestrés (Fig. 18).

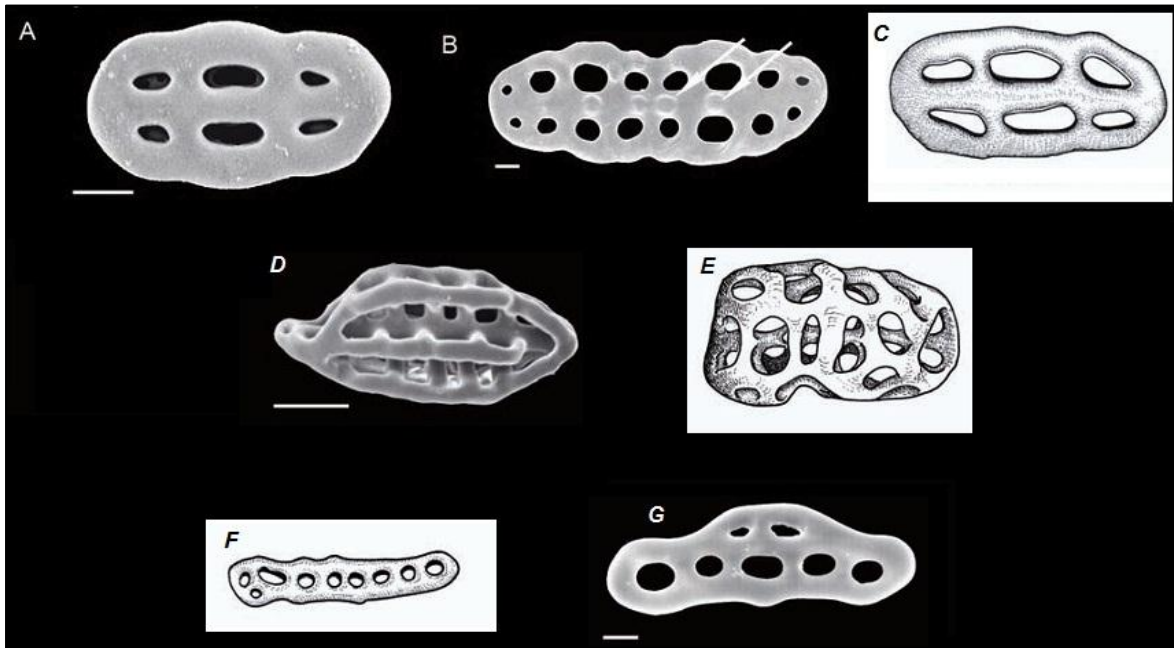


Figure 18 : Les boucles (Samyn *et al.*, 2006). A, C. type régulier et lisse; B. type régulier et légèrement rugueux (flèches) ; D, E. Ellipsoïde fenestré ; F, G : Pseudo-boutons. Echelle A-B-D-E = 10 μ m.

IV.2.2.1. Ellipsoïde fenestré et Pseudo-bouton

L'ellipsoïde fenestré (Fig. 18) est un bouton à nodules interconnectés formant une structure tridimensionnelle dont le nombre, la taille et l'arrangement des trous et nodules sont variables (Samyn *et al.*, 2006). Le pseudo-bouton (Fig. 18) est un bouton incomplet ou réduit (Samyn *et al.*, 2006).

IV.2.3. Plaques perforées

Ce sont des spicules de tailles et de structures variables. Elles sont généralement séparées sur la base du ratio longueur/largeur, de leur rugosité, de leur épaisseur, de leur arrangement et du diamètre de leur perforations (Samyn *et al.*, 2006) (Fig. 19).

IV.2.3.1. Plaque terminale

Une plaque terminale est un ossicule multiperforé que l'on trouve dans la partie terminale des pieds ambulacraires (Fig. 19). Complètement formées les plaques terminales ont une forme circulaire dont le centre est souvent légèrement concave. Le nombre, la taille, l'arrangement et la régularité des perforations varient entre les taxa supérieurs. Le diamètre de la plaque terminale est variable (75-1000 μ m de diamètre), bien que dans certains groupes elle est spé-

cifique. Les trous centraux peuvent être recouvert par une croissance secondaire et former une trame irrégulière. La plaque terminale est faite d'une ou de plusieurs pièces (Samyn *et al.*, 2006).

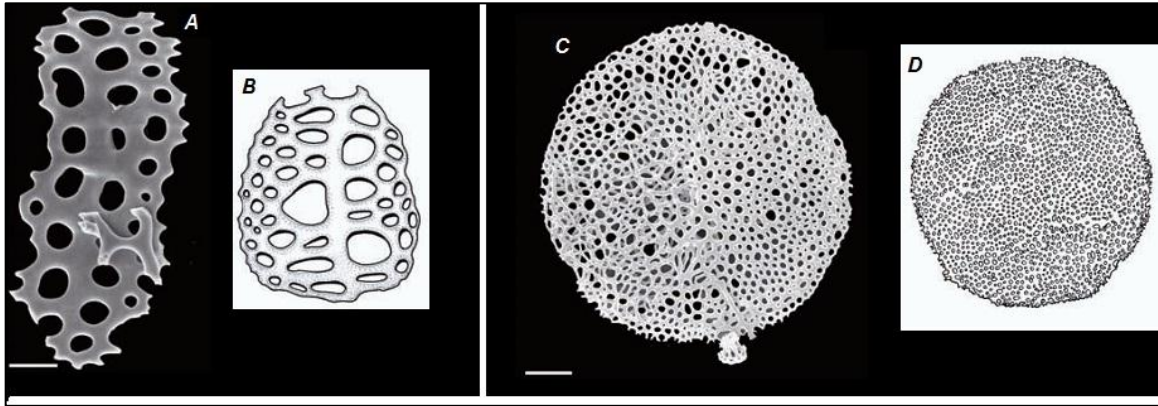


Figure 19 : Les plaques perforées (Samyn *et al.*, 2006). A, B. plaques perforées ; C, D. plaque terminale. Echelle. A= 25 µm ; C = 100 µm.

IV.2.4. Bâtonnets

Ce sont des ossicules en forme de baguette allongée, lisse ou épineuse, simple ou ramifiée, perforée ou non, qui peut être renflée au centre et/ou distalement (Fig. 20). Les bâtonnets sont présents dans les podia, les papilles, les tentacules (Samyn *et al.*, 2006).

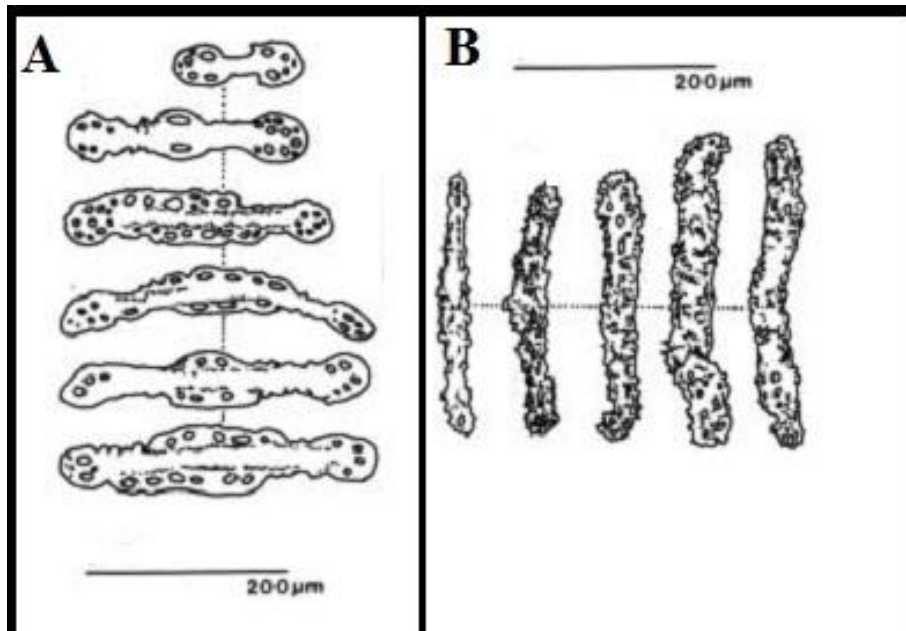


Figure 20 : Les bâtonnets de l'espèce *Holothuria (H.) mammata* (Zavodnik, 2003).

IV.3. Préparation des spicules

IV.3.1. Pour la microscopie photonique

Nous avons déjà mentionné que la morphologie, la taille et la distribution des spicules dans les différents tissus constituent des caractères clefs dans la détermination et la classification des holothuries. Pour isoler les spicules, il faut prélever un petit bout d'une structure spécifique (attention à ne pas mélanger les différentes structures en prélevant des pièces trop grandes), la placer sur une lame porte objet, y ajouter une goutte d'eau de Javel commerciale (produit ménager) et attendre jusqu'à ce que les tissus soient complètement dissous, L'eau de Javel est fortement basique et peut corroder les spicules si elle n'est pas préalablement neutralisée. Certains auteurs (Tiago *et al.*, 2005) préconisent l'utilisation d'enzyme proteolitiques à la place de l'eau de Javel. Cependant pour les préparations microscopiques l'eau de Javel convient parfaitement (Fig. 21).

Pour une préparation temporaire (quelques heures) il suffit de placer une lame couvre objet sur la préparation et observer au microscope. Si les spicules doivent être conservés il faut, avant de mettre une lame couvre objet, rincer la préparation à l'eau distillée (au moins quatre à sept fois, pour éviter la formation de cristaux de sodium). Quand il n'y a plus de traces, ni de Javel, ni d'eau, la préparation est prête pour une fixation permanente. Ceci se fait avec un milieu de montage neutre comme l'Euparal (Fig. 21).

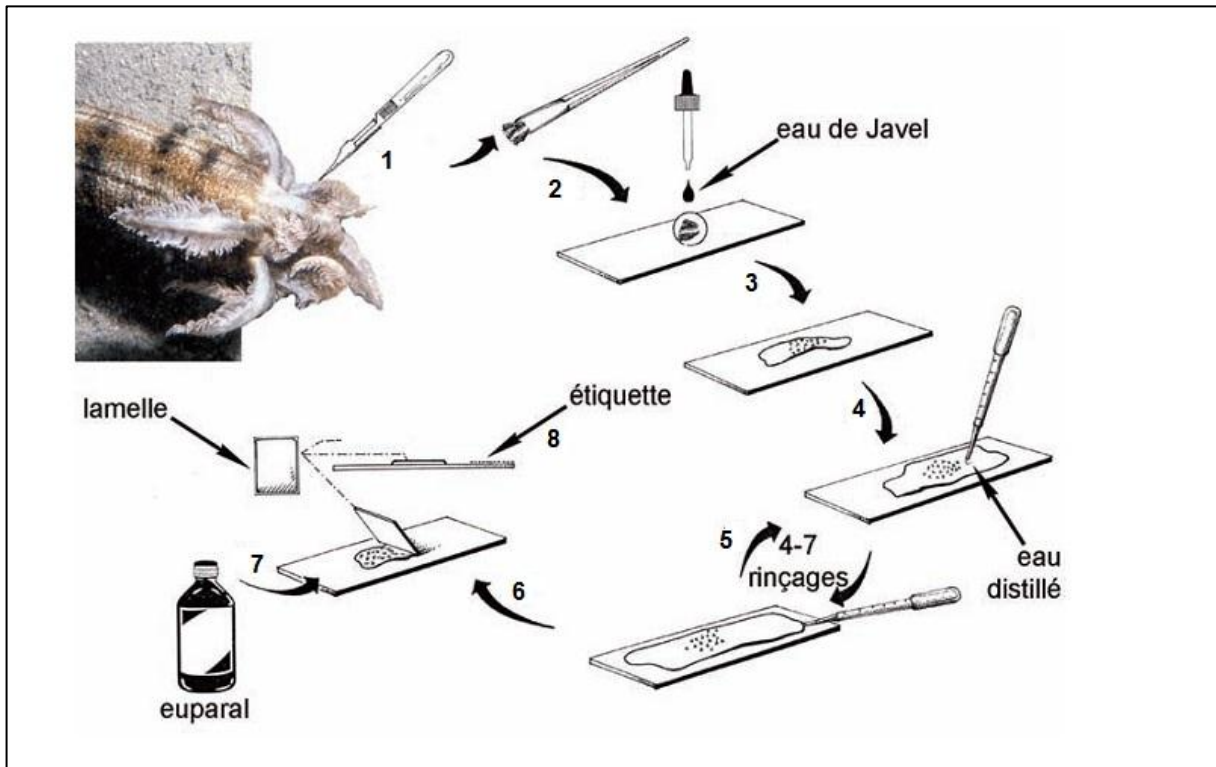


Figure 21 : Les différentes étapes dans la préparation des spicules (In Samyn *et al.*, 2006).

1. prélever une structure précise (attention de ne pas contaminer votre échantillon avec d'autres structures) ; 2. La placer dans une goutte d'eau de Javel sur une lame porte objet ; 3. Attendre la dissolution des tissus ; 4. Lorsque les spicules sont visibles rincer la préparation à l'eau distillée ; 5. Faire plusieurs rinçages pour éliminer toute l'eau de Javel (4 à 7 fois) ; 6. Bien sécher la préparation ; 7. Mettre une goutte de milieu de montage (euparal) sur la lamelle couvre objet et recouvrir la préparation en évitant la formation de bulles d'air ; 8. Mettre une étiquette sur chaque préparation.

IV.3.2. Pour la microscopie électronique

Pour illustrer les spicules de nombreux scientifiques ont recouru à la microscopie électronique à balayage. Pour cette technique les spicules sont préparés comme pour la microscopie optique mais au lieu d'une lame de verre, ils sont préparés sur des supports en aluminium spécifiques, puis recouverts d'une fine pellicule d'or (Samyn *et al.*, 2006).

V. Ecologie

Les différentes espèces que nous allons citer, ont fait l'objet de notre étude taxonomique.

V.1. *Holothuria (Holothuria) tubulosa*

Essentiellement littorale, *Holothuria (H.) tubulosa* est l'une des espèces les plus communes de la méditerranée (Azzolina et Harmelin, 1989 In Mezali, 2008). Cette espèce peut être retrouvée entre -0.5 et -100 m de profondeur et fréquente différents biotopes tel que: sable, vase, sous les pierres, à la base des rochers côtiers ainsi qu'au niveau de l'herbier à *Posidonia oceanica* (Mezali, 2004b ; 2008). *Holothuria (H.) tubulosa* est souvent associées à *Holothuria (R.) poli* dans l'herbier de Posidonies ou sur le fond rocheux (Francour, 1990).

V.2. *Holothuria (Roweothuria) poli*

Holothuria (R.) poli est une espèce essentiellement méditerranéenne et littorale, vivant entre 0 et -12 m de profondeur et peut même être retrouvée entre -80 et -250 m de profondeur (Cherbonnier, 1956). Cette espèce fréquente des biotopes très variés : sable, vase détritique, roche, Caulerpe et herbier de Posidonies (Francour, 1984).

V.3. *Holothuria (Holothuria) stellati*

Holothuria (Holothuria) stellati existe en méditerranée, notamment dans le Golfe de Naples près de l'île d'Ischia (Italie) (Gustato et Villari, 1979b ; Mezali, 2008) et dans le Golfe de Palermo in Sicile. Souvent, *H. (H.) stellati* se rencontre avec *H. (H.) tubulosa* sur les fonds sableux des herbiers sous-marins ou à la base des rochers côtiers (Cherbonnier, 1959 ; Mezali, 2008). Le statut taxonomique de *H. (H.) stellati* a été le sujet de beaucoup de discussion et beaucoup de changements. Sa position taxonomique reste ambiguë.

V.4. *Holothuria (R.) arguinensis*

Holothuria (R.) arguinensis est une espèce qui fréquente la partie Nord-Est de l'Atlantique, des îles Berlengas (Portugal) au Maroc et en Mauritanie, y compris les îles Canaries. Elle a été signalée pour la première fois dans la mer Méditerranéen (Mer d'Alborant) en 2003 par (Ocana et Pérez-Ruzafa, 2004). *Holothuria (R.) arguinensis* ne réfugie pas dans les anfractuosités, par contre elle reste visible sur le sable ou les herbiers marine. Habite en générale la zone de balancement des marées. Elle est capable de supporter des périodes de sécheresse pendant les marées basses (Gonzalez-Wangüemert et Borrero-Pérez, 2012). Cette espèce a été signalée pour la première fois dans la côte algérienne par Mezali et Thandar (2014).

V.5. Reproduction et cycle de vie

Il existe deux types de reproduction chez les holothuries : la reproduction sexuée et la reproduction asexuée. Au moment de la reproduction sexuée, certaines espèces prennent souvent une curieuse position verticale en se dressant sur la partie postérieure. Elles se rassemblent et émettent leurs produits génitaux dans l'eau de mer (Fig. 22). La ponte est favorisée par une augmentation de la température de l'eau et a lieu généralement en été (Hamel et Mercier, 1996).

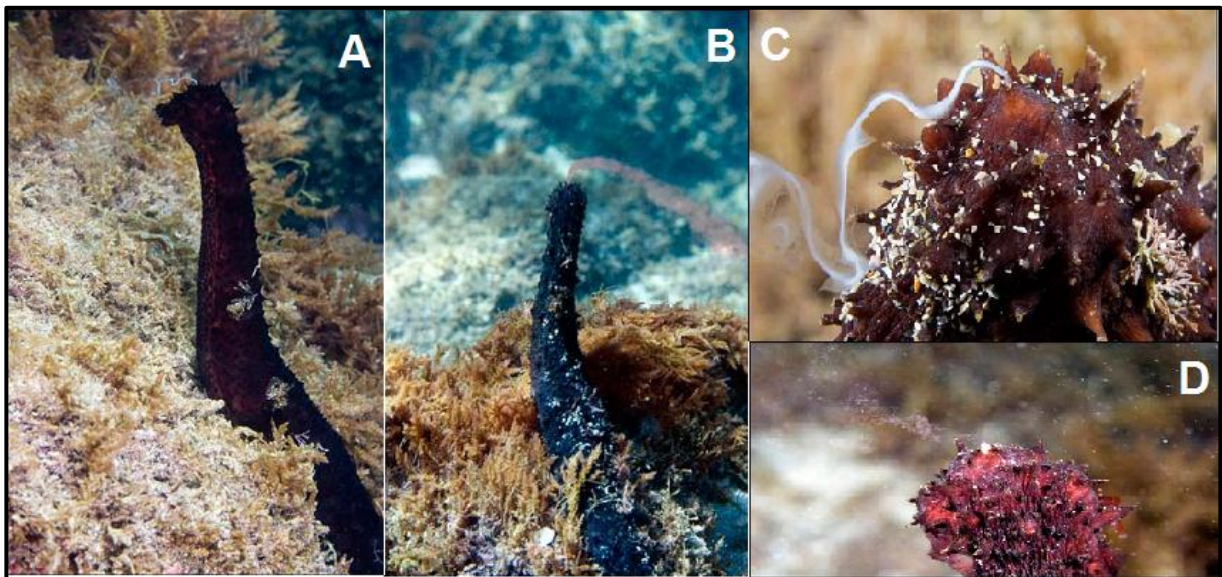


Figure 22 : Reproduction sexuée chez *H. (H.) tubulosa* (Bertoncini *et al.*, 2008). A : Spécimen mâle de *H. tubulosa* en train d'émettre des gamètes ; B : Femelle de *H. (H.) tubulosa* en train d'émettre des œufs ; C : émission de sperme par un spécimen mâle de *H. (H.) tubulosa* ; D : émission d'œufs par une femelle de *H. (H.) tubulosa*.

La fécondation est externe et l'œuf fécondé donne naissance à une larve appelée auricularia (Fig. 23), qui se métamorphose à son tour en une larve doliolaria (Fig. 23) et enfin pentacula (Fig. 23), laquelle est caractérisée par cinq tentacules primaires. Ces larve sont planctoniques jusqu'à leurs métamorphoses en juvéniles benthique (Fig. 23).

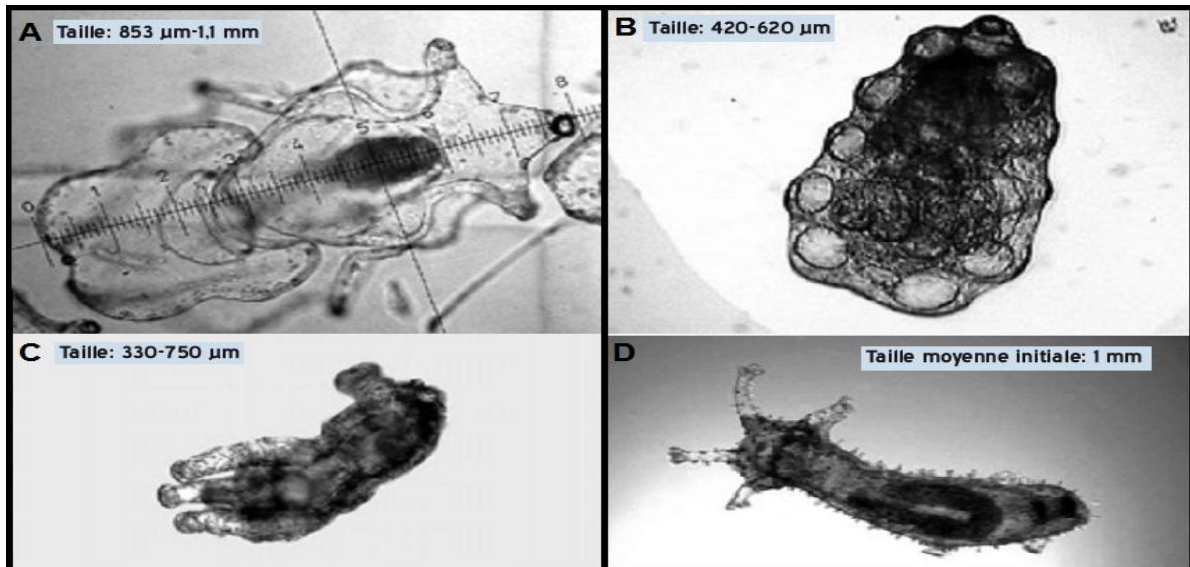


Figure 23 : les différents stades larvaires chez *H. (H.) scabra*. (Agudo, 2007). A : Larve auricularia, stade avancé ; B : Larve doliolaria ; C : Larve pentactula ; D. Juvénile.

Les holothuries peuvent présenter un mode de reproduction asexuée durant la saison froide ou chaude (cas de *H. (F.) hilla*) (Fig. 24). L'holothurie se divise par scission transversale (Koebler, 1921; Bonham et Held, 1963). La régénération des parties manquantes dans chaque moitié demande environ un mois (Conand et De Ridder, 1990).



Figure 24 : Individus *Holothuria (F.) hilla* après scission (Lee *et al.*, 2008). Individu postérieur (en haut) et individu antérieur (en bas). Les flèches indiquent les zones en régénération.

VI. Valeur économique des holothuries

VI.1. Pêche et commercialisation (Bêche-de-mer)

Outre leur importance écologique, les "concombres" de mer représentent une ressource économique appréciable pour de nombreuses populations. Les captures totales pour les régions de l'Asie et de l'Océanie sont de l'ordre de 20 000 à 40 000 tonnes par an ; les zones tempérées de l'hémisphère Nord prélèvent, aussi, une part considérable des prises mondiales (9 000 tonnes par an), alors que les prises d'holothuries sont relativement moins importantes en Afrique et dans l'océan Indien (2000 à 25000 tonnes par an), et elles sont particulièrement faibles en Amérique latine et dans la région des Caraïbes (moins de 1000 tonnes par an) (Toral-Granda *et al.*, 2009) due à la non exploitation de ces espèces. Une fois pêchées, elles sont éviscérées et leur chair est lavée et traitée (au sel, à l'eau bouillante et à la chaleur) pour devenir le produit exporté alors appelé "trévang" ou "bêche-de-mer" (Fig. 25) (Samyn *et al.*, 2006 ; Toral-Granda, 2006). Le commerce de la "bêche-de-mer", est l'une des formes les plus anciennes de commerce dans les îles du Pacifique (Conand et Byrne, 1993); il vise essentiellement à satisfaire les marchés orientaux d'aliments de luxe. Les principaux pays de consommation sont la Chine, Hong Kong, Taïwan, Singapour, la Corée et la Malaisie (Ferdouse, 2004) ; *Holothuria scabra*, *Holothuria fuscogilva* et *Holothuria nobilis* sont les espèces, les plus prisées. Economiquement, la pêche des holothuries dans les îles Fidji (pays de l'Océanie) apporte environ 50 million de dollars par an. Elle est en deuxième position après la pêche du thon⁷. Au marché de Hong-Kong les prix de gros pour ces animaux varient de 50 à 400 dollars le kilo, en fonction de l'espèce pêchée. L'holothurie de sable, de haute qualité, peut dépasser les 1.000 dollars au kilo gramme.

Les holothuries possèdent une valeur nutritionnelle élevée car elles sont riches en protéines, pauvres en lipides, riches en acides aminés et en oligo-éléments ; autant de caractéristiques qui en font un aliment très prisé (Chen, 2004 *In* Mezali, 2008).

⁷ Bulletin de la CPS La bêche-de-mer #35- mars, 2015



Figure 25 : Préparation d'holothuries en bêche-de-mer (Samyn *et al.*, 2006). A : Spécimens frais éviscérés par une incision longitudinale ; B : Cuisson à l'eau des spécimens éviscérés ; C : Séchage au soleil pendant plusieurs jours.

VI.2. Valeur pharmaceutique

L'attrait des peuples asiatiques pour les concombres de mer vient du fait qu'ils sont convaincu de leur grande valeur nutritive et de leurs vertus qui aideraient à combattre une panoplie de maux et de maladies : une alimentation à base de concombres de mer réduirait la fatigue, les douleurs articulaires et l'arthrite, elle aiderait à restaurer les fonctions intestinales et urinaires défaillantes, à renforcer le système immunitaire des consommateurs. Ces nombreuses vertus seraient dues à la présence de biomolécules actives tels que des triterpènes glycosides (Sapogenines) (Mezali *et al.*, 2015), divers peptides et des acides gras essentiels. Des essais pharmacologiques récents réalisés par des groupes de recherches chinois et japonais, viennent étayer les effets thérapeutiques de ces molécules qui, en fonction des espèces et des méthodes d'extraction, se sont révélées être des anti-angiogéniques, des anticoagulants, des hypotenseurs ou des anti-inflammatoires⁸.

Le Japon, a fait breveter le sulfate de chondroïtine tiré d'holothuries pour le traitement du sida (In Micael *et al.*, 2009). Une nouvelle étude a démontré que l'extrait de concombre de mer tue jusqu'à 95 % des cellules du cancer du sein, 90 % des cellules du mélanome, 95 % des cellules du cancer du foie et 88 % des cellules de cancer du poumon. L'extrait stimule aussi le système immunitaire contre le cancer et entrave le processus clé requis pour la création de métastase. Le concombre de mer est utilisé en médecine chinoise depuis des siècles⁹.

⁸ <http://www.polyaquaculture.mg/> (12/10/2014)

⁹ <http://www.flashesante.com/concombre-de-mer-tue-cancer/> (13/10/2014)

VI.3. Aquaculture

Sur le marché asiatique des fruits de mer séchés, les holothuries de sable *Holothuria scabra* et les holothuries de sable versicolores *H. lessoni* se négocient à des prix plus élevés que n'importe quelles autres espèces tropicales d'holothuries (Daniel et Ivy, 2010). L'augmentation de la pression de la pêche exercée sur ces espèces vulnérables en milieu naturel (Conand, 2004) est à l'origine de l'explosion du prix des holothuries transformées ou bêche-de-mer. Par conséquent, plusieurs pays ont mis en place ces dernières années des mesures de gestion rigoureuses pour protéger les populations d'holothuries en déclin (Bell *et al.*, 2008 ; Friedman *et al.*, 2008). Le prix avantageux des bêches-de-mer et la diminution des populations en milieu naturel ont particulièrement éveillé l'intérêt des organismes publics et privés qui se sont penchées sur la conception d'autres méthodes de production de bêche-de-mer, notamment par le biais de l'aquaculture (Eeckhaut *et al.* 2008) (Fig. 26). L'aquaculture des holothuries apporterait une solution durable, en permettant à la fois de repeupler les stocks appauvris d'holothuries en milieu naturel, et de produire suffisamment de bêches-de-mer pour répondre à la demande croissante du marché asiatique.



Figure 26 : Aquaculture des holothuries ; Nutrition des géniteurs de *Holothuria (H.) Scabra* (Agudo, 2007).

Chapitre 02 :

Matériel et Méthodes

I. Objectifs de l'étude

La présente étude fait l'objet d'une révision systématique des données morphologiques endosquelettiques (sclérites) et moléculaires (ADN) de quelques espèces d'holothuries aspidochirote de la côte algérienne. *Holothuria (H.) tubulosa* B qui est une variante d'*Holothuria (H.) tubulosa* A ; *Holothuria (Holothuria) stellati* souvent confondue avec *H. (Roweothuria) arguinensis* qui est une espèce d'origine Atlantique qui a envahit récemment la Méditerranée occidentale (Mezali et Thandar, 2014) et *Holothuria(Roweothuria) poli*.

Notre étude est basée sur une partie de données de Mezali (2008). La présente étude comme nous l'avons souligné auparavant a été abordée selon deux axes : 1) le premier axe concerne la révision des caractéristiques morphologiques et particulièrement endosquelettiques (sclérites) de ces espèces à partir de photos et planches obtenues par Mezali (2008) en utilisant des logiciels couramment utilisé en géométrie morphologique comme ["ImageJ" (imagej.nih.gov/ij)] et « Photoshop VII ». 2) le deuxième axe concerne l'étude et la comparaison des données moléculaires [traitement des séquences d'ADN obtenues par Mezali (2008) par d'autres logiciels couramment utilisés en bioinformatique ; ces séquences ont été également comparés avec ceux obtenue dans [GenBank]. Enfin une étude phylogéographique a été abordé par l'étude des haplotypes en considérant les séquences d'ADN analysés dans notre étude combinées à ceux obtenus dans d'autres régions méditerranéennes (par GenBank) et ceci pour étudier le phénomène de spéciation et la connectivité de ces espèces d'holothuries.

I.1. Étude de l'endosquelette (sclérites)

Les photos des sclérites ont subis un traitement spéciale par "PhotoshopVII" afin d'augmenter leur qualités. Les sclérites ont été classé et organiser puis décrits et comparées avec ceux de la littérature. Des mesures ont été également effectuées sur les sclérites en considérant l'échelle appropriée précédemment utilisée par Mezali (2008). Les données obtenues (mensurations) ont été utilisés comme un jeu de donnée dans les différentes méthodes statistique utilisées [Classification ascendante hiérarchique (CAH), analyse discriminante, analyse canonique (analyse factorielle discriminante)].

I.2. Étude des séquences d'ADN

Les séquences nucléotidiques d'ADN obtenus par Mezali (2008) ont été traités (alignement, nettoyage) par plusieurs logiciels. D'autres logiciels ont été utilisés afin de construire l'arbre phylogénétique et d'élaborer les haplotypes. Nos résultats ont été comparés avec ceux de la littérature.

Cette étude été très motivante car la systématique des holothuries est restée floue dans littérature avec des débats sans fin sur la classification de ces espèces d'échinodermes. Mezali (2008), a même suggéré que la population *H. (H.) tubulosa B* présente dans la côte algérienne est nouvelle pour la science après les différentes analyses préliminaires réalisées sur cette population. Le but de notre travail est de confirmer le statut taxonomique de ces espèces en utilisant des techniques nouvelles de géométrie morphologique et de bioinformatique ainsi que par un traitement statistique poussé sur les données obtenus (mensuration effectués sur les sclérites) des quatre espèces considérées dans notre étude.

II. Présentation des sites d'étude

Des échantillons d'espèces d'holothuries ont été prélevés essentiellement dans trois stations situées au centre de la côte Algérienne (Sidi-Fredj, Tamentefoust et Figuier-plage). Une autre station située dans la partie ouest de la côte algérienne (Stidia) a été considérée. Une autre station située dans la côte française (Banyuls-sur-Mer) a été considérée (surtout pour l'étude phylogéographiques). Ces cinq stations sont situées dans la zone superficielle ou peu profonde de l'herbier à *Posidonia oceanica*. Ces prélèvements ont été effectués par Mezali (2008) en plongée (scaphandre autonome).

II.1. Description de stations étudiées

II.1.1. Station de Sidi-Fredj

Cette station est située dans la presqu'île de Sidi-Fredj qui appartient à la baie de Bou-Ismaïl, et se trouve à 20Km à l'Ouest d'Alger (Fig. 27). Ses coordonnées géographiques sont 2°50' Est et 36°45' Nord. La presqu'île de Sidi-Fredj est délimitée à l'Est par le Cap Ras Acrata et le Mont Chenoua à l'Ouest et est représentée par un grand îlot et un autre petit (Fig. 27).

La zone d'étude se situe entre les deux anses de cette presqu'île (l'anse Est et l'anse Ouest), elle couvre une superficie d'environ 500m². Sa profondeur varie de -0.5m à -9m. Le substrat est généralement de consistance meuble (sableux) et composé de mélange de blocs de différentes dimensions. Ce fond est occupé par un herbier de Posidonies relativement homogène, qui est entrecoupé par des inter-mattes. Ce fond est également caractérisé par la présence d'un support d'algue photophiles et d'une pelouse à *Cymodocea nodosa* (Mezali, 1998). La côte de Sidi-Fredj présente des habitations limitrophes et comprend plusieurs complexes touristiques marqués par une importante activité en période estivale. On cite particulièrement à titre d'exemple le centre de thalassothérapie près de la station étudiée (Mezali, 2008).

II.1.2. Station de Tamantefoust

Cette station est localisée sur le flanc Est de la baie d'Alger. Elle est située entre Bordj-El-Bahri et El-Marsa, et est abritée à l'Est par le Cap Matifou. Ses coordonnées géographiques sont 3°13' Est et 36°48' Nord (Fig. 27). La station choisie couvre une superficie d'environ 500m² (Mezali, 2008). Sa profondeur varie de -0.5m à -10m. Cette zone est caractérisée par

un herbier de *Posidonies* dégradé présentant en son sein des marmites de diamètre plus ou moins important, occupées par une litière épaisse (Semroude, 1993).

II.1.3. Station de Figuier-plage

Le site de Figuier-plage se situe à 60km à l'Est d'Alger (10km de Boumerdes) aux coordonnées 36°46' Nord de latitude et 3°30' Est. Ce site est localisé dans la partie centrale de la baie de Zemmouri (Fig. 27).

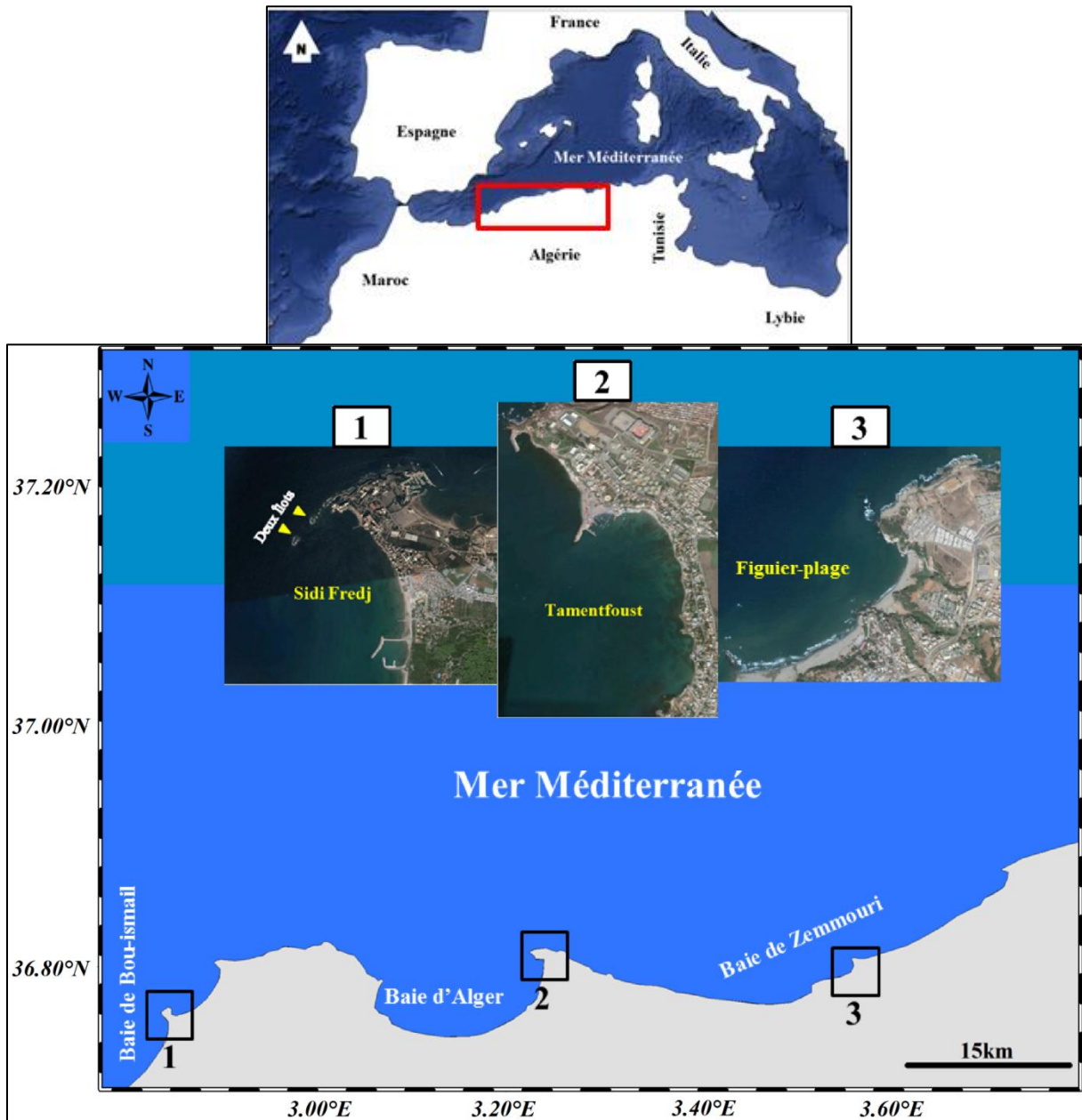


Figure 27 : Localisation des 3 stations de la partie centrale de la côte Algérienne (Google earth modifiée par Mansouri).

II.1.4. Station de Stidia

Le site de Stidia se situe à 15 Km à l'Ouest de Mostaganem aux coordonnées $35^{\circ} 50'$ Nord de latitude et $0^{\circ} 01'$ Ouest de longitude. Ce site se caractérise par la présence d'un petit port de pêche avoisinant, une petite ville touristique qui elle-même se trouve près d'une terre agricole. Ce qui assure un apport terrigène et rejets urbains continues (Mezali, 2007) (Fig. 28). Morphologiquement, ce site est dominé par un trait de côte rocheux avec des fonds sableux et on y trouve des prairies d'herbier à Posidonies qui ne sont pas en bon santé (Belbachir, 2012). Une autre station située sur la côte Française a été considérée (Annexe 01. Fig. I).

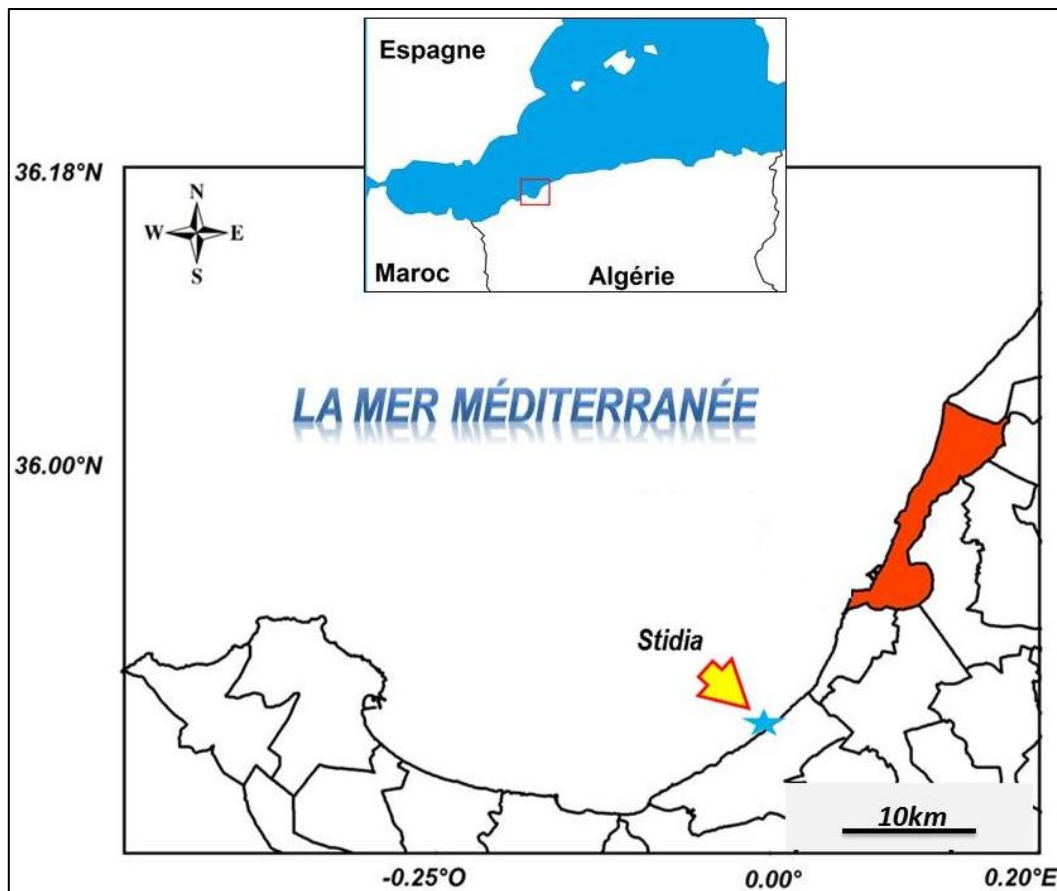


Figure 28 : Localisation de la station de Stidia (Mansouri, 2015).

III. Base de données

III.1. Données endosqueletique

Cette base de données est constituée d'images de sclérites de la face dorsale, la face ventrale, des podia et des tentacules, ces images sont sous format JPEG, avec l'échelle du grossissement adéquat (X10 ou X20) (Fig. 29).

III.2. Analyse des images

III.2.1. Méthode ancienne

En premier lieu on a adopté une méthode classique pour organiser, classer et mesurer les sclérites, cette méthode consiste à imprimer les images (les images ont un fond coloré, le plus souvent en orange) puis couper les sclérites en utilisant un ciseau. Ensuite, organiser les différents types d'ossicules et les coller sur une feuille blanche par une colle ordinaire. Une fois le classement terminé, on passe à la mesure des sclérites, en utilisant l'échelle déjà imprimée avec les images.

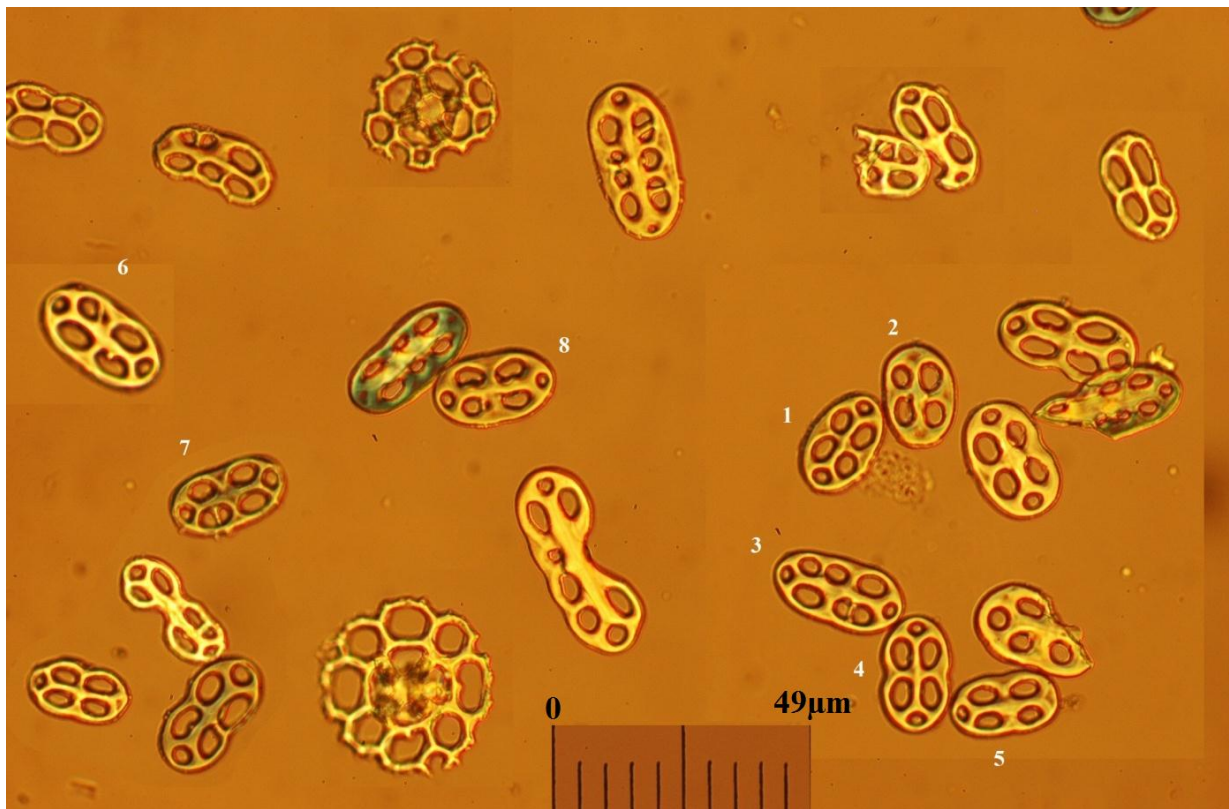


Figure 29 : Images des sclérites d'un individu de *H. (R.) poli* observé au microscope photonique grossissement 20 (avec l'échelle) (Mezali, 2008).

Cette méthode était très fastidieuse, elle prend beaucoup de temps. Par ailleurs, cette méthode ne nous a pas permis de faire certaines mesures, tel que : le périmètre, la surface des boucles, la surface des trous...etc. Ces variables sont très importantes et utiles pour la classification hiérarchique ascendante et l'analyse statistique en générale. Cette méthode ancienne est coûteuse en raison de l'arrière-plan colorée (lors de l'impression).

De plus, en faisant l'impression des sclérites, la qualité des images n'est pas très satisfaisante (perte d'informations). Ceci nous a obligés à penser de changer la méthode et à chercher une autre méthode plus adéquate, efficace et rapide !

III.2.2. Nouvelle méthode

Cette nouvelle méthode est basée sur l'utilisation d'un logiciel qui s'appelle "ImageJ". Donc, au lieu d'imprimer les images, on passe directement aux mesures des sclérites, Ce logiciel nous a permis d'obtenir une multitude de mesures, tel que : la surface et le périmètre des sclérites. Cette méthode est très efficace par rapport à la méthode ancienne (on peut zoomer sur les photos des sclérites tout en gardant une bonne qualité d'image).

Afin d'augmenter la qualité d'images, une autre logiciel a été utilisé qui est "Photoshop VII". Ce logiciel nous a permis de couper les sclérites et de les organiser par les différents outils qu'il dispose.

III.2.3. Mesures adoptées (les variables)

Nous avons choisi 26 variables afin de faire nos analyses statistiques. Le tableau 4 décrit d'une façon claire les différents types de variables utilisées. Pour chaque face (dorsale et ventrale) cinq boucles et tourelles ont été choisis et sélectionner pour les mesurer. Ces mensurations ont été effectuées sur un ensemble de 16 observations (individus), quatre individus pour chaque espèce.

Tableau 4 : Différents types de mesures effectuées sur les sclérites des holothuries étudiées.

Abréviations		Description du variable
LBfd [*]		Longueur des boucles de la face dorsale
IBfd [*]		Largeur des boucles de la face dorsale
SBfd		Surface des boucles de la face dorsale
PBfd		Périmètre des boucles de la face dorsale
NTBfd [*]		Le nombre de trous des boucles da la face dorsale
LBfv [*]		Longueur des boucles de la face ventrale
IBfv [*]		Largeur des boucles de la face ventrale
SBfv		Surface des boucles de la face ventrale
PBfv		Périmètre des boucles de la face ventrale
NTBfv [*]		Le nombre de trous des boucles da la face ventrale
STtBfd		Surface totale des trous des boucles de la face dorsale
STtBfv		Surface totale des trous des boucles de la face ventrale
Les mesures (variables) effectuées sur les Tourelles		
HFTfd [*]		Hauteur de la flèche des tourelles da la face dorsale
DdTfd [*]		Diamètre du disque des tourelles da la face dorsale
IFTfd		Largeur de la flèche des tourelles de la face dorsale
HFTfv [*]		Hauteur de la flèche des tourelles da la face ventrale
DdTfv [*]		Diamètre du disque des tourelles da la face ventrale
IFTfv		Largeur de la flèche des tourelles de la face ventrale
Les indices		
Abréviations	Formule	Description
FA [#]	IB/LB	C'est le ratio entre la largeur des boucles et la longueur des boucles, leur valeur variée entre 0 et 1. des petites valeurs de FA indiquent des boucles qui ont une forme allongées.
FC [#]	$4*\pi SB/PB^2$	C'est le ratio entre la surface de la boucle et la surface d'un cercle qui a le même périmètre. Leur valeur variée entre 0 et 1, FC=1 indique que les boucles ont une forme circulaire.
M [#]	STtB/SB	C'est le ratio entre la surface total des trous et la surface de la boucle, leur valeur variée entre 0 et 1, des grandes valeurs de M indiquent des petites boucles en tenant compte la surface de ses trous
K [*]	DdT/HFT	Ratio entre les deux variables prédéfinis.

(*) Signifiées les variables qui ont été déjà utilisées dans l'étude précédente Mezali (2008).

([#]) Indique que les variables ont été mesurées dans les deux faces (dorsale et ventrale). Donc pour la face dorsale on ajoute le suffixe « fd » et pour la face ventrale on ajoute le suffixe « fv », par conséquent FAFv= indice de la forme allongée des boucles de la face ventrale. (FA, FC, M, ont été uniquement effectuées sur les boucles)

III.3. Analyse statistiques des données endosquelettiques (sclérites)

On a résumé les observations quantitatives (mensurations) obtenue, sous forme de quelques paramètres, à savoir la moyenne et l'écartype (moyenne \pm écart-type)

III.3.1. Calcul de la moyenne arithmétique

La moyenne, ou paramètre de position, sert à caractériser l'ordre de grandeur des observations ; (Dagnelie, 1973, *In* Belbachir, 2012). Le calcul de la moyenne est réalisé à partir de formule suivante :

$$m = \sum xi/n$$

Avec : X_i = valeurs observés ; n = nombre d'observation.

III.3.2. Calcul de la variance et de l'écart-type

Le calcul de la variance d'une variable discrète composée de n observation est réalisé à partir de la formule suivante :

$$S^2 = \sum(x_i - m)^2/n$$

Avec S^2 = variance.

L'écart-type (ou paramètre de dispersion) permet de chiffrer la variation autour du paramètre de position qui est la moyenne (Dagnelie, 1973 *In* Belbachir, 2012). L'écart-type est la racine carrée de la variance, sa formule est la suivante :

$$S = \sqrt{\sum(x_i - m)^2/n}$$

Avec S = écart-type

III.3.3. Classification automatique

La classification automatique est une méthode mathématique d'analyse de données pour faciliter l'étude d'une population d'effectif important (animaux, plantes, malade, gènes, etc.). (Lerman, 1981).

III.3.3.1. Clustering

L'objectif du clustering est de former des clusters tels que chaque cluster soit homogène (les éléments de chaque cluster doivent être le plus similaires possible) et les clusters doivent être hétérogènes entre eux (deux clusters doivent être le plus dissimilaires possible). La plupart des méthodes utilisent une mesure pour calculer la qualité d'un clustering en se basant sur une distance intra-cluster et une distance inter-clusters.

Les algorithmes cherchent alors à obtenir un clustering de qualité optimale, correspondant à une distance intra-cluster faible et une distance inter-clusters élevée.

III.3.3.2. Classification Hiérarchique

Cette méthode repose sur le principe de la formation de partitions emboîtées. Elle a pour but de former un ensemble de partitions de l'ensemble des n individus en classes de moins en moins fines. Ces classes sont obtenues par regroupements successifs des individus, en commençant par les individus les plus proches. À chaque étape de regroupement, le principe sera le même, réunir dans une classe, les individus les plus proches (objectif d'homogénéité des classes). Plus on avance dans le regroupement des individus, plus les individus présenteront des différences. Il faut donc tenir compte de cet aspect pour délimiter le nombre de classes finalement retenu¹⁰.

Il ne s'agit pas d'une méthode manuelle mais d'une classification basée sur l'algorithme qui utilise un critère d'agrégation (regroupement des individus dans diverses classes), basé sur un critère de distance.

¹⁰ <http://www.jybaudot.fr/> (10/11/2014)

III.3.3.3. Classification ascendante hiérarchique (CAH)

La classification ascendante hiérarchique (Fig. 30) est l'idée de créer à chaque étape une partition obtenue en agrégeant 2 à 2 les éléments représentés sous forme de vecteurs les plus proches en sachant qu'un élément est un individu ou groupe d'individus donc par principe chaque point ou individu ou cluster est progressivement « absorbé » par le cluster le plus proche.

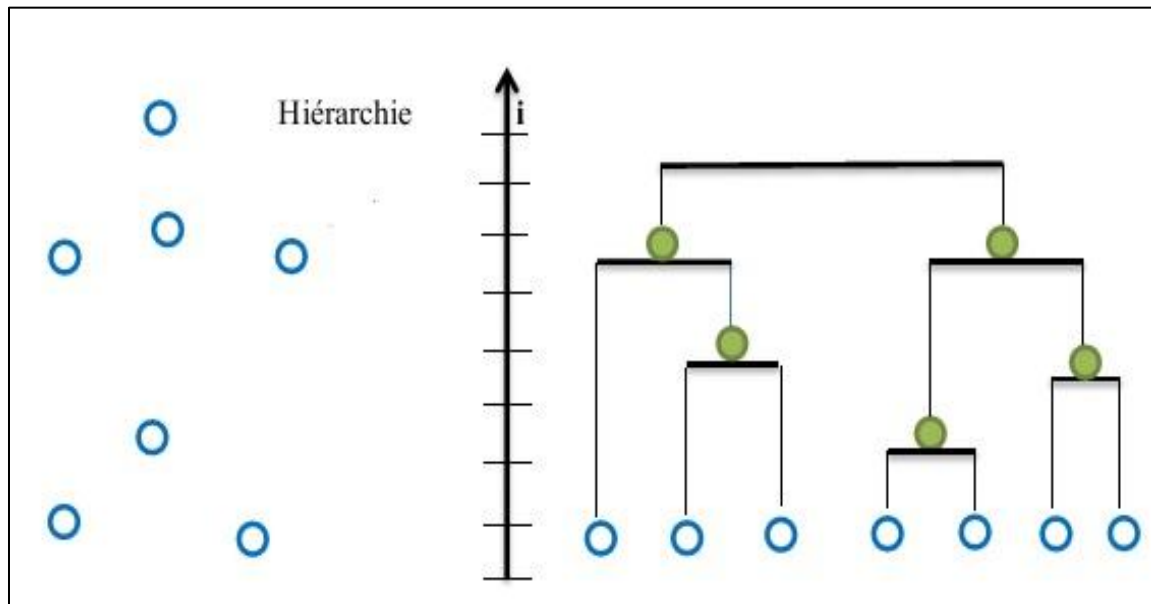


Figure 30 : Exemple d'une classification ascendante hiérarchique.

III.3.3.3.1. Avantages du CAH

La (CAH) est une méthode de classification qui présente les avantages suivants :

- On travaille à partir des dissimilarités entre les objets que l'on veut regrouper. On peut donc choisir un type de dissimilarité adapté au sujet étudié et à la nature des données ;
- L'un des résultats est le dendrogramme, qui permet de visualiser le regroupement progressif des données. On peut alors se faire une idée d'un nombre adéquat de classes dans lesquelles les données peuvent être regroupées ;
- L'algorithme du « CAH » en générale consiste à fournir un ensemble de partitions de moins en moins fines obtenues par regroupement successifs de parties ;

L'algorithme fondamental de classification ascendante hiérarchique se déroule de la façon suivante :

- ✓ Il y a "n" éléments à classer (qui sont les n individus) (Fig. 31) ;
- ✓ On construit la matrice de distances entre les n éléments et l'on cherche les deux plus proches, que l'on agrège en un nouvel élément. On obtient une première partition à n-1 classes;
- ✓ On construit une nouvelle matrice des distances qui résultent de l'agrégation, en calculant les distances entre le nouvel élément et les éléments restants (les autres distances sont inchangées). On se trouve dans les mêmes conditions qu'à l'étape 1, mais avec seulement (n-1) éléments à classer et en ayant choisi un critère d'agrégation. On cherche de nouveau les deux éléments les plus proches, que l'on agrège. On obtient une deuxième partition avec n-2 classes et qui englobe la première ;
- ✓ On calcule les nouvelles distances, et l'on réitère le processus jusqu'à n'avoir plus qu'un seul élément regroupant tous les objets et qui constitue la dernière partition. Nous illustrons cette procédure en prenant comme objets à classer cinq points (Fig. 32).

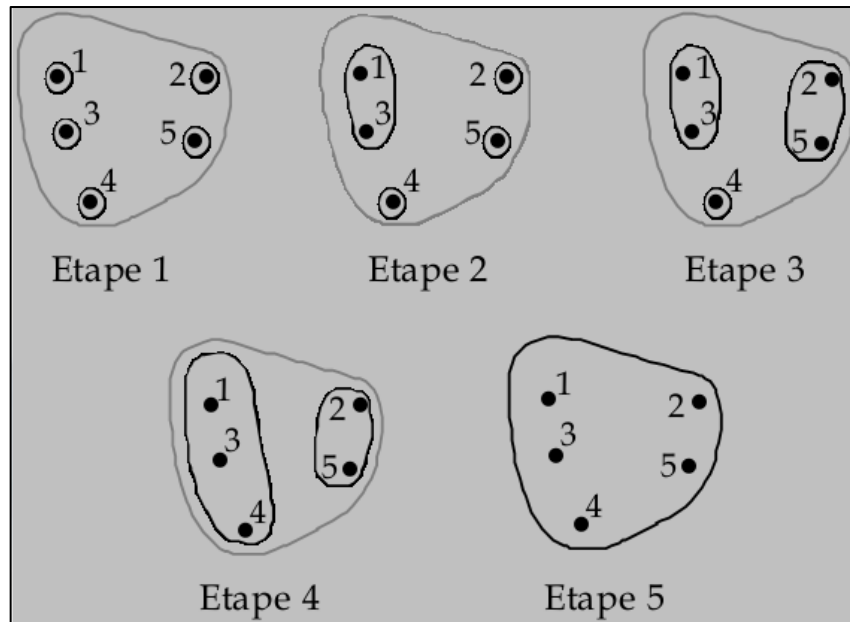


Figure 31 : Exemple d'agglomération progressive de 5 points

III.3.3.3.2. Définition du critère de distance

Le plus souvent on utilise le carré de la distance euclidienne usuelle. Supposons que nous observons k caractères ($X_1, X_2 \dots X_k$) sur un ensemble d'individus, la distance euclidienne (le carré) entre deux individus du groupe (individus A et B) sera donnée par : $d^2(A, B) = \sum_{j=1}^K (X_{Aj} - X_{Bj})^2$

III.3.3.3.3. Méthode de Ward

La méthode de Ward (minimisation de la variance intragroupe) (Ward, 1963) est la plus adaptée pour réaliser une CAH. Cette technique d'agrégation est représentée par un dendrogramme qui facilite l'interprétation des résultats.

III.3.4. Analyse discriminante

L'analyse discriminante est utilisée pour déterminer les variables qui permettent de discriminer deux ou plusieurs groupes se produisant naturellement. La méthode la plus utilisée est l'analyse discriminante linéaire de Fisher (Fisher, 1936).

III.3.4.1. Analyse pas-à-pas ascendante

Dans l'analyse discriminante pas-à-pas, le logiciel (Statistica VI ou autre) construit un modèle de discrimination pas-à-pas. Plus précisément, à chaque étape, le logiciel examine toutes les variables et évalue celle qui contribue le plus à discriminer les groupes. Cette variable est alors introduite dans le modèle, puis on passe à l'étape suivante.

III.3.4.1.1. Test de pouvoir discriminant

➤ Lambda de Wilk

Le lambda de Wilk (Λ_{Wilk}) est une statistique qui compare simultanément plusieurs moyennes en mesurant la part d'inertie intraclasse dans l'inertie totale. Plus précisément, c'est le déterminant de la matrice des variances-covariances intraclasse divisé par le déterminant de la matrice des variances-covariances totale. Il est donc compris entre 0 (bonne discrimination) et 1.

L'approximation F du Lambda de Wilk se calcule en suivant les formules de Rao (1951).

Le Lambda partiel se calcule comme l'incrément multiplicatif dans Lambda qui résulte de l'ajout de la variable respective :

$$\text{Lambda partiel} = \text{Lambda (après)}/\text{Lambda (avant)}$$

En d'autres termes, le Lambda partiel représente le ratio du Lambda de Wilk après avoir ajouté la variable respective, sur le Lambda de Wilk avant l'ajout de la variable.

La statistique correspondante du F (Rao, 1965) se calcule ainsi :

$$F = [(n-q-p)/(q-1)] * [(1-\text{lambda partiel})/\text{lambda partiel}]$$

n : représente le nombre d'observations ;

q : représente le nombre de groupes ;

p : représente le nombre de variables.

III.3.5. Analyse canonique

Pour notre étude, il a été difficile de trouver des références qui résument et présentent bien l'analyse canonique en général et tous les liens qui en découlent. Les terminologies et les présentations sont souvent très différentes d'un auteur à l'autre. L'analyse canonique est souvent négligée dans les manuels de statistiques ou elle est présentée en dernier lieu comme méthode alternative et difficile à appliquer (interprétation des résultats complexes). Pourtant, presque tous les auteurs s'entendent pour dire que l'analyse canonique contient un contexte théorique général de plusieurs méthodes d'analyse de données.

III.3.5.1. Définition

Le terme canonique en mathématique veut dire simplicité, régularité, structure fondamentale et de base. C'est la forme réduite la plus simple et la plus compréhensive de relations ou de fonctions. Par exemple, la forme canonique d'une matrice de covariance est la matrice des vecteurs propres (Francoeur, 2006).

➤ Principe

L'analyse canonique s'intéresse à l'étude des relations. Les relations sont contenues implicitement dans les matrices de variances-covariances des groupes de variables. Le principe général en analyse canonique est d'analyser les vecteurs propres des différentes structures de matrices de variances et de covariances. Les relations sont donc résumées dans les diverses variables canoniques. Ces variables sont souvent définies par des vecteurs propres comme combinaisons linéaires des variables originales (Francoeur, 2006).

III.3.5.2. Analyse canonique discriminante (Analyse factorielle discriminante)

III.3.5.2.1. Description et but

Cette méthode consiste à la recherche de combinaisons linéaires (variables canoniques ou fonctions discriminantes) de variables quantitatives du premier groupe qui séparent le mieux les g classes (deuxième groupe de variables). Ces combinaisons linéaires sont construites selon le même principe que l'analyse des corrélations canoniques. Les résultats permettront d'attribuer une des g classes à un nouvel individu qui possède les caractéristiques du premier groupe de variables. Donc le but de cette analyse est de séparer et classer des individus (Francoeur, 2006).

III.4. Données des séquences d'ADN

Dans la présente étude nous n'avons fait ni extraction de l'ADN ni la PCR, parce que ces procédures nécessitent beaucoup de temps et demandent beaucoup de moyen et matériels coûteux. Le but principal est de manipuler et d'appliquer plusieurs logiciels couramment utilisés en bioinformatique sur des données moléculaires déjà obtenus par Mezali (2008) ainsi que sur quelques séquences d'ADN des espèces d'holothuries obtenus de GenBank pour la comparaison de nos résultats. Notre travail repose sur la visualisation des données des séquences d'ADN sur les différents logiciels disponibles sur internet et conçus pour les études moléculaires (nous avons utilisé des logiciels autre que le logiciel "Sequencher 4.8" utilisé par Mezali, 2008). Ceci nous a permis de manipuler ces logiciels pour réaliser le nettoyage des séquences d'ADN et aussi de comparer les résultats obtenus avec ceux de Mezali (2008).

III.4.1. Choix des marqueurs moléculaires

En phylogénies moléculaires, il faut utiliser une molécule dont l'évolution est en adéquation avec le niveau de différenciation des taxons étudiés. Ainsi, par exemple pour établir une phylogénie au niveau des familles d'organismes d'animaux, on utilisera un gène qui évolue lentement comme les gènes nucléaires. Alors que si l'on cherche à établir une phylogénie au niveau des genres proches ou d'espèces du même genre, on utilisera des gènes qui évoluent plus vite, comme les gènes mitochondriaux. Dans notre étude, la portion du gène ARNr 16S de l'ADN mitochondrial est utilisée.

III.4.2. Nettoyage et alignement

Le "nettoyage" des séquences d'ADN est la vérification visuelle de la bonne interprétation automatique des chromatogrammes. Les éventuelles erreurs d'interprétation ont été repérées et corrigées à l'aide du logiciel "Finch Tv 1.4" (Patterson *et al.*, 2006) (Annexe 01. Fig. II), puis par le programme "Codon Code Aligner 2009" (disponible sur le site web <http://www.codon-code.com/aligner>).

Ce dernier programme nous permet de comparer et de nettoyer plusieurs chromatogrammes à la fois. Pour avoir un bon alignement des séquences d'ADN, nous avons essayé d'éviter au maximum les trous ou "gaps" au niveau des séquences nucléotidiques.

III.4.3. Alignement

Les algorithmes d'alignement de séquences servent à positionner au mieux les sites de plusieurs séquences nucléiques ou protéiques les uns en-dessous des autres, pour que le plus grand nombre possible de positions de sites identiques coïncident. Les alignements permettent de reconstituer l'histoire évolutive des séquences, et les mutations qui ont eu lieu à partir de leur ancêtre commun. Comme la plupart des alignements ne peuvent être parfaitement ajustés, les algorithmes introduisent des trous dans les séquences, appelés lacunes, et qui sont représentés par un tiret « -- » pour chaque site manquant (Finkler, 2010).

Après les avoir corrigées, les séquences sont classées sur le logiciel « BioEdit » (Hall, 1999) et alignées en utilisant un autre programme le "CLUSTAL W" (Higgins *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1994) afin de mieux élaborer l'arbre phylogénétique.

III.4.4. Étude phylogénétique

Les relations entre individus ou populations sont visualisées via la construction d'arbres phylogénétique. Pour cela, nous avons utilisé la méthode du Maximum de vraisemblance (Cavalli et Edwards, 1967), en Anglais : "Maximum Likelihood" "ML" (Annexe 02). C'est une méthode qui se base sur la sélection de l'arbre qui maximise la vraisemblance (ayant la plus forte probabilité d'avoir conduit aux données). Cette méthode a été limitée par la puissance de calcul des ordinateurs des années 1960 et 1970, mais améliorée par l'algorithme de Pruning (Felsenstein, 1981).

La méthode «ML» trouve sa plus grande utilité dans les études phylogénétiques moléculaires. Cette technique manipule un outil mathématique, les matrices, particulièrement utile pour des caractères adoptant un nombre fini d'états déterminés. Par exemple, pour une étude génétique, seules 4 bases azotées sont possibles pour chaque nucléotide (Pagel, 2002).

III.4.4.1. Modèles d'évolution

Les modèles d'évolution moléculaire sont principalement utilisés pour modéliser les processus de mutation, pour estimer des distances évolutives entre séquences et pour reconstruire des arbres phylogénétiques (Finkler, 2010).

Une fois les séquences d'ADN ont été bien alignées nous procédons à l'élaboration de l'arbre phylogénétique. Mais avant cela, il faudrait trouver le meilleur modèle statistique qui pourrait

nous donner l'arbre le plus robuste. Pour cela, nous avons utilisé le programme "jModeltest 2.1.3" et "MEGA 5.0" (Tamura *et al.*, 2011).

Le modèle de Kimura à 2 paramètres (K2P + Gamma distribution) été le plus adéquat (Annexe 03. Tab. I). Nous avons aussi utilisé "MEGA 5.0" afin de construire l'arbre phylogénétique en utilisant la méthode du Maximum de vraisemblance "ML".

III.4.4.1.1. Modèle de Kimura à 2 paramètres

Ce modèle est basé sur les observations suivantes :

- tous les sites évoluent indépendamment et selon le même processus ;
- les substitutions se produisent suivant deux taux distincts, l'un pour les transitions, l'autre pour les transversions, les transitions étant plus fréquentes (transition = A↔G ou T↔C ; purine par une purine ou d'une pyrimidine par une pyrimidine).

La distance de Kimura à deux paramètres est donnée par la formule suivante où p et q sont respectivement les fréquences observées des transitions et des transversions (Kimura, 1980).

$$d = -\frac{1}{2} \log[(1 - 2p - q)\sqrt{1 - 2q}]$$

III.4.5. Etude phylogéographique

Les relations entre les haplotypes peuvent être appréhendées par la construction de réseaux d'haplotypes (Fig. 32). Les réseaux de lien moyen ou "Median Joining" (Bandelt *et al.*, 1999), choisis dans cette étude, intègrent l'information contenue dans plusieurs arbres d'envergure minimale ; les connexions ne se font pas que sur les haplotypes présents dans l'échantillonnage, mais également sur des haplotypes manquants, augmentant ainsi la diversité du réseau.

Ces réseaux d'haplotypes sont construits grâce au logiciel "NetWork 4.6" (Polzin et Daneschmand, 2011) (disponible sur le site web: www.fluxus-technology.com). La construction de ces réseaux est basée sur la théorie de la coalescence (Kingman, 2000). Cette théorie consiste en une approche rétrospective qui décrit mathématiquement le processus de fusion binaire de tous les lignages généalogiques d'un échantillon de gènes jusqu'à leur plus proche ancêtre commun.

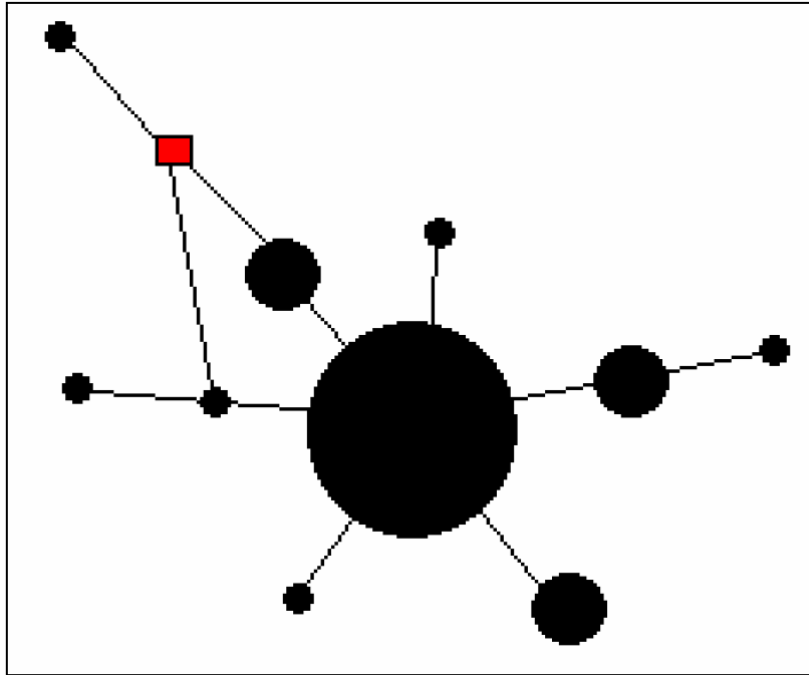


Figure 32 : Exemple de réseau d'haplotypes (Muths, 2006).

Chaque cercle correspond à un haplotype ; la taille du cercle est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype dans le jeu de données. La longueur des segments entre chaque haplotype est proportionnelle au nombre de mutations qui les sépare (pas mutationnels). Le carré rouge symbolise un haplotype non détecté durant l'étude mais nécessaire à la construction du réseau (haplotypes manquants ou perdus par dérive au cours de l'évolution) (Muths, 2006).

La diversité nucléotidique π mesure la divergence nucléotidique moyenne entre toutes les paires de séquences d'un même échantillon (Tajima, 1983). Elle définit la probabilité que deux gènes tirés au hasard dans un échantillon soient différents au niveau d'un nucléotide donné.

Le calcul de π se fait selon la formule suivante :

$$\pi = \sum_{ij} P_i P_j d_{ij}$$

Avec p_i la fréquence de l'haplotype i et d_{ij} le nombre de mutations entre les haplotypes i et j .

Le test de McDonald et Kreitman (1991) compare l'homogénéité entre les distributions des mutations synonymes et non-synonymes qui sont fixées entre taxons (le ratio KN/KS) et de celles qui s'accumulent au sein d'un taxon (le ratio θ_N/θ_S). Si le ratio KN/KS est supérieur au ratio θ_N/θ_S . Cela signifie qu'au moins un des deux taxons est sous l'effet d'une sélection Darwinienne positive, tandis qu'à l'inverse un ratio KN/KS inférieur indique le maintien d'un polymorphisme ancestral entre taxons, l'accumulation de mutations légèrement délétères dans le polymorphisme ou l'émergence d'un polymorphisme adaptatif au sein d'un des deux taxons.

Les diversités haplotypiques et nucléotidiques sont estimées pour chaque population grâce au programme DNASP 5.0 (Rozas *et al.*, 2010). La diversité haplotypique (H_d) définit la probabilité que deux gènes tirés au hasard dans un échantillon soient différents (Nei, 1987) et prend en compte le nombre d'individus ainsi que la fréquence des haplotypes. Le calcul de H_d , avec n , le nombre de gènes dans l'échantillon (égal au nombre d'individus quand le locus est haploïde) et p_i la fréquence de chaque haplotype, est définie par:

$$H_d = \frac{n}{n-1} (1 - \sum p_i^2)$$

Chapitre 03 :

Résultats et Discussions

I. Taxinomie et identification des espèces étudiées

Notre étude taxinomique repose sur l'identification morphologique et sur les données et les descriptions déjà obtenues par Mezali (2008). Pour l'étude des sclérites nous avons comparé les données endosquelettiques de ces espèces avec ceux de la littérature essentiellement les descriptions faites par Koehler (1921), Tortonese (1965) et Rowe (1969). Pour l'identification génétique nous avons comparé les séquences de la fraction du gène ARNr 16S aux données du Genbank en utilisant le programme BLAST disponible sur le site officiel de l'NCBI (National Center for Biotechnology Information)¹¹.

Nous avons considéré les séquences d'ADN de 31 échantillons, 15 séquences de *Holothuria (Roweothuria) poli*, 3 séquences de *Holothuria (Holothuria) stellati*, 7 séquences de *Holothuria (Holothuria) tubulosa* groupe B et en fin, 6 séquences de *Holothuria (Holothuria) tubulosa* groupe A, (Tab. 5). Les appellations (A & B) pour les deux populations de *H. (H.) tubulosa* sont hypothétiques car d'après les résultats de l'analyse moléculaire obtenue par Mezali (2008), il y avait la présence de deux branches dans les arbres phylogénétiques qui indiquent qu'il s'agit d'espèces différentes.

Tableau 5 : Effectifs d'individus pour chaque espèce et/ou populations d'holothuries aspidohirotés échantillonnés dans les stations étudiées. (FP= Figuier-plage, T= Tamentefoust, SF= Sidi-Fredj, S=Stidia, BM= Banyuls-sur-Mer).

	<i>H. (R.) poli</i>	<i>H. (H.) stellati</i>	<i>H. (H.) tubulosa</i> A	<i>H. (H.) tubulosa</i> B
FP	2	2	3	1
T	8	-	-	-
SF	5	-	2	1
S	-	1	1	4
BM	-	-	-	1
Total	15	3	6	7

¹¹ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

I.1. Descriptions morphologiques et anatomiques des espèces d'holothuries révisées.

La description morphologique des espèces est basée selon les descriptions adoptées par Mezali (2008). D'autres caractères morphologiques ont été vérifiés avec des spécialistes en taxonomie des holothuries au cours du cours internationale sur la taxonomie moléculaire (Octobre 2014) qui a lieu à l'université de Mostaganem (où j'étais participant). Les groupes d'espèces qui suivent sont caractérisés anatomiquement par l'absence d'organes de défense ou "tubes de Cuvier".

I.1.1. *Holothuria (Holothuria) tubulosa* groupe A

Les individus de *H. (H.) tubulosa* A (Fig. 33) ont généralement :

- ✓ une forme presque cylindrique et une taille qui peut atteindre 20cm de long sur 5 à 6cm de large à l'état de contraction;
- ✓ des téguments coriaces et peu épais. La face ventrale peu aplatie porte de nombreux pédicelles serrée et irréguliers (Fig. 33-b). La surface dorsale est peu arquée et présente de petites verrucosités coniques terminées par des petites papilles allongées souvent apparentes (Fig. 33-a);
- ✓ une bouche entourée par 20 tentacules (Fig. 33-c);
- ✓ un anus terminal qui est situé en position ventrale. Cet organe présent des papilles anales apparentes;
- ✓ Les individus analysés présentent à l'état vivant, une couleur très variés (marron claire, rouge acajou, brune, brune et noire). La face ventrale présente, en général, une couleur plus claire (fauve, grise).

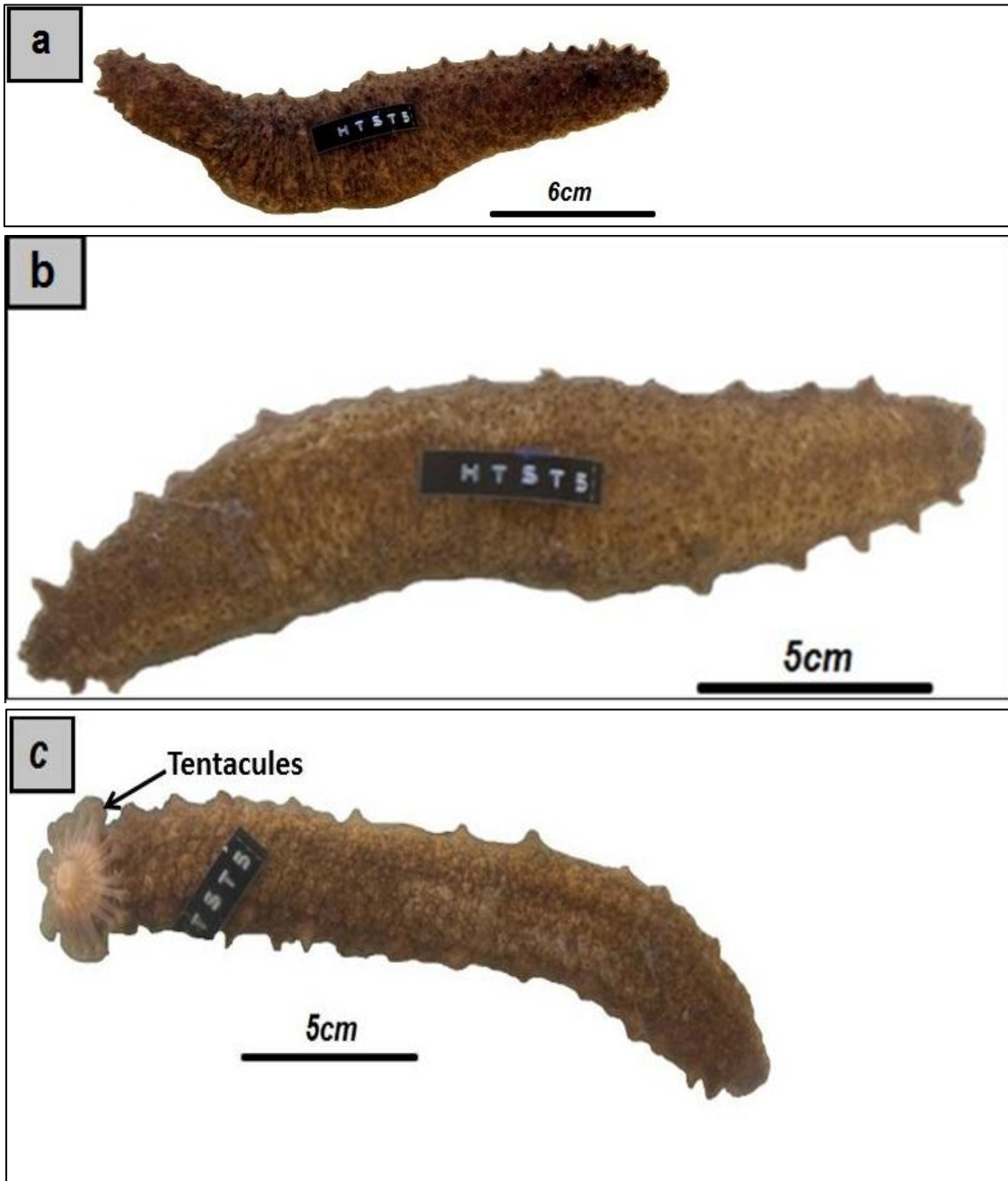


Figure 33 : Morphologie externe d'un individu de *Holothuria (H.) tubulosa* appartenant au groupe A (individu de la station de Stidia). (a) : vue dorsale ; (b) : vue ventrale ;(c) : individus bien relaxé (tentacules bien visibles). (Mezali, 2008 ; modifiée par Mansouri)

I.1.2. *Holothuria (Holothuria) tubulosa* B

Les individus de *H. (H.) tubulosa* B (Fig. 34) ont en général :

- ✓ un corps qui est convexe sur la partie dorsale et présente une face ventrale aplatie. La taille moyenne des échantillons collectés peut atteindre une longueur de 20cm;
- ✓ un tégument flasque et peu épais à l'état relaxé (Fig. 34-a). Les pédicelles sont irrégulièrement repartis sur la face ventrale (Fig. 34-b);
- ✓ contrairement aux individus du premier groupe (A), les verrucosités coniques de la face dorsale sont très petites et peuvent faire défaut chez quelques individus analysés ;
- ✓ une bouche qui présente généralement 20 tentacules

Lorsque l'espèce est vivante, elle présente une couleur marron acajou à marron bitume. La face ventrale est beaucoup plus claire que la face dorsale (Mezali, 2008) (Fig. 34).

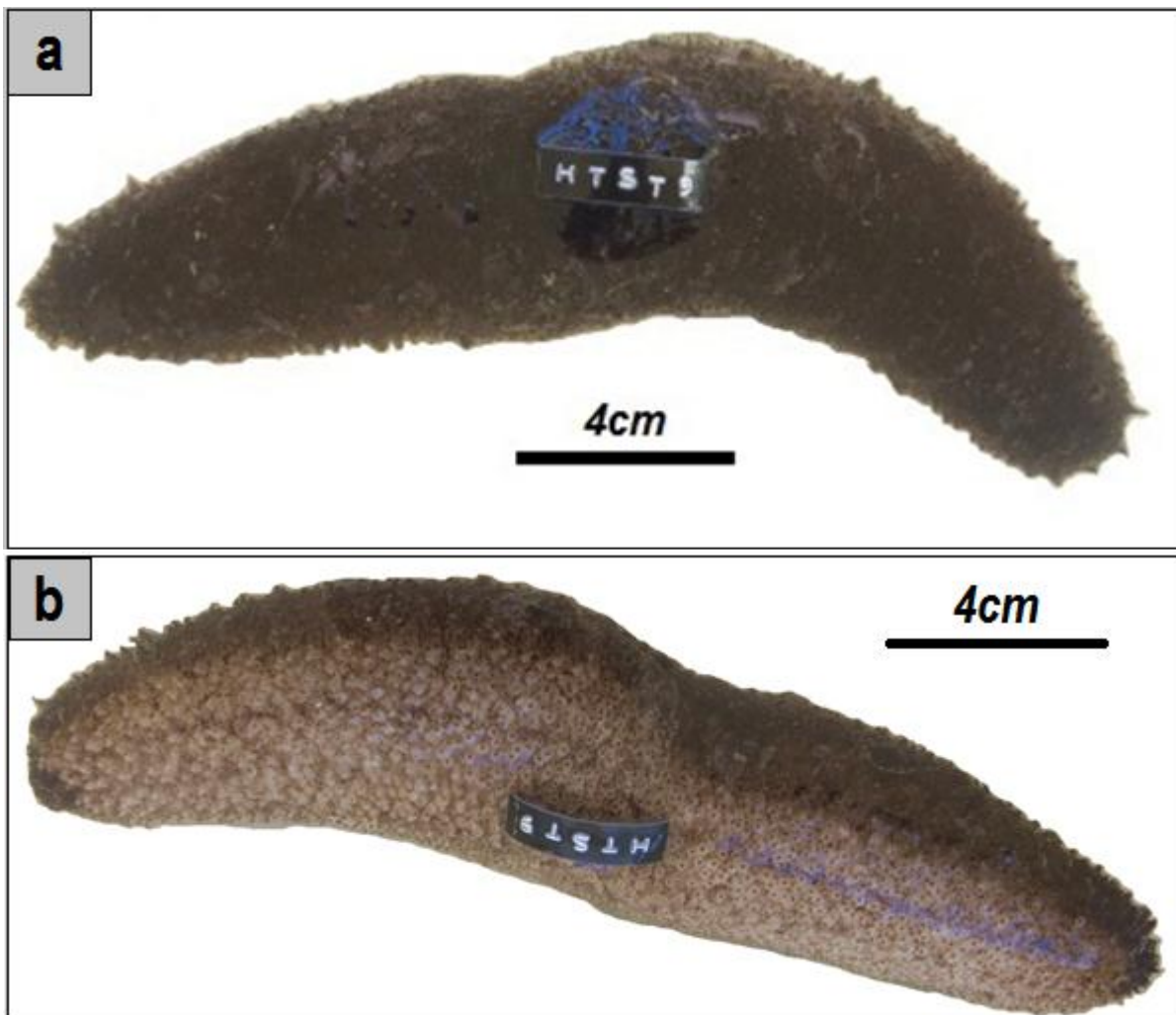


Figure 34 : Morphologie externe d'un individu de *Holothuria (H.) tubulosa* appartenant au groupe B. (a) : vue dorsale ; (b) : vue ventrale. (Mezali ,2008 ; modifiée par Mansouri)

I.1.3. *Holothuria (Holothuria) stellati*

Le corps de ses individus est d'un brun clair sur la face ventrale et d'un brun assez foncé sur la face dorsale. Les individus examinés peuvent atteindre 30cm de long sur 5cm à 6cm de large à l'état de relaxation. Le corps présente un bivium arrondi et un trivium plat bien distinct qui présente des pédicelles assez serrés (Mezali, 2008).

Le tégument est plus épais et plus coriace que celui des espèces déjà décrites ci-dessus (Fig. 35). La paroi du corps est rugueuse au toucher. Comme il a été observé par Koehler (1921) et Gustato et Villari (1979b), on distingue une rangée de très grosses de protubérances à la limite des deux faces du corps (Fig. 35).



Figure 35 : Morphologie externe de l'individu de *Holothuria (Holothuria) stellati*. (a) : vue dorsale ; (b) : vue ventrale.

Les papilles de cette espèce sont assez apparentes dans l'eau, lorsque l'animal est en phase de relaxation. Ces protubérances, qui forment une rangée de 5 à 6, sont étirées, pointues et séparées régulièrement par des intervalles égaux. *Holothuria (H.) stellati* se reconnaît facilement, in situ, grâce à ces grosses protubérances.

I.1.4. *Holothuria (Roweothuria) poli*

Les individus de *Holothuria (R.) poli* présentent :

- ✓ un corps mou, de forme cylindrique et de couleur marron, claire à brune (Fig. 36). Ce corps dépasse parfois 20cm de longueur sur 4 à 5cm de largeur (Fig. 36) un trivium qui n'est pas clairement décelé du bivium (Koehler, 1921 ; Cherbonnier, 1955 ; Mezali, 2008) ;
- ✓ des pédicelles de couleur blanchâtre qui se présentent sous forme de tube très serrés qui sont nombreux sur la face ventrale. Par contre, les papilles de la face dorsale sont plus fines et réduites. On remarque également sur la face dorsale des tubercules coniques de tailles réduites, qui se terminent par une extrémité blanchâtre, et donne à cette espèce une physionomie bien précise ;
- ✓ une bouche ventrale et un anus terminal (Cherbonnier, 1955, Mezali, 2008) ;
- ✓ des tentacules de couleur jaunâtre en nombre de 17 en moyenne (Mezali, 2008).

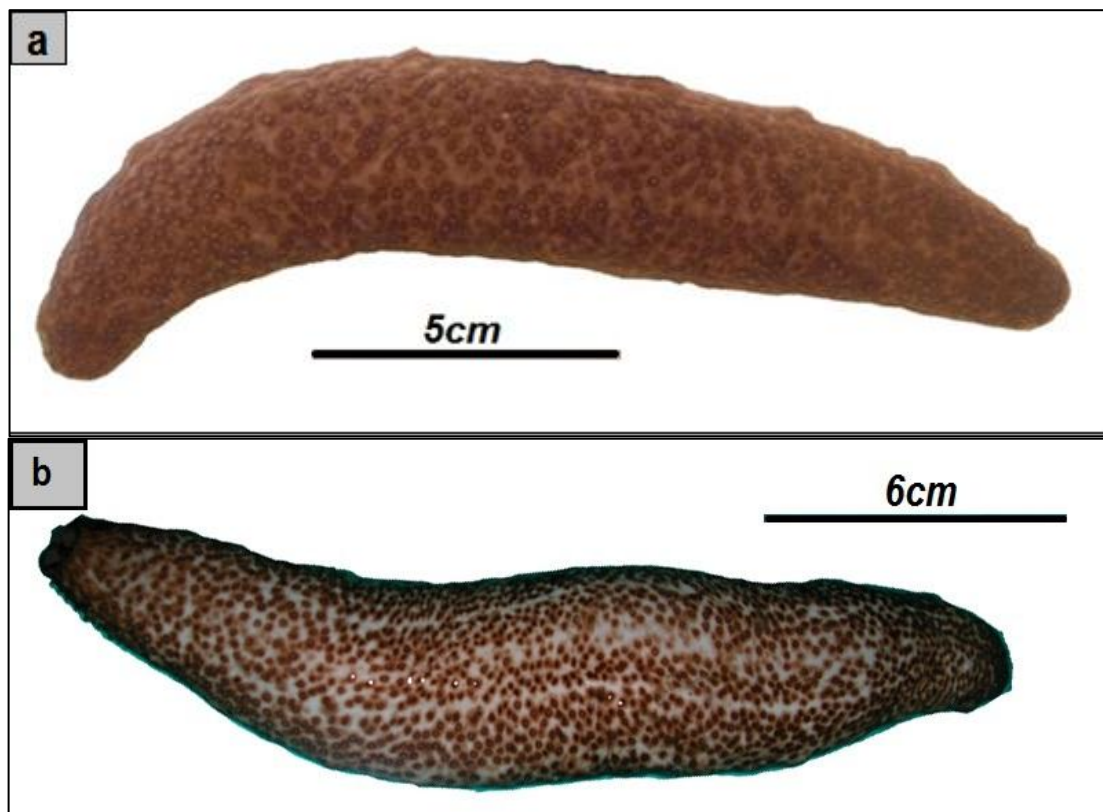


Figure 36 : Morphologie externe d'un individu de *Holothuria (Roweothuria) poli* . (a) : vue dorsale ; (b) : vue ventrale (Mezali, 2008 ; modifiée par Mansouri)

I.2. Résultats des descriptions de l'endosquelette (sclérites) des espèces d'holothuries révisées

Pour toutes les espèces d'holothuries nous avons étudié les sclérites de la face dorsale, la face ventrale, les podia et des tentacules.

I.2.1. Sclérites de *Holothuria (Holothuria) tubulosa* A

Les descriptions des différentes formes de sclérites obtenues pour le groupe A de *Holothuria (H.) tubulosa* ont été comparées aux descriptions de Koehler (1921) ; Tortonese (1965) ; Rowe (1969) ; Gustato et Villari (1979b) (Annexe 04; Figs. III; IV).

I.2.1.1. Corpuscules turriformes

Les corpuscules turriformes des téguments sont peu abondants et ils ressemblent *grosso modo* avec celle de *Holothuria (Holothuria) tubulosa* B (Fig. 37; 38), dans la face dorsale on remarque la présence de deux types de tourelles, le premier type dont les disques de tourelles sont bien formés et présente plus que quatre perforations (des perforations périphériques) et le second type avec des tourelle dont le disque n'est pas complètement formé et présente 4 perforations, les disques dans les deux types sont épineux (Fig. 37-a-b). Les tourelles de la face dorsale ont une hauteur moyenne de 23.63µm et un diamètre de 24.38µm, pour la face ventrale la hauteur moyenne est de 19.88µm et le diamètre est de 20.62µm (Tab. 6; 7). Cette description est similaire à celles qui sont décrites par koehler (1921); Tortonese (1965) et Rowe (1969) (Annexe 04; Fig. III; IV).

I.2.1.2. Boucles

Les boucles s'allongent un peu plus que les boucles d'*Holothuria (Holothuria) tubulosa* B (Tab. 6; 7) et n'offrent généralement que trois ou quatre paires de perforations (Fig. 37-d ; Fig. 38-c) mais elles peuvent cependant en avoir cinq ou six (Fig. 37-e ; Fig. 38-d), leur surface est munie de petits tubercules terminées en pointes émoussée. Il existe en outre de véritable plaques épaissies, plus grandes que les boucles, à surface ridée ou mamelonnée avec des trous complètement oblitérés (Fig. 37-f ; 38-e).

I.2.1.3. Pédicelles de la face ventrale (Podia)

Les pédicelles ventraux renferment des plaques perforées élargies, offrant sur les deux faces une côte médiane légèrement saillante, (Fig. 39-C-a).et de chaque côté, de grandes perforations plus ou moins nombreuses et des plaques perforées allongée à contour irrégulier (Fig. 39-C-b).

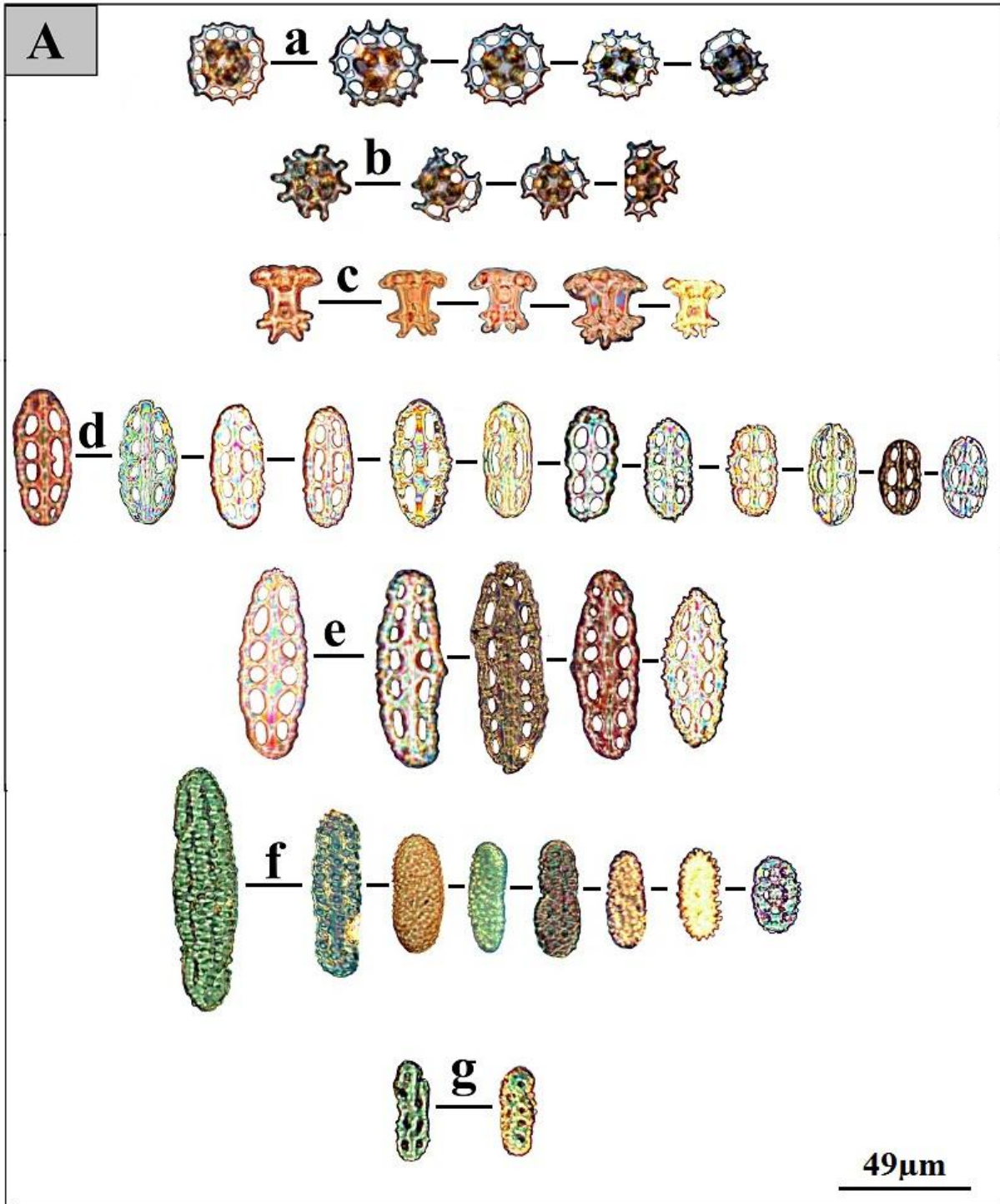


Figure 37 : Sclérites de la face dorsale de *H. (H) tubulosa* A. a et b : corpuscules turritiformes (vue de dessous) ; c : corpuscules turritiformes (vue de profil) ; d : petites boucles ; e : boucles plus grandes et allongées ; f : boucles avec des trous oblitérés ; g : pseudo-boutons.

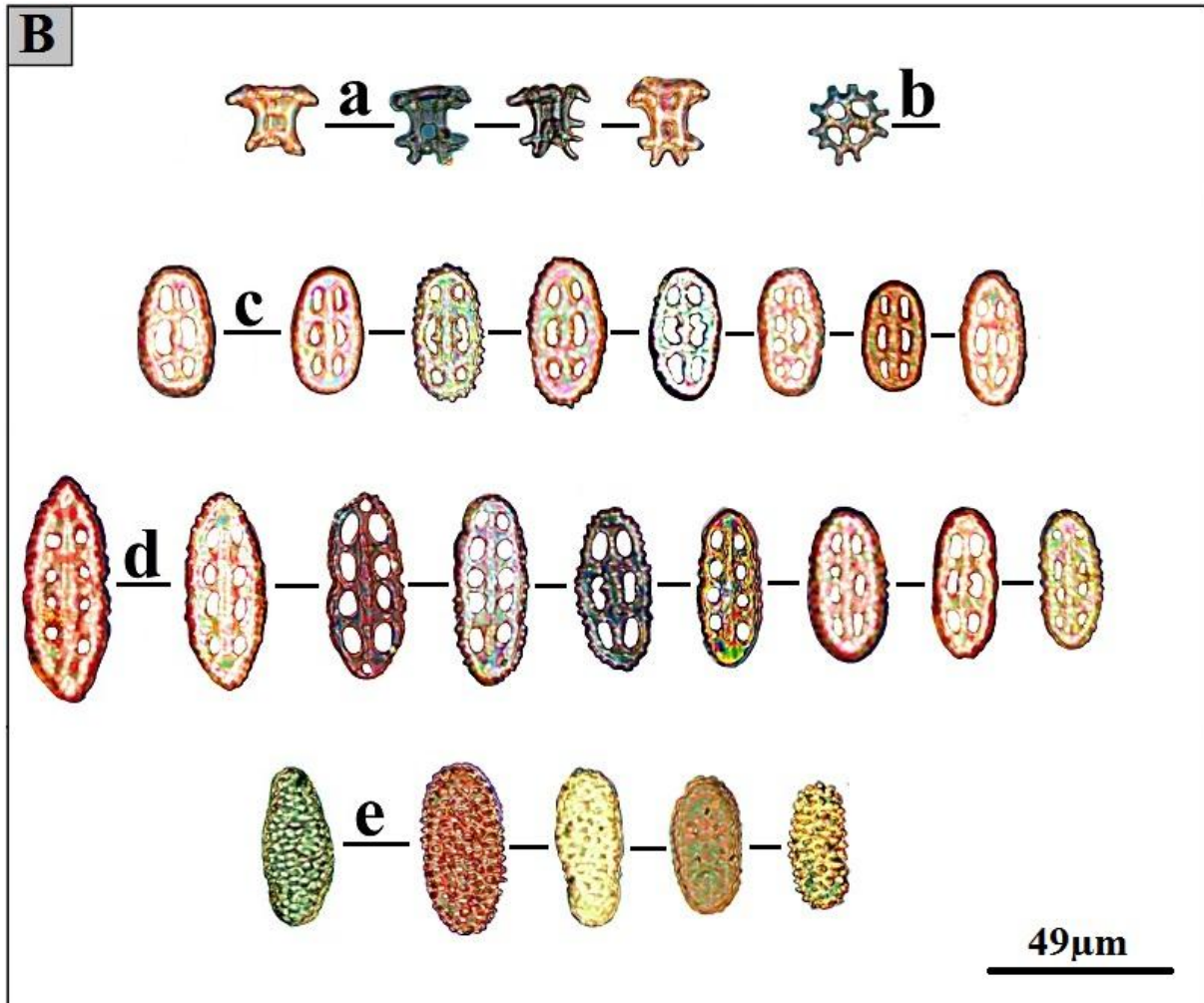


Figure 38 : Sclérites de la face ventrale de *H. (H) tubulosa* A. a: corpuscules turriformes (vue de profil) ; b : corpuscules turriformes (vue de dessous) ; c : petites boucles ; d : boucles plus grandes et allongées ; e : boucles avec des trous oblitérés.

I.2.1.4. Bâtonnets des tentacules

La paroi des tentacules renferme des bâtonnets droits ou légèrement arqués mais qui restent plus minces et ne s'élargissent que légèrement aux extrémités où l'on en voit un nombre de perforations (Fig. 39-D-a-b). Cette description ressemble à celles qui sont décrites par Koehler (1921); Tortonese (1965) et Rowe (1969) (Annexe 04; Fig. III; IV).

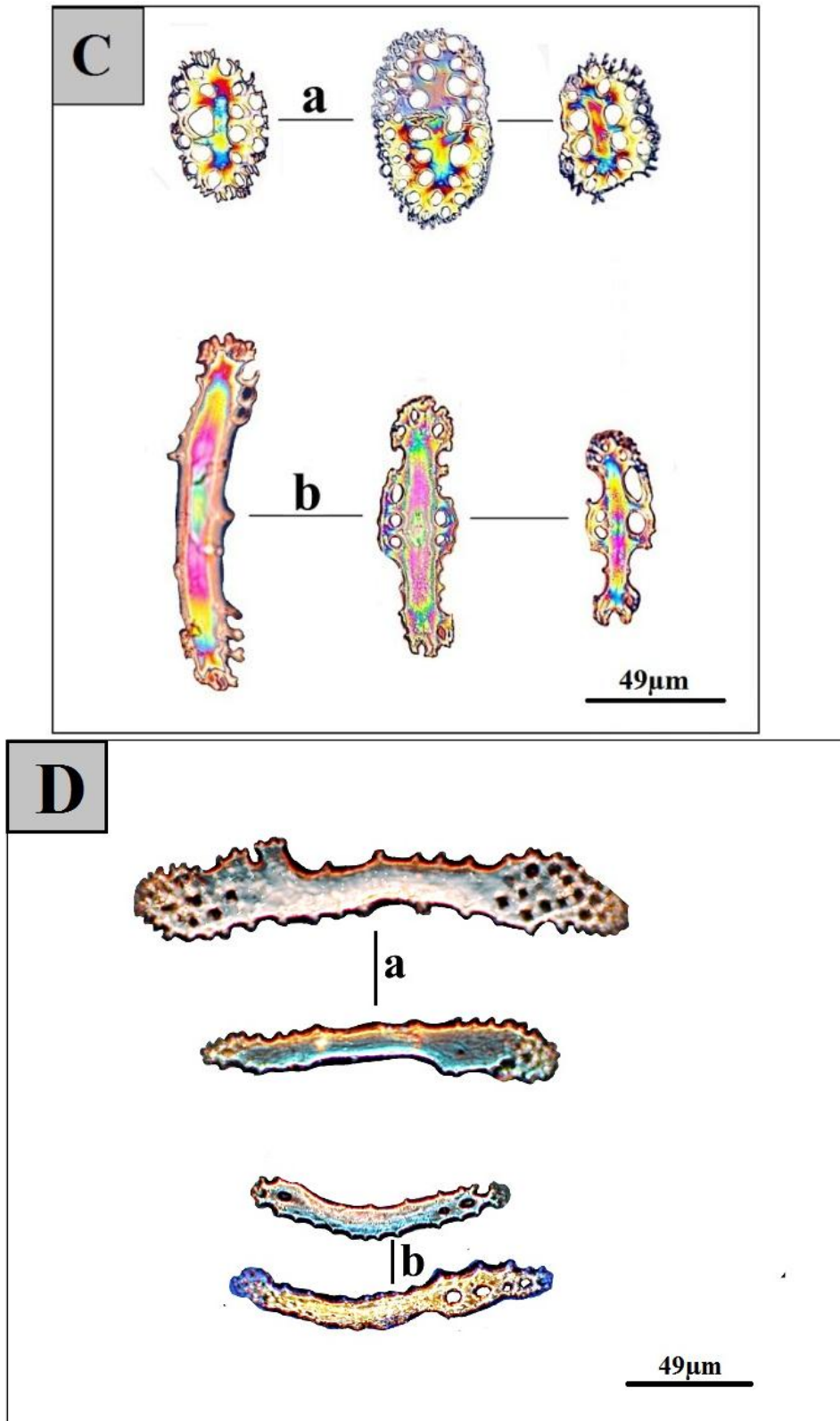


Figure 39 : Sclérites des podia (C) et tentacules (D) de *H. (H) tubulosa* A. C-a : plaques élargies ; C-b : plaques perforées allongée à contour irrégulier. D-a : bâtonnets droits ; D-b : bâtonnets arqués.

I.2.2. Sclérites de *Holothuria (Holothuria) tubulosa* B

I.2.2.1. Corpuscules turriformes

Le nombre des corpuscules turriformes (tourelles) pour les deux faces (dorsale et ventrale) est presque le même. Les tourelles ont une taille très petite et une forme irrégulière (Fig. 40-a) (Fig. 41-a-b) ayant environ 18,23µm de hauteur et 18,51µm de diamètre pour la face dorsale, et 15,48µm de hauteur et 16,04 de diamètre pour la face ventrale (Tab. 6; 7) ils comprennent un disque basilaire à contour denticulé et épineux, offrant quatre orifices centraux (Fig.41-b). Notre description concorde avec les descriptions décrites par Koehler (1921), Gustato et villari (1979b) et Rowe (1969) (Annexe 04; Fig. III; IV).

I.2.2.2. Boucles

Dans la majorité des cas les boucles sont rugueuses, leur surface est munie de petites aspérités coniques et pointues assez rapprochées. Le plus habituellement ces boucles, en forme d'ovale plus ou moins allongé, offrent trois paires d'orifices successifs disposés régulièrement et symétriquement et de mêmes dimensions (Fig. 40-b-c. Fig. 41-c) mais parfois la paire médiane est plus grande que les deux autres, souvent les boucles s'allongent et elles offrent de quatre à cinq d'orifices successifs (Fig. 40-c), comme aussi, mais plus rarement, elles peuvent être plus petites et ne posséder que deux paires d'orifices, elles présentent parfois quelques irrégularités de contour, une portion peut manquer d'un côté, ou bien il existe à l'une des extrémités, ou encore aux deux extrémités, un simple petit prolongement arrondi (Fig. 40-g. Fig. 41-e). Ces boucles présentent des dimensions variables qui sont beaucoup plus petites que celles de *H. (H.) tubulosa* du groupe A (Tab. 9; 10).

Les orifices des boucles peuvent devenir très petits ou même faire complètement défaut, et l'on passe alors à des corpuscules pleins, à surface rugueuse et mamelonnée, qui se montrent sur la face dorsale et ventrale du corps (Fig. 40-e. Fig. 41-d). Ces descriptions convergent avec celles décrites par (Koehler, 1921), (Rowe, 1969) et (Gustato et Villari ,1979b)

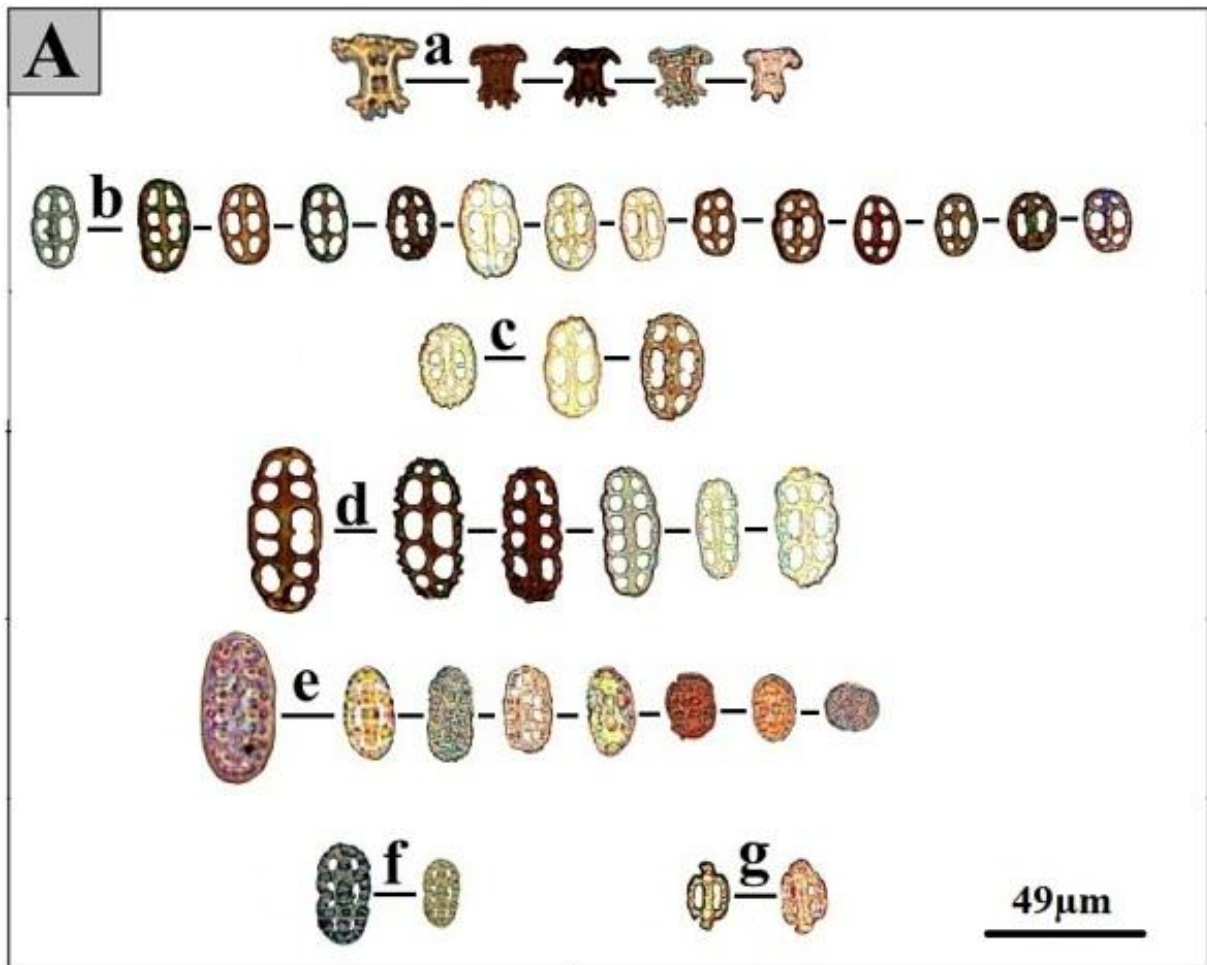


Figure 40 : Sclérites de la face dorsale de *H. (H) tubulosa* B. a : corpuscules turriformes (vue de profil) ; b-c : petites boucles ; d : boucles plus grandes ; e: boucles avec des trous oblitérés ; f : boucles épais ; g: boucles avec un prolongement arrondis.

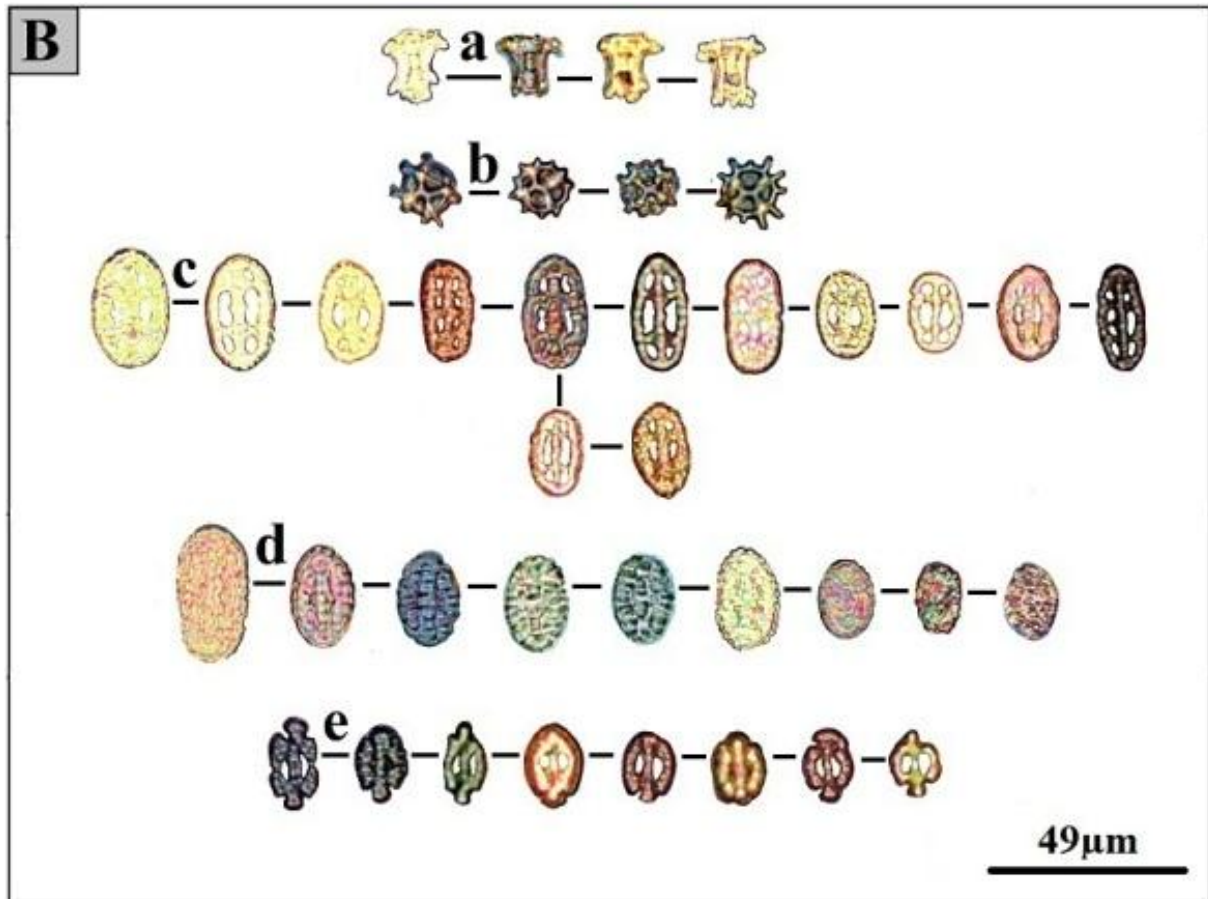


Figure 41 : Sclérites de la face ventrale de *H. (H) tubulosa* B. a : corpuscules turriformes (vue de profil) ; b : corpuscules turriformes (vue de dessous) ; c : petites boucles ; d : boucles avec des trous obliques ; e : boucles avec un prolongement arrondi.

I.2.2.3. Pédicelles de la face ventrale (Podia)

Les pédicelles de la face ventrale renferment dans leurs parois des plaques perforées allongées à contour irrégulier (ressemblent à des bâtonnets) (Fig. 42-C-b) et des plaques élargies (perforées avec deux orifices médianes plus grands que les autres) (Fig. 42-C-a) et aussi des plaques grandes avec des mailles assez fortes (Fig. 42-C-c).

I.2.2.4. Bâtonnets des tentacules

La paroi des tentacules renferme des bâtonnets droits ou légèrement arqués, munis sur les bords de petites pointes très courtes avec les extrémités un peu élargies et présentant quelques perforations (Fig. 42-D-b-a).

à côté d'eux, on trouve des bâtonnets beaucoup plus gros et plus grands dont la surface est couverte d'aspérités très serrées de telle sorte qu'ils cessent d'être transparents, ces bâtonnets sont allongées, rétréci au milieu et élargi aux extrémités, la région moyenne plus étroite est dépourvue d'orifices, tandis que les parties terminales plus élargies en offrent un certain nombre d'orifices, disposés irrégulièrement et toujours fortement petits (Fig. 42-D-c).

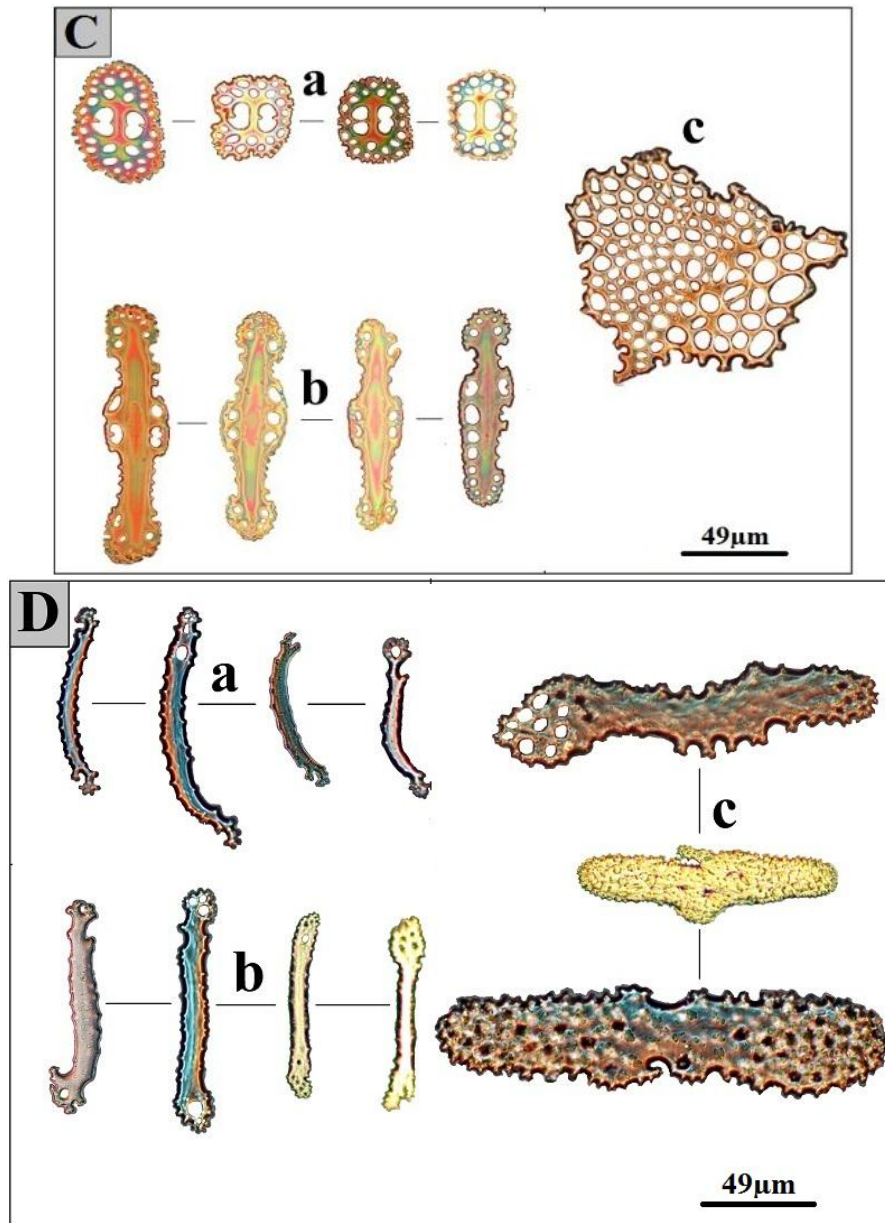


Figure 42 : Sclérites des podia (C) et tentacules (D) de *H. (H) tubulosa* B. C-a : plaques élargies ; C-b : plaques perforées allongée à contour irrégulier; C-c : plaque perforée. D- a : bâtonnets arqués ; D-b : bâtonnets droits ; D-c : bâtonnets épais.

On note que les sclérites de deux morphotypes [*Holothuria (H.) tubulosa* (A & B)] sont similaires. (Malgré que les boucles de *H. (H.) tubulosa* B sont caractérisées par une taille réduite).

I.2.3. Sclérites de *Holothuria (Holothuria) Stellati*

Les descriptions des différentes formes de sclérites obtenues pour les espèces de *Holothuria (Holothuria) stellati* ont été comparées aux descriptions de Koehler (1921) ; Gustato et Villari (1979b) (Annexe 05, Fig. V).

I.2.3.1. Corpuscules turriformes

Les tourelles de la face dorsale ont un disque basilaire à pointes périphériques bien marquées et qui offre en général quatre ouvertures limitées par la croix primordiale sur les branches de laquelle s'élèvent quatre tiges reliées entre elles par un étage de travées transversales et couronnées par une dizaine de pointes (Fig. 43, a, b). Les tourelles de la face ventrale (Fig. 44, a, b) présentent presque les mêmes descriptions citées déjà plus haut. On ajout aussi que les tourelles sont vraiment rares. Ces descriptions ne corroborent pas avec celles de Koehler (1921) ; Gustato et Villari (1979b)

I.2.3.2. Boucles

Les boucles de la face ventrale n'ont pas tout à fait la même forme que ceux de la face dorsale, les boucles de la face ventrale ont les bords arrondis tandis que ceux de la face dorsale sont plus ou moins dentés (Figs. 43; 44).

Les boucles de la face ventrale sont ovales, avec des contours lisses, épaisses et elles ont des dimensions variables (Fig. 45) (Tab. 6 ; 7), les unes ont trois ou quatre ouvertures, d'autres en présentent plus, leur trous sont vraiment très petits (Fig. 44-c).

Les boucles de la face dorsale sont plus ou moins dentés, sur quelques-unes on observe à leur surface de petites aspérités, les boucles les plus caractéristiques offrent une forme du chiffre « 8 » ou bien un sablier (Fig. 43-d). Il existe aussi des pseudos-buttons, des boucles épaisses avec des trous presque oblitérés et des plaques perforées (Fig. 43-e-h-g-i). Ces descriptions ne sont pas similaires avec celles de Koehler (1921) ; Gustato et Villari (1979b).

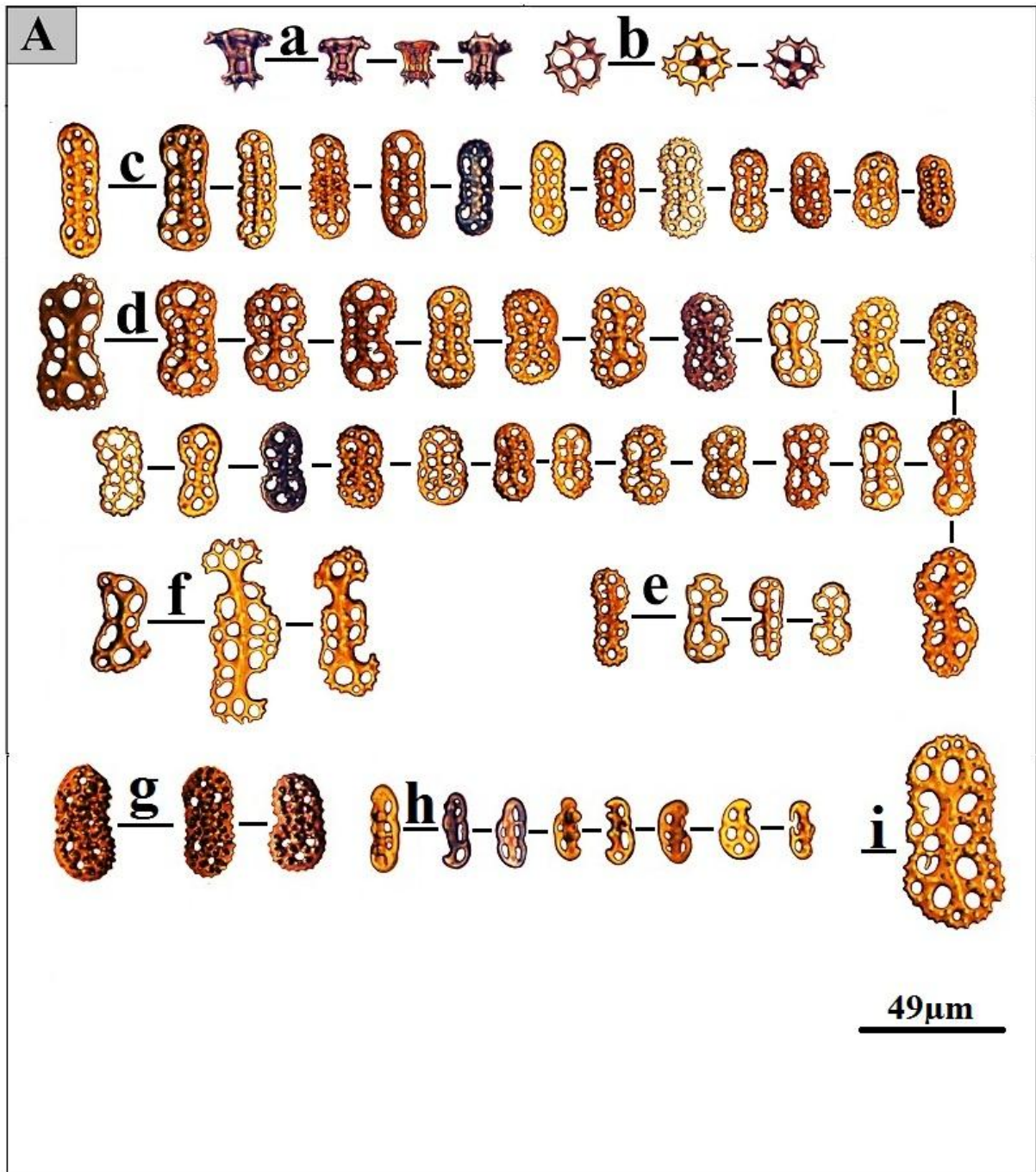


Figure 43 : Sclérites de la face dorsale de *H. (H.) stellati*. a: corpuscules turriformes (vue de profil) ; b : corpuscules turriformes (vue de dessous) ; c : boucles lisses et épineux ; d : boucles présentent la forme d'un sablier ou la forme de chiffre « 8 » ; e-h : pseudo-boutons ; f : plaques perforées allongées à contour irrégulier ; g : boucles épaisses ; i : plaque perforée.

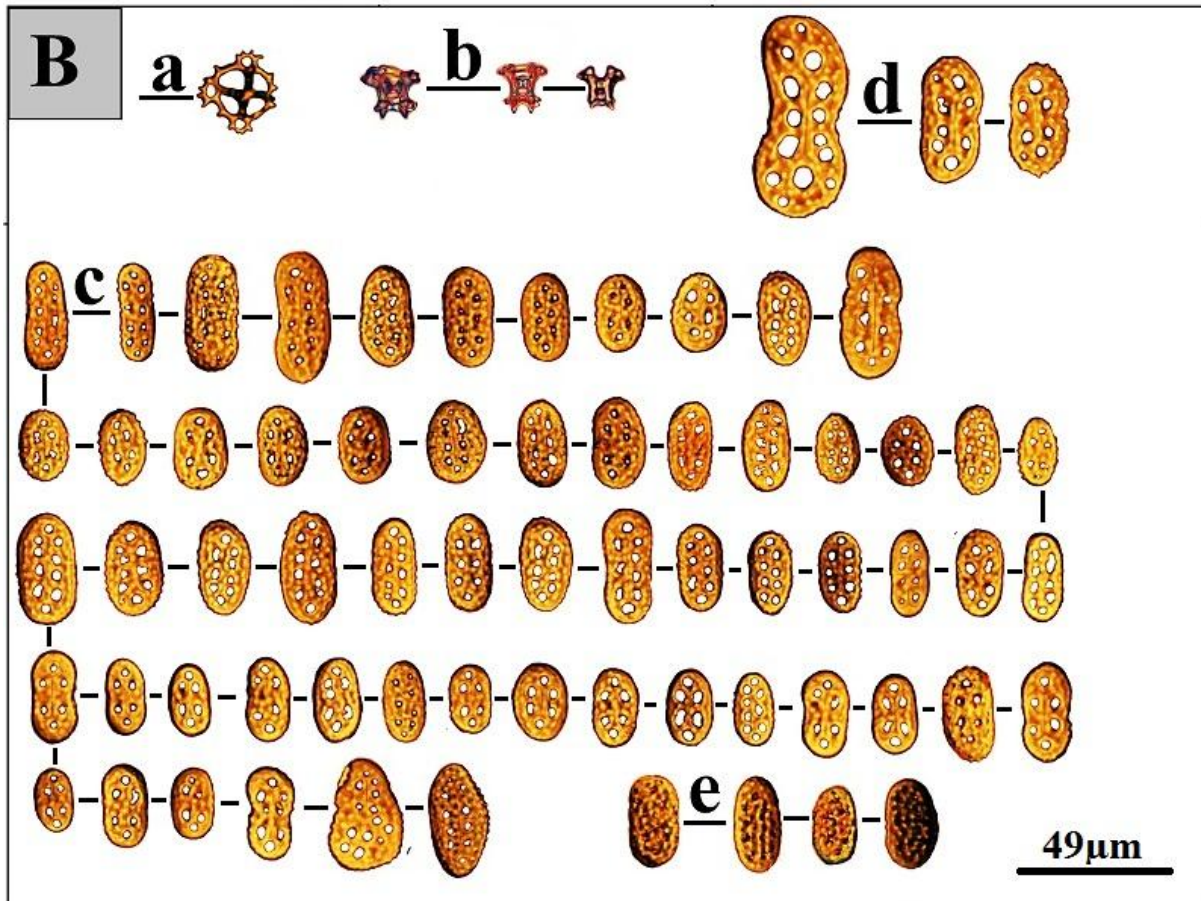


Figure 44 : Sclérites de la face ventrale de *H. (H.) stellati*. a : corpuscules turriformes (vue de dessous) ; b : corpuscules turriformes (vue de profil) ; c : boucles lisses avec des trous très petits ; d : boucles plus grandes avec des trous plus grands; e : boucles avec des trous oblitérés.

I.2.3.3. Pédicelles ventraux

Les pédicelles ventraux renferment des plaques perforées élargies, offrant sur les deux faces plusieurs perforations de différentes formes et tailles (Fig. 45-C-a), des plaques perforées allongée à contour irrégulier (Fig. 45-C-b-c), ces plaques présentent des perforations disposées de part et d'autre de leur axes ou bien en milieu (Fig. 45-C-b).

I.2.3.4. Bâtonnets des tentacules

La paroi des tentacules renferme des bâtonnets droits ou légèrement arqués avec une, deux ou même trois perforations dans chaque partie terminale (Fig. 45-D-a-b).

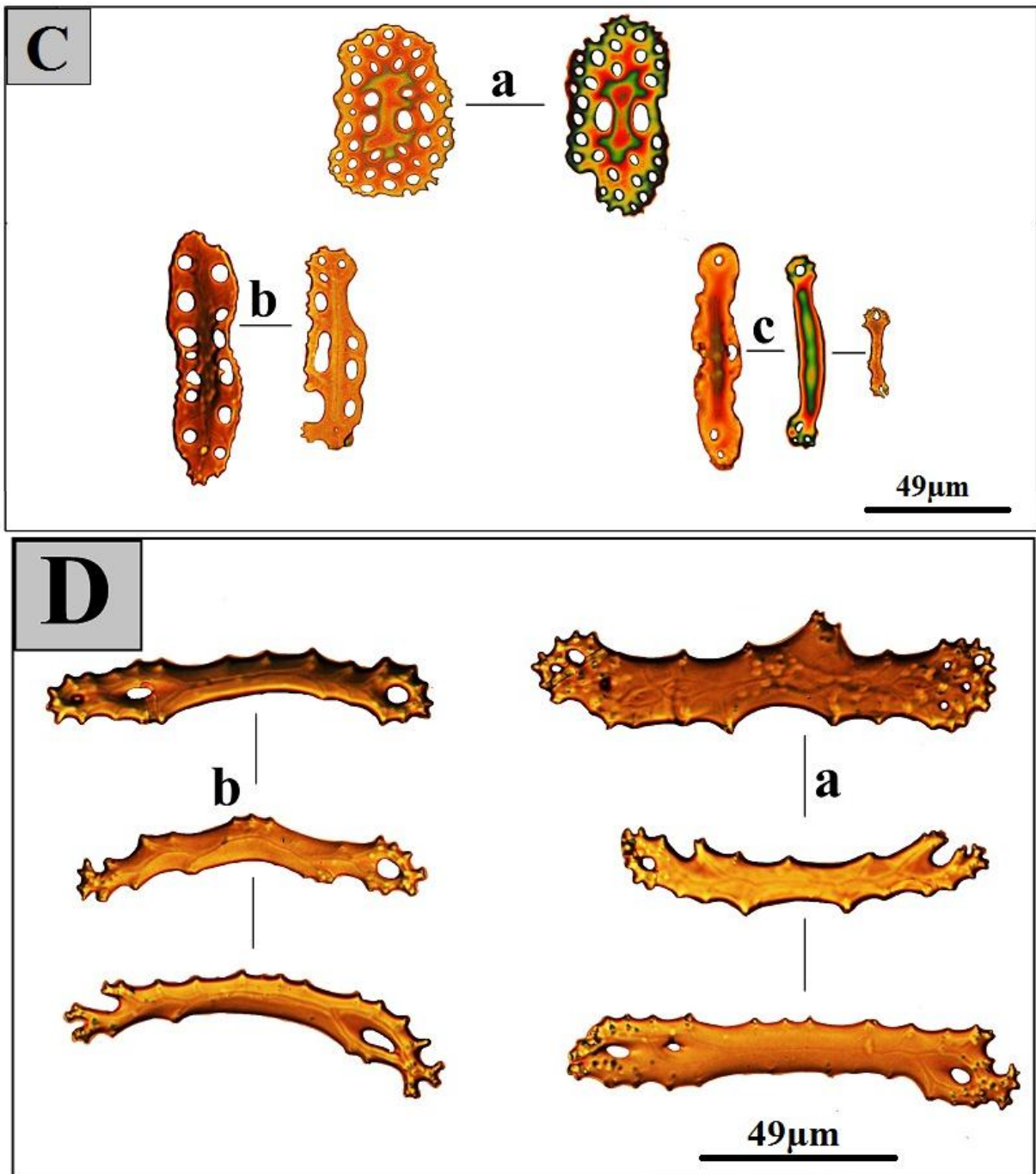


Figure 45 : Sclérites des podia (C) et tentacules (D) de *H. (H.) stellati*. C-a : plaques élargies ; C-b-c : plaques perforées allongée à contour irrégulier; D-a : bâtonnets droits ; D-b : bâtonnets arqués.

I.2.4. Sclérites de *Holothuria (Roweothuria) poli*

I.2.4.1. Corpuscules turriformes

Les Corpuscules turriformes ne diffèrent pas de ceux de *H. tubulosa*, et leur bord est muni de pointes assez marquées, les orifices des disques sont souvent au nombre de quatre, la tourelle, est constituée par quatre colonnettes réunies par une travée transversale (Fig. 46-a-b; Fig. 47-a).

I.2.4.2. Boucles

Les plus abondants sont des boucles à contour ovalaire possédant ordinairement 3 paires d'orifice et dont la surface est toujours parfaitement lisse, Certaines de ces boucles sont un peu plus allongées et offrent de 4 à 6 paires d'orifices; d'autres sont incomplètement formées, il leur manque une partie plus ou moins étendue de l'un des côtés, ou des deux côtés, ou encore de l'une des extrémités. Dans une forme assez fréquente, on observe 2 paires de perforations symétriques et successives, puis une perforation plus petite vers chaque extrémité de la boucle (Fig. 46-c-d; Fig. 47-b-c-d-e).

À côté de ces boucles elles existent des boucles rectangulaires avec des perforations symétriques (Fig. 46-c). Les boucles ont des dimensions variables (Tab. 6 ; 7). Ces descriptions corrobore avec la description de Koehler (1921) (Annexe 06 ; Fig. VI)

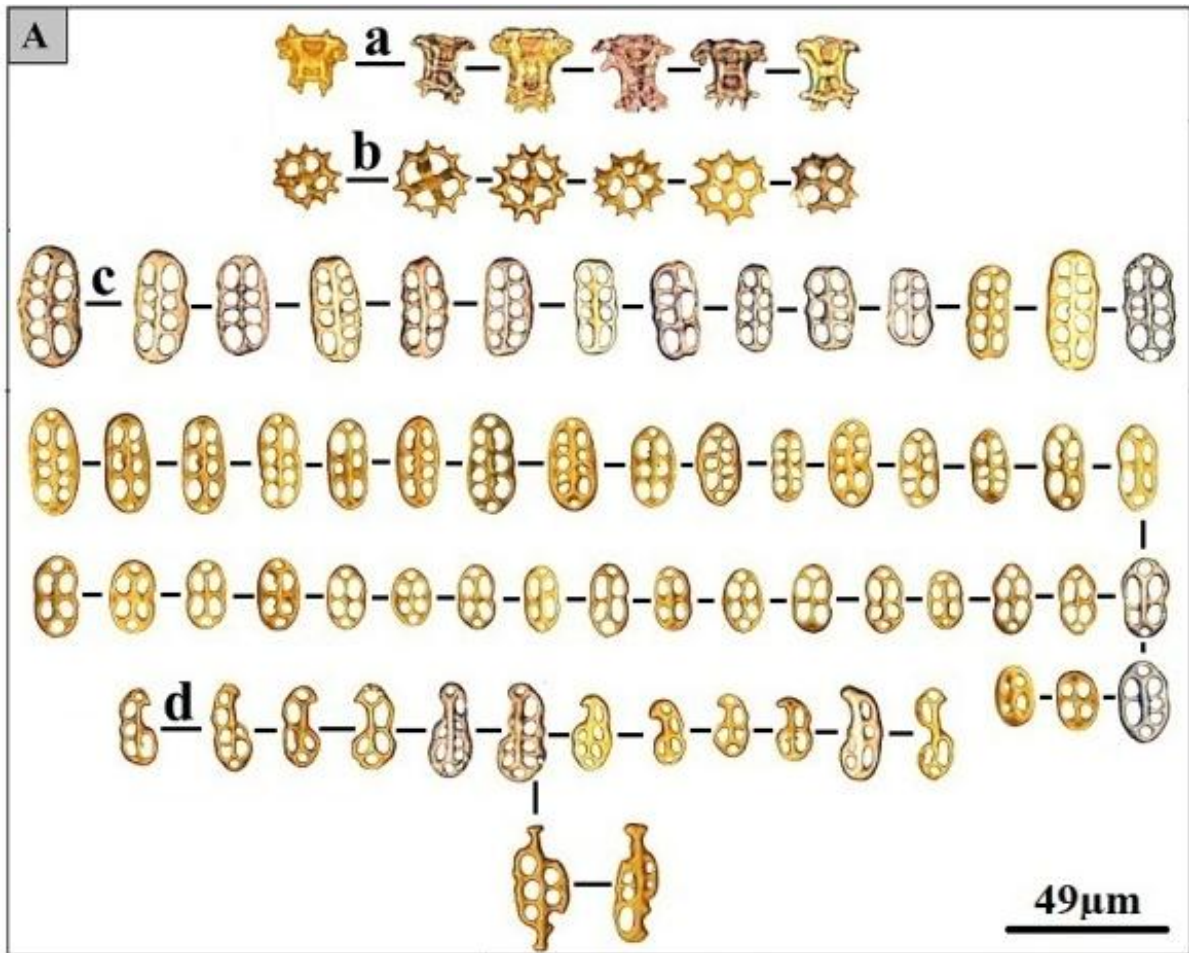


Figure 46 : Sclérites de la face dorsale de *H. (R.) poli*. a: corpuscules turriformes (vue de profil) ; b : corpuscules turriformes (vue de dessous) ; c-d : boucles de différentes forme dont la surface est lisse.

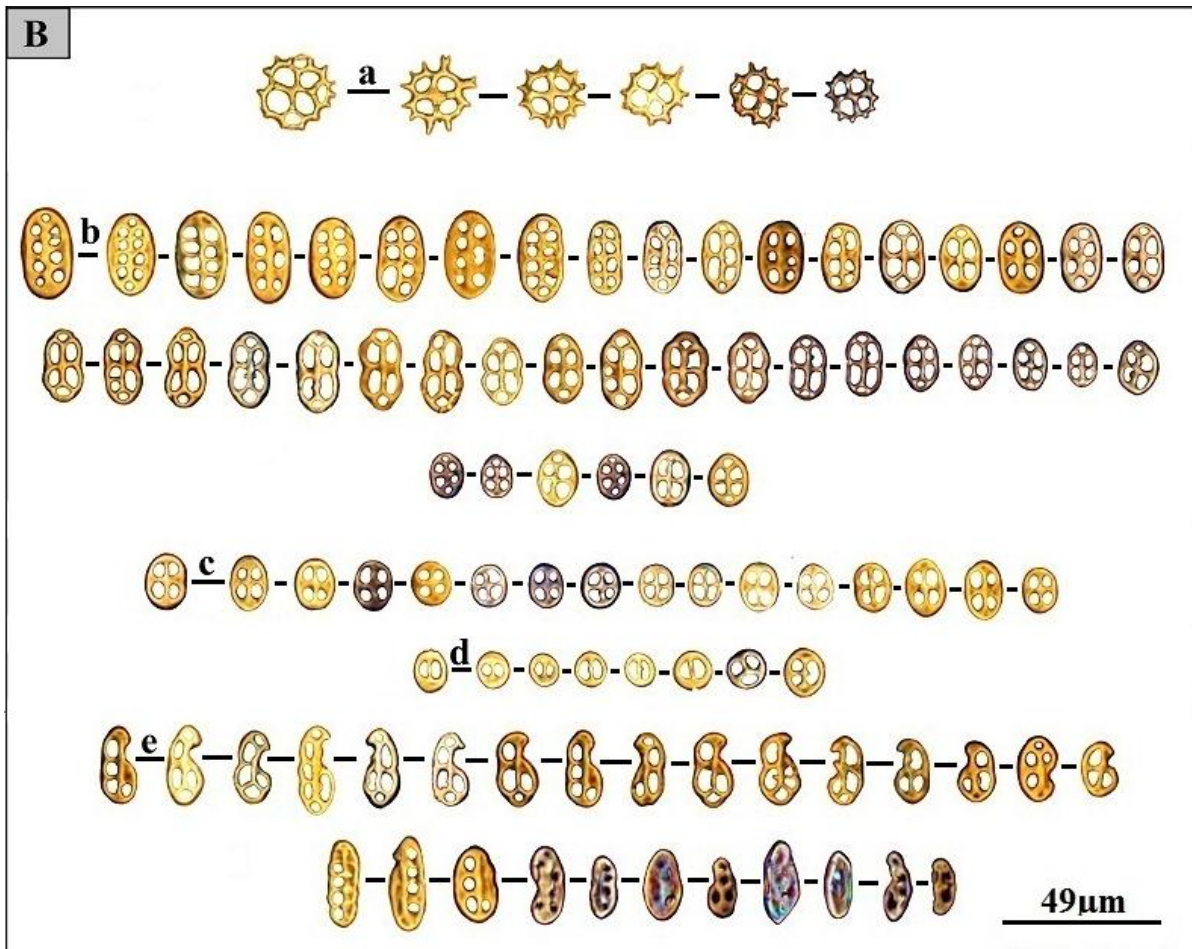


Figure 47 : Sclérites de la face ventrale de *H. (R.) poli*. a: corpuscules turriformes (vue de dessous) ; b-c-d : boucles de différentes forme dont la surface est lisse; e : pseudo-boucles.

I.2.4.3. Pédicelles ventraux

Les pédicelles ventraux renferment des plaques allongées et assez grandes à contour irréguliers, munies de perforations nombreuses et inégales, mais dont la surface reste toujours parfaitement lisse (Fig. 48-C-a-b).

I.2.3.4. Bâtonnets des tentacules

Les tentacules renferment des bâtonnets allongés et arqués un peu amincis aux extrémités dont la surface est tantôt lisse, tantôt hérissée de pointes (Fig. 48-D-c-b) et des bâtonnets en forme de la lettre « C » (Fig. 48-D-a), et des bâtonnets épais (Fig. 48-D-d).

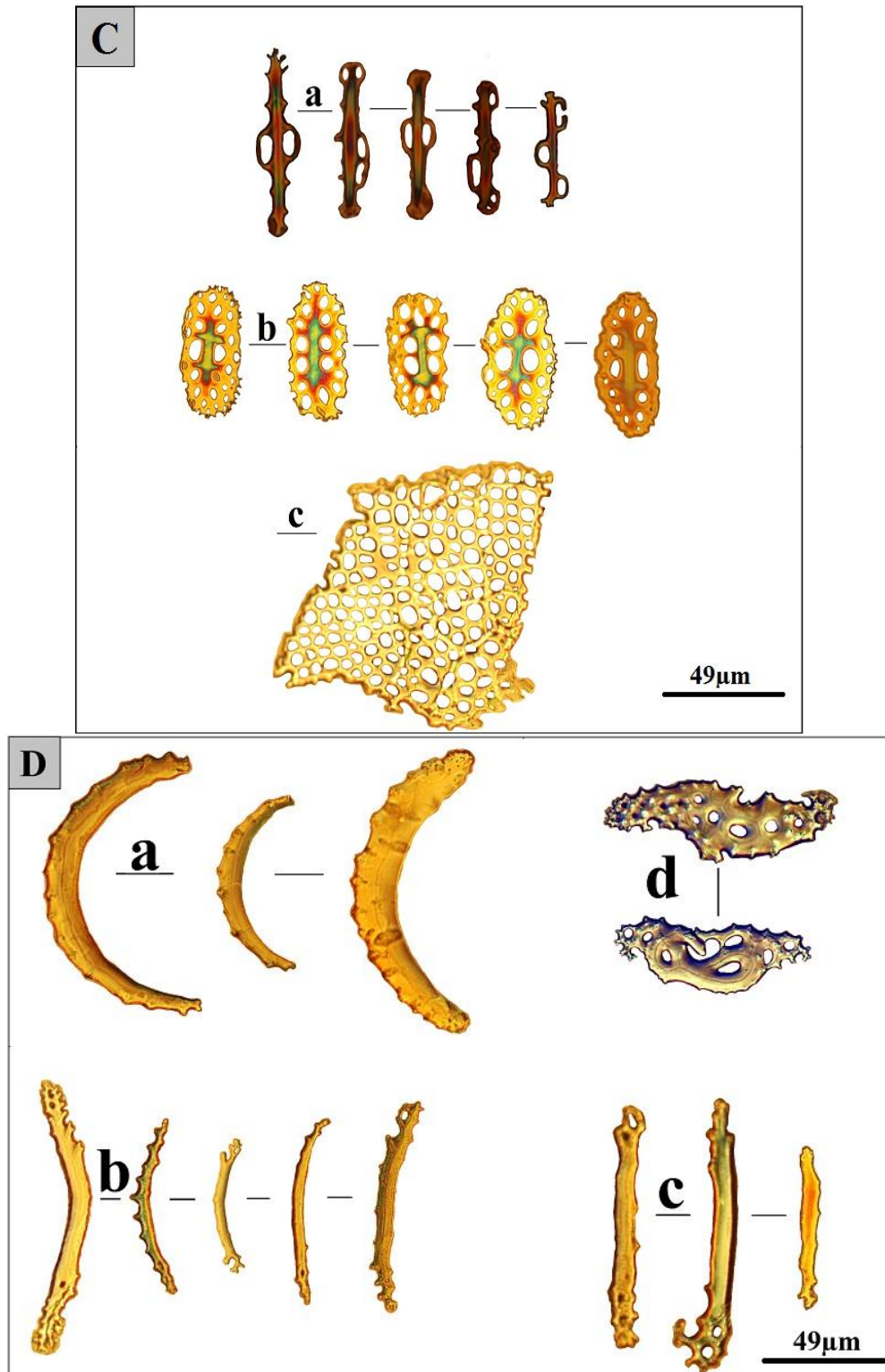


Figure 48 : Sclérites des podia (C) et des tentacules de *H. (R.) poli*. C-a : plaques perforées allongée à contour irrégulier ; C-b : plaques élargies ; C-c : plaque perforée. D-a : bâtonnets ont la forme de la lettre « C » ; D-b : bâtonnets arqués ; D-c : bâtonnet droits. D-c : bâtonnets droits ; D-d : bâtonnets épais.

I.3. Résultats des mensurations effectuées sur les sclérites des holothuries étudiées

Les valeurs moyennes de 26 mesures effectuées sur les sclérites des holothuries étudiées sont représentées dans les tableaux 6 et 7.

I.3.1. Analyse cluster

Afin de classer les différents groupes d'espèces d'holothurie à partir des mesures effectuées sur les sclérites, les valeurs moyennes des 26 mesures obtenues dans le tableau 6 et 7 sont utilisées. Le dendrogramme obtenue à partir de ces valeurs est représenté dans la figure 50.

Tableau 6: Les valeurs moyennes des mesures effectuées sur les sclérites de la face dorsale pour les espèces étudiées : *Holothuria (H.) stellati*, *Holothuria (H.) tubulosa A*, *Holothuria (H.) tubulosa B* et *Holothuria (R.) poli*. Se référer au tableau 4 (chapitre 2) pour les abréviations des variables. L'unité de mesure est le μm , le μm^2 pour la surface alors que les indices n'ont pas d'unité de mesure. [...] : indiquent les écart-type.

(Espèces)	LBfd	IBfd	NtBfd	STfd	SBfd	PBfd	FCfd	FAfd	Mfd	HFTfd	DdTfd	Kfd	IFTfd
<i>H. (H.) stellati</i>	38.39 [4.23]	19.05 [2.19]	11.70 [1.7]	142.28 [30.57]	610.42 [60.77]	110.45 [9.42]	0.62 [0.07]	0.50 [0.06]	0.24 [0.06]	23.65 [3.08]	22.62 [3.22]	0.95 [0.04]	10.42 [0.68]
<i>H. (H.) tubulosa A</i>	43.87 [6.03]	19.96 [1.5]	7.65 [1.89]	168.63 [35.21]	698.37 [70.23]	111.82 [11.92]	0.70 [0.07]	0.46 [0.05]	0.24 [0.05]	23.63 [3.42]	24.38 [2.93]	1.04 [0.15]	11.52 [1.33]
<i>H. (R.) poli</i>	25.01 [5.12]	13.37 [3.99]	6.80 [2.24]	85.15 [32.61]	288.80 [60.23]	67.66 [10.45]	0.79 [0.09]	0.55 [0.17]	0.28 [0.15]	23.99 [2.87]	24.81 [3.25]	1.04 [0.13]	10.32 [1.47]
<i>H. (H.) tubulosa B</i>	24.82 [4.91]	15.49 [3.12]	6.40 [1.05]	86.16 [42.38]	317.59 [70.44]	68.77 [12.29]	0.82 [0.06]	0.63 [0.09]	0.27 [0.05]	18.23 [3.22]	18.51 [3.42]	1.02 [0.14]	09.95 [1.86]

Tableau 7: Les valeurs moyennes des mesures effectuées sur les sclérites de la face ventrale pour espèces étudiées : *Holothuria (H.) stellati*, *Holothuria (H.) tubulosa A*, *Holothuria (H.) tubulosa B*, *Holothuria (R.) poli*. Se référer au tableau 4 (chapitre 2) pour les abréviations des variables. [...] : indiquent les écart-type.

(Espèces)	LBfv	lBfv	NtBfv	STtfv	SBfv	PBfv	FCfv	FAfv	Mfv	HFTfv	DdTfv	Kfv	IFTfv
<i>H. (H.) stellati</i>	29.04 [3.12]	16.12 [1.96]	7.90 [2.25]	43.12 [27.67]	378.91 [56.12]	76.03 [8.08]	0.82 [0.06]	0.57 [0.07]	0.11 [0.04]	16.24 [1.43]	16.02 [1.85]	0.99 [0.08]	7.23 [0.97]
<i>H. (H.) tubulosa A</i>	36.06 [4.12]	18.37 [1.82]	6.00 [1.06]	84.09 [18.25]	525.05 [55.72]	92.48 [8.62]	0.77 [0.05]	0.51 [0.04]	0.16 [0.06]	19.88 [3.34]	20.62 [3.02]	1.07 [0.27]	9.62 [1.56]
<i>H. (H.) poli</i>	20.03 [3.65]	12.75 [1.22]	5.10 [1.35]	48.33 [14.09]	210.46 [40.66]	54.44 [6.21]	0.89 [0.07]	0.65 [0.13]	0.23 [0.06]	19.10 [3.81]	18.87 [4.61]	0.99 [0.19]	11.04 [1.20]
<i>H. (H.) tubulosa B</i>	24.96 [4.22]	14.28 [2.08]	5.90 [1.09]	45.78 [19.27]	287.75 [70.45]	66.05 [10.12]	0.82 [0.06]	0.58 [0.08]	0.16 [0.05]	15.48 [1.55]	16.04 [2.11]	1.04 [0.14]	08.24 [0.83]

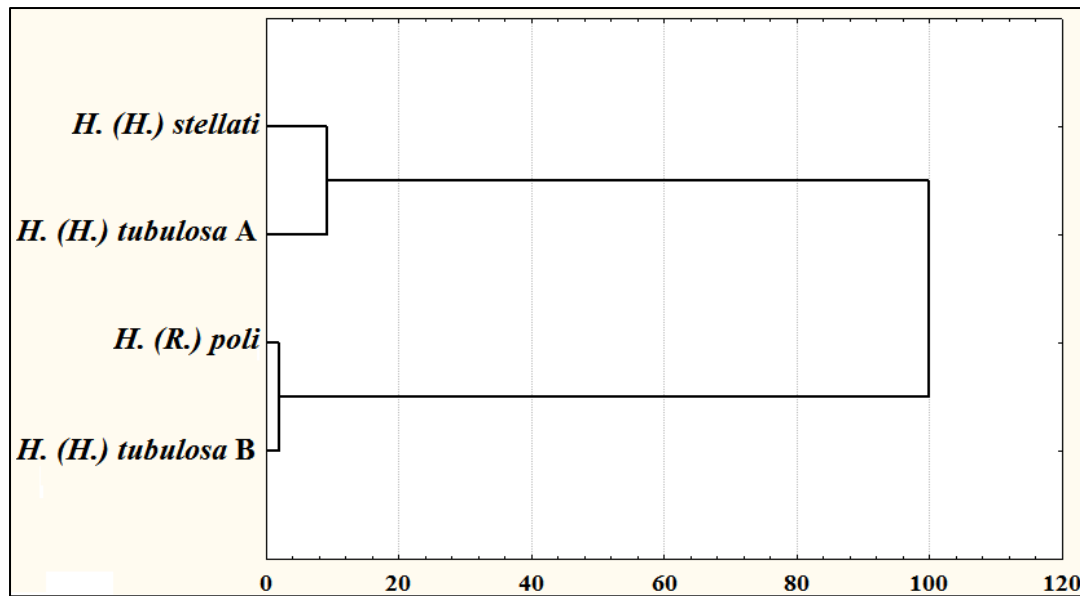


Figure 49 : Dendrogramme représentant la distance entre les groupes d'espèces par analyse clustering des sclérites (carré de la distance euclidienne, méthode de Ward).

Le Dendrogramme obtenu a permis de séparer les deux populations de *Holothuria (H.) tubulosa* A & B (Fig. 49). On s'aperçoit clairement la présence de deux groupes différents ; le premier englobe les individus de *H. (H.) stellati* et *H. (H.) tubulosa* A et la deuxième groupe englobe les individus de *H. (R.) poli* et *H. (H.) tubulosa* B.

Les résultats de la classification nous donne des indications qu'au niveau de l'endosquelette (les sclérites), *H. (H.) tubulosa* A (la classique) et *H. (H.) stellati* ont les mêmes dimensions. Ce résultat est similaire pour *H. (H.) tubulosa* B et *H. (R.) poli*.

Cela nous indique qu'il y a peut-être une relation de parenté entre *H. (H.) tubulosa* A et *H. (H.) stellati* d'une part et entre *H. (H.) tubulosa* B et *H. (R.) poli* d'autre part.

I.3.2. Analyse discriminante

L'exactitude de la classification des données de validation augmente avec le nombre de variables et le nombre d'observations. L'analyse discriminante est réalisée, à partir de 26 variables (mesures réalisées sur les sclérites), en tenant compte de l'ensemble des données. L'analyse discriminante pas à pas ascendante est détaillée dans les tableaux 08, 09 et (Annexe 07, Tab. II)

Tableau 08 : Analyse discriminante pas-à-pas ascendante réalisée à partir des mesures sur les sclérites (boucles et tourelles) de *Holothuria (H.) tubulosa* A, *Holothuria (H.) stellati*, *Holothuria (R.) poli* et *Holothuria (H.) tubulosa* B. Les variables sont classées, selon leur pouvoir discriminant, évaluées par la statistique lambda de Wilk. Voir tableau 4 pour la légende des variables.

Variables	Λ_{Wilk}	$\Lambda_{\text{partiel de Wilk}}$	F d'exclusion	niveau p	Tolérance	1-Tolérance (R ²)
I[#]Tfv[#]	0.000045	0.09655	15.59556	0.005693	0.196988	0.803012
LBfd	0.000016	0.273684	4.42308	0.071555	0.02265	0.97735
NtBfd[#]	0.000057	0.076814	20.03086	0.003239	0.142492	0.857508
FAfv[#]	0.000043	0.101658	14.72817	0.006464	0.155285	0.844715
Mfv[#]	0.00002	0.217861	5.98348	0.041456	0.271642	0.728358
HFTfv	0.000018	0.24585	5.11254	0.055406	0.161783	0.838217
HFTfd	0.000013	0.346854	3.13843	0.125046	0.416195	0.583805
SBfd	0.00001	0.417491	2.32543	0.191827	0.027736	0.972264

Les variables en gras et avec (#) sont les plus discriminantes.

Tableau 09 : Synthèse analyse pas-à-pas ascendante réalisée à partir des mesures sur les sclérites (boucles et tourelles) de *Holothuria (H.) tubulosa* A, *Holothuria (H.) stellati*, *Holothuria (R.) poli* et *Holothuria (H.) tubulosa* B.

Var. inc/exc	Etape	F.inc/exc	dl 1	dl 2	niveau p	Nbre de	Lambda	Valeur F	dl 1	dl 2	niveau p
I [#] Tfv(I)	1	81.89	3	12	0.00	1.00	0.046567	81.89	3	12	0.000
LBfd(I)	2	59.25	3	11	0.00	2.00	0.002713	66.72	6	22	0.000
NtBfd(I)	3	10.25	3	10	0.00	3.00	0.000665	52.24	9	24	0.000
FAfv(I)	4	8.18	3	9	0.00	4.00	0.000179	50.42	12	24	0.000
Mfv(I)	5	3.68	3	8	0.06	5.00	0.000075	45.29	15	22	0.000
HFTfv(I)	6	3.65	3	7	0.07	6.00	0.000029	44.07	18	20	0.000
HFTfd(I)	7	3.60	3	6	0.08	7.00	0.000010	45.162	21	18	0.000
SBfd(I)	8	2.32	3	5	0.19	8.00	0.000004	43.78	24	15	0.000

I.3.2.1. Interprétation de l'analyse discriminante pas-à-pas ascendante

L'analyse discriminante pas-à-pas ascendante a montré que les 8 variables (mesures) sélectionnées sur les sclérites (IFTfv, LBfd, NtBfd, FAFv, Mfv, HFTfv, HFTfd, SBfd ; Tab. 08) sont importantes pour discriminer les espèces, car lorsqu'on évalue leur pouvoir discriminant en utilisant la statistique Lambda de Wilk, on constate qu'elles sont plus riches en informations pour la discrimination des espèces. Par contre, les variables exclus de modèle (Annexe. VI), sont non discriminants et ne permettent pas de séparer les espèces.

L'exactitude de la classification obtenue pour les données de validation en fonction du nombre de variables introduites dans le modèle, présente les 4 variables suivantes : (NtBfd, IFTfv, FAFv, Mfv ; Tab. 08) comme les plus discriminantes. La décroissance de l'exactitude, observée au-delà de la 4e variable, indique que l'estimation des paramètres des fonctions discriminantes devient peu fiable (Tab. 08).

I.3.3. Analyse canonique

L'analyse canonique (factorielle discriminante) a été effectuée pour voir dans quel sens ces variables discriminent entre les espèces. Le résultat de cette analyse est détaillé dans les tableaux : 10, 11 & 12 et la figure 50.

Tableau 10 : Coefficients standardisés des fonctions discriminantes canoniques. L'analyse a été réalisée à partir des mesures sur les sclérites de *H. (H.) tubulosa* A & B, *H. (H.) stellati*, *H. (R.) poli*.

Variabes	Racine 1 ou F1	Racine 2 ou F2	Racine 3 ou F3
IFTfv	2.02	0.63	-0.37
LBfd	0.99	5.55	0.81
NtBfd	-0.79	-2.25	-0.94
FAfv	0.80	-2.12	-0.85
Mfv	1.66	0.12	0.34
HFTfv	-1.96	-0.66	-0.64
HFTfd	0.96	-0.61	-0.53
SBfd	-1.33	4.19	-1.39
Valeur propre	184.41	81.74	13.99
Pourcentage cumulé	0.65	0.95	1.00

Tableau 11 : Matrice de structure factorielle, Corrélations entre variables et fonctions linéaires discriminantes. L'analyse a été réalisée à partir des mesures sur les sclérites de *H. (H.) tubulosa* A & B, *H. (H.) stellati*, *H. (R.) poli*.

Variables	F1	F2	F3
lFTfv	0.31	0.15	-0.25
LBfd	-0.16	0.23	-0.53
NtBfd	-0.12	-0.08	-0.34
FAfv	0.11	-0.16	-0.01
Mfv	0.14	0.01	0.02
HFTfv	0.06	0.11	-0.25
HFTfd	0.01	0.015	-0.37
SBfd	-0.16	0.20	-0.46

Tableau 12 : Moyennes des Variables Canonique, (Fonctions aux barycentres des groupes). L'analyse a été réalisée à partir des mesures sur les sclérites de *H. (H.) tubulosa* A & B, *H. (H.) stellati*, *H. (R.) poli*.

Groupe	Racine 1 ou F1	Racine 2 ou F2	Racine 3 ou F3
<i>H. (H.) stellati</i>	-14.54	-7.18	-2.56
<i>H. (H.) tubulosa</i> A	-2.12	13.12	-1.28
<i>H. (R.) poli</i>	18.29	-4.33	-1.69
<i>H. (H.) tubulosa</i> B	-1.62	-1.61	5.55

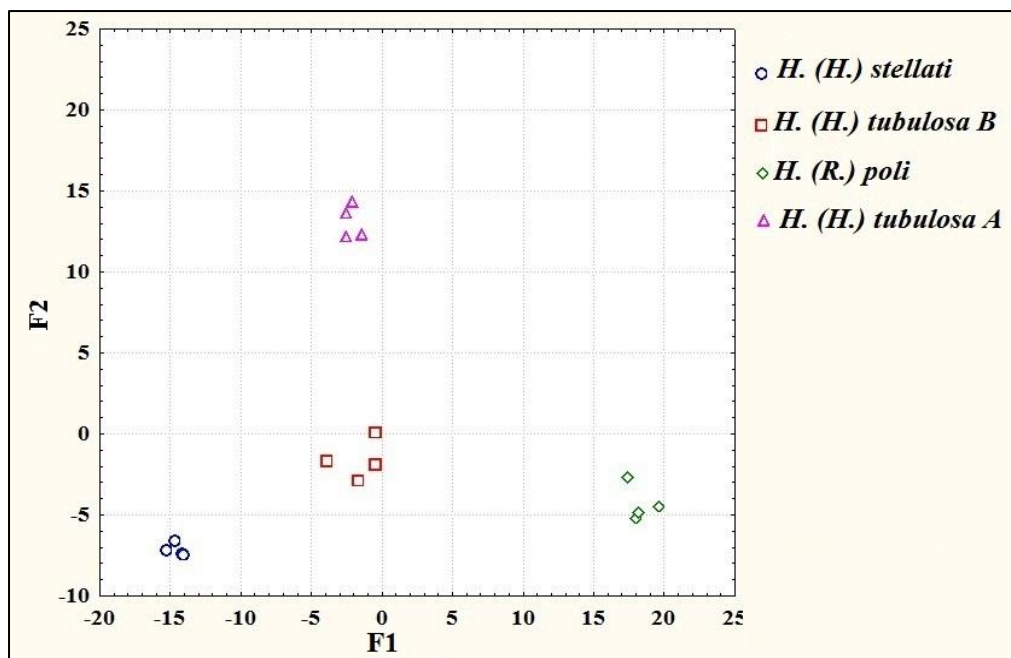


Figure 50: Deuxième fonction canonique en fonction de la première fonction canonique. Nuage de points des composantes canonique de *H. (H.) stellati*, *H. (H.) tubulosa* A, *H. (R.) poli*, *H. (H.) tubulosa* B (Statistica VI).

I.3.3.1. Interprétation des résultats de l'analyse canonique

La deuxième fonction canonique explique 30% de l'information (la variance) (Tab. 10). C'est donc la fonction qui sépare le groupe de *Holothuria (H.) tubulosa* A des autres groupes (Tab. 12, Fig. 50). Nous remarquons que la deuxième fonction discriminante est plus lourdement pondérée par LBfd, SBfd et FAFv, (Tab. 10 ; 11). Elle est pondérée positivement avec LBfd et SBfd et négativement avec FAFv. Ces variables discriminent entre les deux populations de *H. (H.) tubulosa* A & B

Pour l'analyse canonique en général la première et la deuxième racine canonique expliquent 95% de l'information. En effet, ce sont les deux racines les plus discriminantes (Tab. 10). La figure 51 visualise bien les résultats obtenus.

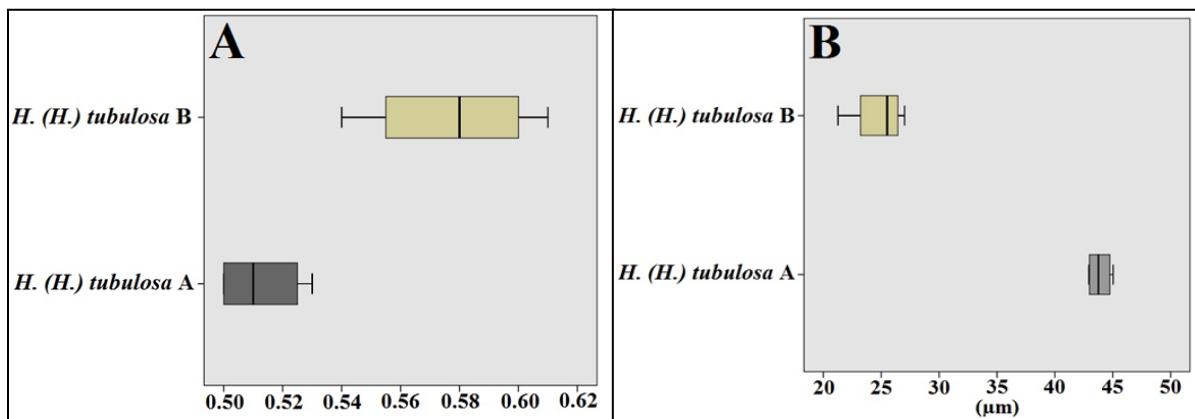


Figure 51: (A) : Valeurs moyennes de la variable forme allongée des boucles de la face ventrale des deux espèces : *H. (H.) tubulosa* B & *H. (H.) tubulosa* A. (B) : Valeurs moyennes de la variable longueur des boucles de la face dorsale pour les mêmes espèces.

II. Phylogénie et phylogéographie des espèces d'holothuries étudiées

II.1. Comparaison des données de séquences d'ADN fournis avec ceux du Genbank

Les séquences du gène ARNr 16S de chaque individu d'espèces étudiées comparées avec les données du Genbank (NCBI) ont révélé des résultats suivant :

Les espèces de *H. (H.) Holothuria tubulosa* A correspondent à *H.(H.) mammata*, les individus de *H.(H.) stellati* correspondent à *H. (R.) arguinensis*, les espèces de *H. (H.) tubulosa* B correspondent à la classique *Holothuria tubulosa* et finalement les individus de *H. (R.) poli* correspondent à *H. (R.) poli*.

Les données moléculaires confirment nos précédents résultats sur le fait que *H (R.) poli* correspond bien à celle précédemment décrite par Koehler (1921) et que les deux populations d'*H. (H.) tubulosa* (A & B) sont distinctes. Cependant, on a remarqué des contradictions entre les données endosquelettiques (description des sclérites) et les données moléculaires (séquences d'ADN) concernant les deux populations *H. (H.) tubulosa* (A & B). Selon l'étude moléculaires, les individus inclus dans la population "B" d'*H (H.) tubulosa* représente l'espèce classique déjà décrite par Koehler (1921) tandis que les six (6) individus inclus dans la population d'*Holothuria tubulosa* A présentent des espèces de *Holothuria (H.) mammata*. Nos échantillons analysés morphologiquement et anatomiquement ne présentent pas d'organes de défenses (ou organes de Cuvier) qui est la caractéristique anatomique principale de *Holothuria (H.) mammata*. Le tableau 13 représente les abréviations des individus des espèces étudiées.

Tableau 13 : Les abréviations des espèces d'holothuries étudiées (les séquences d'ADN).

Codes	Signification des espèces	Espèce
Hp1T	<i>Holothuria poli_1_</i> Tamentefoust	<i>Holothuria (R.) poli</i>
Hp2SF	<i>Holothuria poli_2_</i> Sidi-Fredj	
Hp3SF	<i>Holothuria poli_3_</i> Sidi-Fredj	
Hp4F	<i>Holothuria poli_4_</i> Figuiet-plage	
Hp5F	<i>Holothuria poli_5_</i> Figuiet-plage	
Hp6T	<i>Holothuria poli_6_</i> Tamentefoust	
Hp7T	<i>Holothuria poli_7_</i> Tamentefoust	
Hp8T	<i>Holothuria poli_8_</i> Tamentefoust	

Hp9T	<i>Holothuria poli_9_ Tamentefoust</i>	<i>Holothuria (R.) poli</i>
Hp10T	<i>Holothuria poli_10_ Tamentefoust</i>	
Hp11T	<i>Holothuria poli_11_ Tamentefoust</i>	
Hp12SF	<i>Holothuria poli_12_ Sidi-Fredj</i>	
Hp13SF	<i>Holothuria poli_13_ Sidi-Fredj</i>	
Hp14SF	<i>Holothuria poli_14_ Sidi-Fredj</i>	
Ha1F	<i>Holothuria stellati_1_ Figuier-plage</i>	<i>Holothuria (H.) stellati</i>
Ha2F	<i>Holothuria stellati_2_ Figuier-plage</i>	
Ha3S	<i>Holothuria stellati_3_ Stidia</i>	
HtA1S	<i>Holothuria tubulosa_A_1_ Stidia</i>	<i>Holothuria (H.) tubulosa A</i>
HtA2S	<i>Holothuria tubulosa_A_2_ Stidia</i>	
HtA3S	<i>Holothuria tubulosa_A_3_ Stidia</i>	
HtA4SF	<i>Holothuria tubulosa_A_4_ Sidi-Fredj</i>	
HtA5BM	<i>Holothuria tubulosa_A_5_ Banyuls sur mer</i>	
HtA6F	<i>Holothuria tubulosa_A_6_ Figuier plage</i>	
HtA8S	<i>Holothuria tubulosa_A_8_ Stidia</i>	
HtA9S	<i>Holothuria tubulosa_A_9_ Stidia</i>	
HtB1F	<i>Holothuria tubulosa_B_1_ Figuier-Plage</i>	<i>Holothuria (H.) tubulosa B</i>
HtB2SF	<i>Holothuria tubulosa_B_2_ Sidi-Fredj</i>	
HtB3S	<i>Holothuria tubulosa_B_3_ Stidia</i>	
HtB4F	<i>Holothuria tubulosa_B_4_ Figuier-Plage</i>	
HtB5SF	<i>Holothuria tubulosa_B_5_ Sidi-Fredj</i>	
HtB6F	<i>Holothuria tubulosa_B_6_ Figuier-Plage</i>	

II.2. Arbre phylogénétique des espèces d'holothuries étudiées

L'étude phylogénétique a été établie en élaborant un arbre par la méthode du Maximum de Vraisemblance « Maximum Likelihood » et en utilisant le programme "jModeltest 2.1.3" (Posada, 2008). Le modèle "K2P" a été considéré comme le plus adéquat à l'étude avec le paramètre de distribution Gamma "G" (Annexe 03; Tab. I). En utilisant un nombre de répliques bootstrap de 100, l'arbre phylogénétique des individus (de chaque espèce) séquencés dans notre étude a été établi selon la méthode "ML" (Annexe 02) par le programme "MEGA 5.0"

(Tamura *et al.* 2011) en utilisant des séquences de 411 Pb de long alignées par le programme "BioEdit" (Hall, 1999).

Nous avons utilisé l'espèce *Holothuria (Platyperona) forskali* comme groupe externe ou "out groupe".

D'après l'arbre phylogénétique obtenu (Fig. 52) nous remarquons que les individus de l'espèce *Holothuria (H.) tubulosa* A sont proche avec ceux d'*H. (H.) stellati*. Ce résultat converge avec les résultats de l'analyse de sclérites (Fig. 49). Nous constatons aussi que *Holothuria poli* et l'espèce la plus divergente et la plus lointaine des autres espèces.

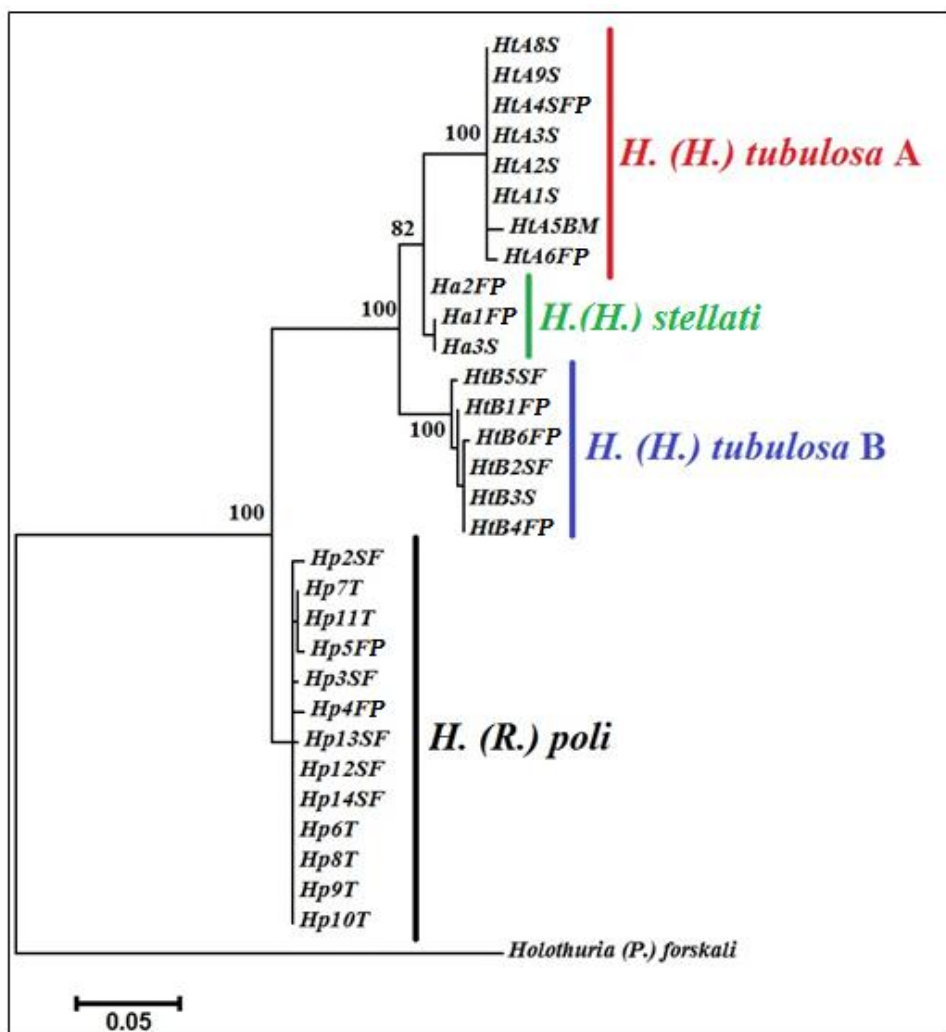


Figure 52: Arbre phylogénétique établi pour les quatre espèces d'holothuries aspidochirotes étudiées par la méthode de Maximum vraisemblance. (100 replicat bootstraps) (Le modèle choisi est le K2P plus Gamma distribution. S= Stidia, SF= Sidi-Fredj, FP= Figuier-plage, BM= Banyuls-sur-Mer, T=Tamentefoust.

II.3. Tests moléculaires et l'étude phylogéographique par les haplotypes

Le séquençage d'un fragment de 411 Pb de long du gène mitochondrial ARNr 16S révèle l'existence de 53 sites polymorphes, permettant ainsi de définir 18 haplotypes sur l'ensemble des 31 individus séquencés (Annexe 09). Sur ces 42 sites polymorphes, 79,25% des sites sont parcimonieusement informatifs et 20,75% sont des singletons.

A l'aide du programme DNASP 5.10 (Rozas *et al.*, 2010), nous avons obtenu des valeurs moyennes de la diversité haplotypique « Hd » de 0,93 et la diversité nucléotidique « π » de 0,050 (Annexe 10). Cependant, la valeur de la diversité nucléotidique par la méthode de Jukes et Cantor (1969) est de 0,053. Les niveaux de la diversité génétique sont représentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Diversité génétique pour l'ensemble des espèces d'holothuries. NS : nombre de séquences, S : nombre de site de ségrégation, h : nombre d'haplotype, Hd : diversité haplotypique, π : diversité nucléotidique, π_{jc} : diversité nucléotidique avec la méthode de Juke et Cantour (1969) « JC ».

Espèces	NS	S	h	Hd	π	π_{jc}
<i>H. (R.) poli</i>	14	9	8	0,82	0,004	0,004
<i>H. (H.) tubulosa A</i>	8	6	4	0,64	0,004	0,004
<i>H. (H.) tubulosa B</i>	6	5	4	0,80	0,005	0,005
<i>H. (H.) stellati</i>	3	3	3	1,00	0,005	0,005

II.3.1. Test de McDonald et Kreitman

Le tableau 15 décrit les résultats de ce test :

Tableau 15 : Test de McDonald et Kreitman (1991) entre les différentes populations d'holothuries.

	KN/KS	Θ_N/Θ_S	Valeur de p
<i>H. (R.) poli</i> et <i>H. (H.) stellati</i>	3.16	2	0.69
<i>H. (R.) poli</i> et <i>H. (H.) tubulosa A</i>	2.3	2.5	1
<i>H. (R.) poli</i> et <i>H. (H.) tubulosa B</i>	2.5	3.33	0.70
<i>H. (H.) stellati</i> et <i>H. (H.) tubulosa A</i>	2.33	1	0.63
<i>H. (H.) stellati</i> et <i>H. (H.) tubulosa B</i>	0.62	1.33	0.64
<i>H. (H.) tubulosa B</i> et <i>H. (H.) tubulosa A</i>	1.37	2	0.70

Pour les 6 tests, la valeur de p était pas du tout significative, malgré cela, nous avons noté une sélection Darwinienne entre les taxons, plus précisément entre *H. (R.) poli* et *H. (H.) stellati* et entre *H. (H.) stellati* et *H. (H.) tubulosa* A. Un maintien d'un polymorphisme ancestral entre taxons dans le cas où $KN/KS < \Theta N/\Theta S$.

II.3.2. Phylogéographie

Les analyses du polymorphisme mitochondrial, sous l'hypothèse de neutralité, fournissent des pistes intéressantes sur l'histoire de l'expansion géographique de chaque groupe d'individus des espèces d'holothuries étudiées. En absence d'effet sélectif, ces caractéristiques suggèrent une récente augmentation de la taille des populations. Nous pouvons, cependant, voir sur la représentation des relations minimales entre les différents haplotypes (Fig. 53), qu'il y a trois groupes bien distincts représentant chaque taxon étudié (nous n'allons pas détailler l'haplotype de *H. (H.) stellati* à ce stade)

L'espèce *H. (R.) poli* est représentée par 8 haplotypes dont seulement 2 sont représentés à plus d'un seul exemplaire (Hp1, Hp2) (Fig. 53). L'haplotype Hp1 contient les individus : (Hp6T, Hp8T, Hp9T, Hp10T, Hp12SF, Hp14SF). Quant à l'haplotype Hp2 contient les individus : (Hp7T, Hp11T) (se référer au tableau 13 pour les abréviations).

L'espèce *H. (H.) tubulosa* A est représentée par 5 haplotypes dont seulement 1 est représenté à plus d'un seul exemplaire (HtA) (Fig. 53). L'haplotype HtA contient les individus: (HtA2S, HtA3S, HtA4SF, HtA8S, HtA9S).

L'espèce *H. (H.) tubulosa* B est représentée par 4 haplotypes dont seulement 1 est représenté à plus d'un seul exemplaire (HtB) (Fig. 53). L'haplotype HtB contient les individus : (HtB2SF, HtB3S, HtB4FP.).

II.3.2.1. Discussion de la phylogéographie des différentes espèces d'holothuries

Le réseau d'haplotypes (Fig. 53) montre qu'il y a une distribution en étoile. Ceci expliquerait une explosion démographique récente des espèces étudiées. Celle-ci pourrait être due à la colonisation de nouveaux territoires après la fin du dernier maximum glaciaire il y a environ 20000 ans. Ce qui a induit l'augmentation du niveau de la mer et donc la formation du passage des eaux atlantique vers la mer Méditerranée par le détroit de Gibraltar.

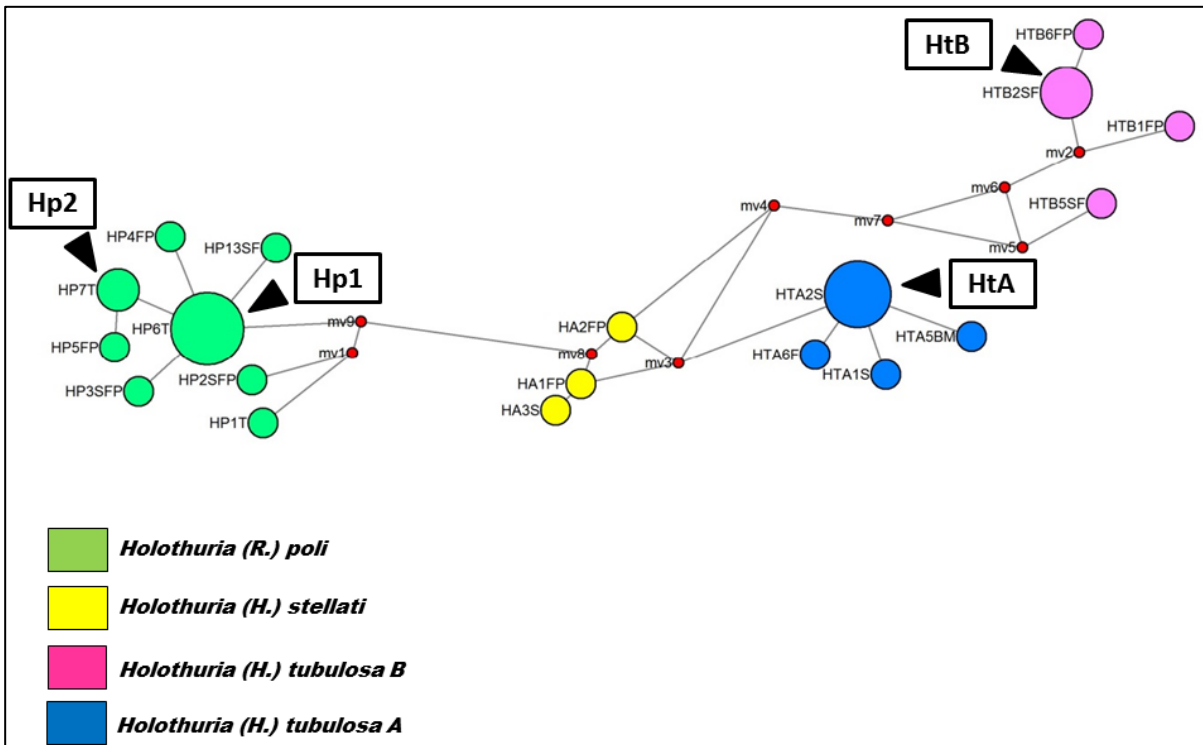


Figure 53 : Réseaux d'haplotypes représentant les relations minimales entre les différents haplotypes des quatre espèces d'holothuries séquencées. mv= nœud hypothétique.

III. Discussion générale

Après l'étude minutieuse des sclérites de l'espèce *H. (H.) stellati* nous sommes presque sûres que les individus révisés pour cette espèce correspondraient à *Holothuria (R.) arguinensis*, une espèce exotique de la mer Méditerranée. Cette espèce qui a été récemment signalée sur les côtes algériennes par Mezali et Thandar (2014), est originaire de la partie Est de l'Atlantique. Les sclérites de individus analysés ont été comparés avec la description originale faite par Koehler et Vaney (1906) et des photos de Gonzalez-Wanguemert *et al.*, (2012) [Annexe 10; Figs.VII, VIII]. Nous avons remarqué que les sclérites de la face dorsale sont différents par rapport à ceux de la face ventrale, ce qui converge parfaitement avec la description originale de cette espèce faite par Koehler et Vaney (1906). Nous avons aussi noté la dominance de sclérites qui ont la forme du chiffre « 8 » ou un sablier ce qui a été déjà signalé par Mezali et Thandar (2014). La comparaison des séquences d'ADN de ces individus avec ceux de Genbank supporte ce résultat.

Cependant, ce résultat est à prendre avec précaution sur la nomination de l'espèce sur le plan moléculaire, car cela nécessite une étude plus poussée des caractéristiques morphologiques et anatomiques que Borrero *et al.* (2010) et Gonzalez-Wanguemert *et al.* (2012) n'ont pas considéré dans leurs études. Par ailleurs, quelques taxonomistes des holothuries (ex : Ahmed Thandar) suggèrent que les données moléculaires seules sont insuffisantes pour statuer sur la nomenclature des espèces d'holothuries compte tenu du statut taxonomique de *H. (H.) stellati* par exemple a été sujet de beaucoup de discussions et beaucoup de changements dans la littérature. En effet, le débat se poursuit depuis 90 ans sur la position taxonomique de cette espèce.

Borrero *et al.* (2009) ont trouvé des résultats contradictoires avec ceux de Koehler (1921) concernant les deux espèces *H. (H.) mammata* et *H. (H.) tubulosa*. Pour le reste de cette présente étude nous allons prendre à priori l'appellation de *Holothuria (R.) arguinensis* au lieu de *Holothuria (H.) stellati*.

Pour les individus de *Holothuria (R.) poli*, la situation est plus facile. Cette espèce est facilement reconnue grâce à ses pieds ambulacraires blanchâtres. L'espèce a la particularité de se couvrir avec une fine couche de sable et est de ce fait aisément reconnue *in situ* par sa capacité de se camoufler (Mezali, 2008). Elle présente des sclérites caractéristiques (boucles) dont la surface est parfaitement lisse (Fig. 46 ; 47).

Le long de l'histoire de la classification des Holothuries, les taxonomistes ont été sûrs et tous d'accord que *Holothuria (H.) tubulosa* l'espèce la mieux connue et la plus fréquente dans la Mer Méditerranée, présente qu'une seule espèce bien séparée des autres. Nos résultats indiquent que *Holothuria (H.) tubulosa* présente deux types d'espèces cryptiques qu'on a noté [*Holothuria (H.) tubulosa* A et *Holothuria (H.) tubulosa* B]. D'après les résultats obtenus ces deux variétés d'espèces s'avèrent distinctes aussi bien sur le plan morphologique, anatomique et endosquelettiques. D'après notre révision systématique et statistique en réalisant plusieurs mensurations sur les sclérites à partir des données fournies par Mezali (2008) on s'aperçoit clairement que les deux populations de *H. (H.) tubulosa* A & B sont bien séparées et pourraient représenter deux variétés d'espèces. Les résultats de l'analyse discriminante et la classification des espèces par la méthode de Ward supportent ce point de vue. Les individus de *Holothuria (H.) tubulosa* A (classique déjà décrites par Koehler, 1921) sont beaucoup plus proches à ceux de *Holothuria (R.) arguinensis* qu'à ceux de *Holothuria tubulosa* B. L'arbre phylogénétique établi par la méthode de Maximum de vraisemblance supporte aussi bien ce résultat (Fig. 52). Selon les séquences d'ADN analysés, on remarque que les quatre espèces sont bien séparées. En effet, *Holothuria (R.) arguinensis* est beaucoup plus proche aux deux populations de *H. (H.) tubulosa* A & B qu'à *Holothuria (R.) poli*. Borrero *et al.*, (2010) ont signalés une relation très proche entre *H. (H.) tubulosa* et *H. (R.) arguinensis* et c'est le cas dans la présente étude (Annexe 11). Le phylogramme (Fig. 52) illustre aussi que *Holothuria (R.) poli* est l'espèce la plus divergente des autres espèces considérées. Ce même résultat a été signalé par Borrero *et al.*, (2010). Les analyses statistiques nous ont donné des indications très fortement significatives et montrent que les deux populations de *Holothuria (H.) tubulosa* (A & B) sont différentes. Cela nous laisse penser que la population d'*Holothuria (H.) tubulosa* B présente une autre espèce totalement différente d'*Holothuria (H.) tubulosa* A (classique) précédemment décrite par Koehler (1921).

Pour voir la source probable de l'espèce exotique *Holothuria (R.) arguinensis* nous avons réalisé une étude phylogéographique par les haplotypes.

IV. Discussion de la phylogéographie de l'espèce *H. (R.) arguinensis*

Pour étudier la phylogéographie de l'espèce exotique *H. (R.) arguinensis*, des séquences d'ADN de l'espèce *H. (R.) arguinensis* ont été tirées du Genbank pour les utiliser. Trois séquences des individus des Iles Canaries et d'un individu de la station d'Algarve, Portugal (36° 57.521' N, 7° 56.781' O) (Fig. 55).

L'arbre phylogénétique (Fig. 54) et le réseau d'haplotype confirment que la source probable de nos échantillons est bien évidemment située en Atlantique. Les individus de Figuiers-Plage et de Stidia sont dans le même haplotype avec l'individu des côtes Portugaise. Donc, probablement la provenance de *Holothuria (R.) arguinensis* est située dans les côtes du Portugal. Plusieurs théories supportent ce résultat. En effet, on pense que les larves de ces individus ont été acheminées par le courant entrant de l'Atlantique (par le détroit de Gibraltar, la proximité d'Algarve de ce détroit joue un rôle primordial). Ce courant est permanent, en suite ce même courant et au-delà de la mer d'Alboran se transforme et forme ce qu'on appelle le courant Algérien, ce dernier a une trajectoire parallèle à la côte Algérienne (voir chapitre 1). Donc comme résultat, les larves sont dispersés le long de la côte Algérienne surtout la partie Ouest et centre (où l'espèce a été signalée). Une autre théorie, c'est les eaux de ballast, du fait que le détroit de Gibraltar est un passage économique très important, par conséquent de centaines de navires, naviguent dans cette partie du monde. Ce qui constitue un moyen de transport pour les larves des holothuries de l'Atlantique (Par ex : les larves de *Holothuria (R.) arguinensis*).

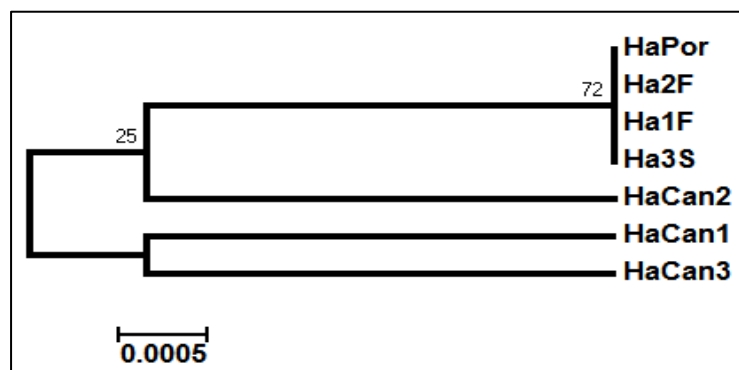


Figure 54 : Arbre phylogénétique établi par la méthode « ML » représentant les espèces de *H. (R.) arguinensis* étudiées (présent travail, voir le tableau 13 pour l'explication des abréviations) avec les individus de *H. (R.) arguinensis* tirées de Genbank. Por (Algarve, Portugal) ; Can (Iles canaries). Le nombre de répliques bootstarp= 100.

Pour les individus des îles Canaries la situation est plus ou moins différente. Les individus sont séparées (chaque individu par un haplotype ; normalement toutes les individus seront dans le même haplotype et au moins un sera dans l'haplotype des échantillons des sites de la côte algérienne et ceux du Portugal !) ce qui reflète une faible connectivité entre les individus (des Iles Canaries) d'une part et les individus des continents d'autre part. Ce même résultat a été précédemment suggéré par des auteurs chez d'autres espèces. Par exemple une rupture génétique significative a été détectée entre La Macaronésie et les populations continentales de

Diplodus sargus, une espèce de poisson qui présente à la phase adulte des déplacements autonomes et une vie larvaire pélagique (Gonzalez-Wanguemert *et al.*, 2010 ; 2011). Cette hypothèse a été aussi précédemment suggérée dans les travaux de [Sa-pinto *et al.*, 2008 ; Perez-Portela *et al.*, (2010)] pour les populations de patelles et chez l'étoile de mer *Marthasterias glacialis*.

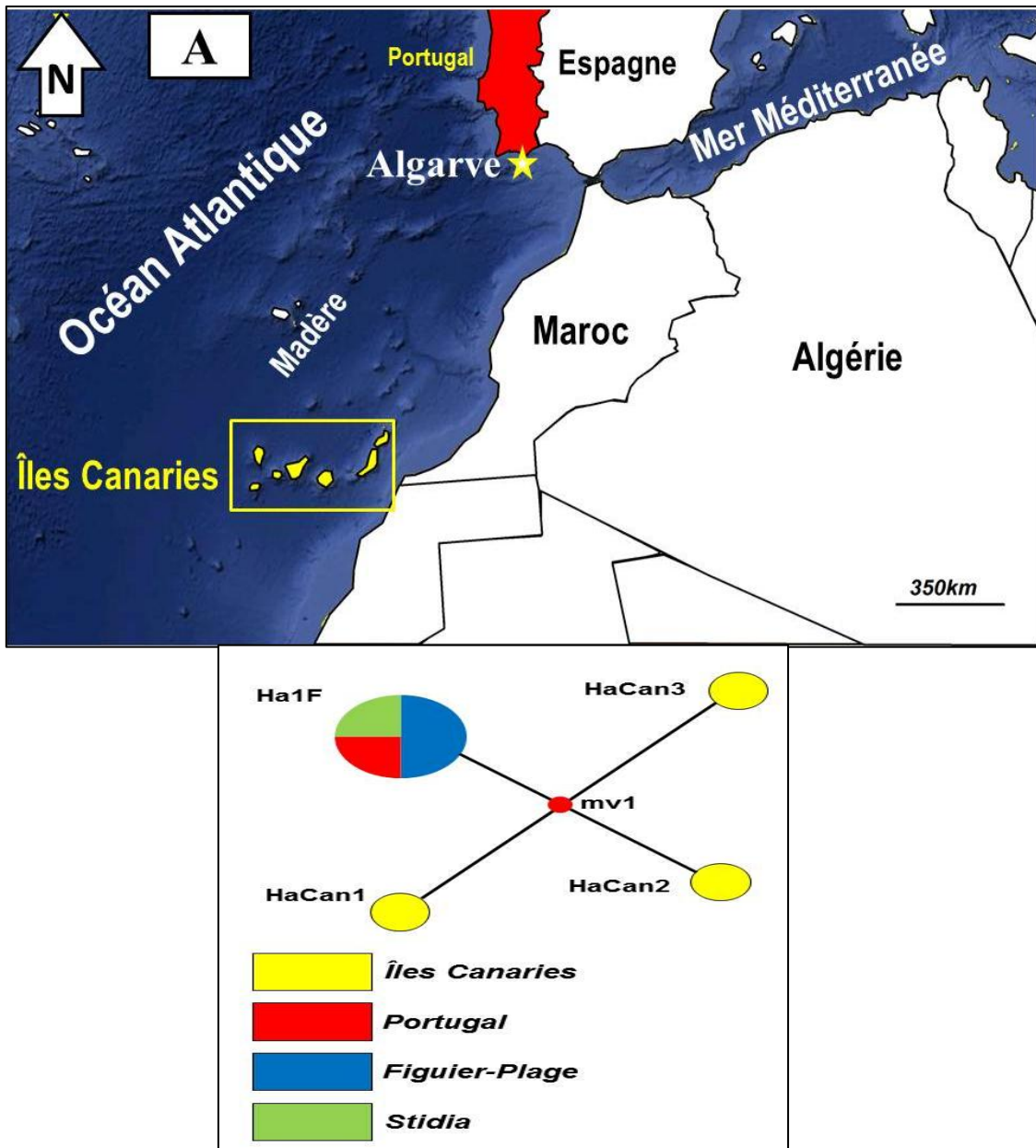


Figure 55 : (A) : Position géographique des Iles Canaries et de la station d'Algarve (Portugal) (Google earth, modifiée par Mansouri). (B) : Réseau d'haplotypes représentant les relations minimales entre les différents haplotypes de l'espèce exotique *H. (R.) arguinensis* étudiée et comparées aux données tirées de Genbank avec les stations étudiées.

Conclusion

Conclusion

À travers cette étude nous avons :

- ✓ révisé la systématique et la phylogénie de quelques espèces d'holothuries aspidochirotes de la partie centre et Ouest de la côte algérienne en utilisant une partie des données endosquelettiques et moléculaire fournis par Mezali (2008). Pour cela, nous avons renforcé les statistiques et les méthodes moléculaires en multipliant les variables (mesures effectuées sur les sclérites) et en utilisant plusieurs nouveaux logiciels utilisés en géométrie morphologique et en bioinformatique.

L'arbre phylogénétique (obtenue par la méthode de « ML ») confrontés aux données morphologiques (analyse cluster des sclérites et l'analyse canonique) ont permis de mieux cerner les différences qui existent entre les espèces et de faire la distinction entre les catégories d'espèces. Le phylogramme et le dendrogramme révèlent en générale la présence de quatre groupes d'espèces bien séparées sur les plans morphologique, anatomique, endosquelettiques (sclérites) et génétique (séquences d'ADN analysés). Ces quatre groupe d'holothuries sont : *Holothuria (Holothuria) tubulosa* A (classique) ; *Holothuria (H.) tubulosa* B (supposé nouvelle à la science) et *Holothuria (R.) poli*. Quant à *H. (H.) stellati* dont la taxonomie reste toujours floue n'a pas pu être identifiée, nos échantillons analysés aussi bien sur les plans morphologiques et génétiques révèlent qu'il s'agit de l'espèce exotique originaire de l'Atlantique il s'agit d'*Holothuria (R.) arguinensis* récemment identifié sur les côtes algériennes par Mezali et Thandar (2014). Ces différences sont validées essentiellement par les caractéristiques endosquelettiques (sclérites), nettement différentes d'un groupe d'espèces à l'autre sauf dans le cas des deux populations d'*Holothuria (H.) tubulosa* (A & B) où les approches statistiques nous ont aidé d'une manière pertinente de noter les différences qui existent entre elles en tenant en compte du critère endosquelettiques (mesures effectuées sur les sclérites de ces espèces). Concernant ces deux formes d'*Holothuria (H.) tubulosa* (A & B), nous avons confirmé les résultats déjà annoncés par Mezali (2008) sur l'existence d'une nouvelle espèces d'*Holothuria (H.) tubulosa* B dont la description est différente d'*Holothuria (H.) tubulosa* A tant sur le plan morphologique que génétique. En effet, le phylogramme et le dendrogramme obtenues confirment que *Holothuria (H.) tubulosa* ne représente pas une seule espèce, mais deux espèces cryptiques (Mezali et Francour, 2012). La description de *H. (H.) tubulosa* A ressemble à celle de la description classique de l'espèce type déjà décrite par Koehler (1921). Par contre, *H. (H.) tubulosa* B, caractérisée par un tégument flasque et par la réduction en

taille de ses structures endosquelettiques (notamment les boucles) nous laisse penser qu'il s'agit d'une espèce différentes de *H. (H.) tubulosa* A, qui n'a pas encore été décrite ou suspectée [résultat a été déjà signalé par (Mezali, 2008)]. De ce fait, il nous paraît important de statuer sur la future nomenclature de cette espèce.

Holothuria (R.) poli, est facilement reconnaissable dans l'eau par la particularité de se couvrir avec une fine couche de sable, par ses pieds ambulacraires blanchâtres et par ses sclérites dont la surface est parfaitement lisse. *Holothuria (R.) arguinensis* est caractérisée par la présence des grosses protubérances sur la face dorsale, des sclérites qui sont totalement différents d'une face à l'autre (bivium et trivium). Le plus souvent la face dorsale présente des sclérites caractéristiques qui ont la forme du chiffre « 8 » ou un sablier (Mezali et Thandar, 2014), tandis que les sclérites de la face ventrale sont caractérisés par des boucles dont les trous sont réduits.

La présence de *Holothuria (H.) stellati* dans la base de nos données reste à vérifier par une évaluation plus poussée de sa systématique en étudiant plus profondément les structures anatomiques et morphologiques et en utilisant sur le plan génétique d'autres marqueurs moléculaires plus appropriés sur les tissus conservés, comme les allozymes et la COI. Ceci nécessite des moyens coûteux qu'on espère réaliser à l'avenir. D'après les données moléculaires (séquences) obtenus sur les trois individus révisés et comparés aux données de Genbank, correspondrait à l'espèce exotique *Holothuria (R.) arguinensis*, espèce qui fréquente en générale la partie Est de l'Atlantique. Ce résultat est à retenir avec précaution et reste à vérifier, du fait qu'on ignore la méthodologie utilisé par les chercheurs qui ont diffusé ces données de séquences d'ADN sur Genbank ou Bold.

Les résultats phylogéographiques des holothuries aspidochirotés étudiées montrent que ces espèces sont influencées par le changement climatique et le bouleversement des écosystèmes. Malheureusement, à cause de données manquants, nous ne pouvons pas confirmer d'une manière décisive les causes de la colonisation de l'espèce Atlantique *Holothuria (R.) arguinensis*. Il nous paraît important à l'avenir de réaliser une étude concernant la densité de cette espèce invasive sur nos côtes algériennes.

L'analyse discriminantes et l'analyse canonique réalisées à partir des mesures de sclérites (boucles et tourelles) ont montré que les mesures réalisées sur les boucles NtBfd (Nombre de trous des boucles de la face dorsale), FAFv (indice de la forme allongée des boucles de la face ventrale), Mfv (ratio entre la surface total des trous et la surface des boucles de la face ventrale) et LBfd (Longueur des boucles de la face dorsale) sont les mesures les plus importantes pour une future détermination des espèces d'holothuries aspidochiotes.

Les résultats phylogéographique indiquent que la provenance de l'espèce *Holothuria (R.) arguinensis* est l'océan Atlantique, ce qui en accord avec les données de la littérature.

Perspectives de recherche

Il est nécessaire à l'avenir de multiplier les zones de collecte des holothuries aspidochiotes sur la côte algérienne (notamment la partie Est qui n'est pas encore étudiée), en vue de déterminer les variations géographiques entre populations, afin de mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle de spéciation chez ces animaux.

Il est nécessaire aussi d'augmenter l'effectif des échantillons (le nombre d'individus pour chaque type d'espèces) et de renforcer les statistiques et pourquoi pas l'utilisation d'autre méthodes de clustering (saut-minimum, saut-maximum, les K-means, ACP...) afin de bien séparer et distinguer entre les espèces des holothuries aspidochiotes de la côte algérienne.

Il est nécessaire aussi d'explorer les sclérites des organes interne (arbres respiratoires, muscles de la paroi du corps) qui sont mal étudiées. La morphologie des sclérites des organes internes, peuvent nous apporter des éléments de réponses pour l'identification formelles de quelques espèces [ex : sur l'espèce *H. (H.) stellati* longtemps débattue dans la littérature].

Il serait aussi intéressant de confirmer l'exactitude de nos résultats moléculaires par l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires tel que : l'ARNr 12S, ITS et COI, qui sont d'excellents marqueurs, pour lever toute ambiguïté surtout pour la nouvelle espèce *Holothuria (H.) tubulosa* B et pour confirmer à nouveau le statut taxonomique de *H. (H.) stellati*.

Références Bibliographiques

Agudo N., 2007. Manuel d'écloserie d'holothuries de sable. The World-Fish Center, Secretariat général de la Communauté du Pacifique et Australian Centre for International Agricultural Research. 43 p.

Bandelt H. J., Forster P., Rohl A., 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16(1): 37–48.

Bather F. A., 1900. The Echinoderma. In: Lankester, E. R. (Ed.), A treatise on zoology, part III. Adam & Charles Black, London, UK, pp. 1–344.

Belbachir N., 2012. Contribution à l'étude écologique de l'herbier à *Posidonia oceanica* (L.) Delile (1813) de la frange côtière de Mostaganem : Etat de santé et relation entre plante et échinoderme. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. universite Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Algérie*, 178 p.

Bell J.D., Purcell S.W. et Nash W.J. 2008. Restoring small-scale fisheries for tropical sea cucumbers. *Ocean and Coastal Management* 51:589–593.

Bertoncini Á. A., Machado L.F., Barreiros J.P., Paulay G., and Cardigos F.A.D., 2008. In situ observation of sexual reproduction of *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1788 (Echinodermata: Holothuroidea) in the Azores (NE Atlantic), *Bulletin de la CPS La bêche-de-mer* 27: 43-45.

Béthoux J. P., 1979. Budgets of the Mediterranean Sea. Their dependance on the local climate and on the characteristics of the Atlantic waters. *Oceanologica Acta* 2, 157-163.

Bonham K., Held E. E., 1963. Ecological observations of the sea cucumbers *Holothuria atra* and *H. leucospilota* at Rongelap Atoll, Marshall Islands. *Pacif. Sci.*, 17: 305-314.

Borrero-Perez G., Gomez-Zurita J., Gonzalez-Wanguemert M., Marcos C., Perez-Ruzafa A., 2010. Molecular systematics of the genus *Holothuria* in the Mediterranean and Northeastern Atlantic and a molecular clock for the diversification of the Holothuriidae (Echinodermata: Holothuroidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57, 899–906.

Borrero-Perez G.H., Perez-Ruzafa A., Marcos C., Gonzalez-Wanguemert M., 2009. The taxonomic status of some Atlanto-Mediterranean species in the subgenus *Holothuria* (Echinodermata:Holothuroidea: Holothuriidae) based on molecular evidence. *Zool. J. Linn. Soc.*, 157:51–69.

Bouzaza Z., Mezali K., 2011. Etude systématique et phylogénétique de quelques invertébrés marins de la frange côtière algérienne. *2^{ème} journée scientifique de la faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie 25-26 Mai 2011.*

- Bouzaza Z., 2012.** Contribution à l'étude systématique et phylogéographique de quelques invertébrés benthiques de la zone intertidale de la côte algérienne.. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. universite Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Algérie*, 124 p.
- Bozec A., 2006.** La Circulation Thermohaline de la Mer Méditerranée sous des Climats Présent et Futur. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie -Paris VI-, Paris, France*, 213p.
- Brandt J. F., 1835.** Echinodermata ordo Holothuria. *In: Prodrumus descriptionis animalium AB H. Mertensio in orbis terrarum circumnavigatione observatorum. Petropoli, Fasc. I: 24-62.*
- Bryden H. L., Kinder T.L., 1991.** Steady two-layer exchange through the Strait of Gibraltar. *Deep Sea Research*, 38, Supplément 1, S445-S463.
- Caso M. E., 1968.** Contribution al studio de los holothuroideos de Mexico. Ecologia y morfologia de *Holothuria Glaberrima* Selenka. *An. Inst. Biol., Cienc. Mar. Limnol.*, Univ. Nal. Autom. Mexico, 39 (1): 21-30.
- Cavalli-Sforza L.L. et Edwards A.W.F., 1967.** Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19 : 233-257.
- Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F., 1967.** Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19 : 233-257.
- Cherbonnier G., 1955.** Les holothuries de la mer Rouge. Résultats scientifiques des campagnes de la « Calypso ». *Annls Inst. Océanogr. Monaco*, 30 (5) : 129-183.
- Cherbonnier G., 1956.** Les échinodermes de Tunisie. *Bull. Sta. Océanogr. Slambo.*, Tunisie, 53 : 1-23.
- Cherbonnier G., 1959.** Complément à la faune échinodermique des pyrénées-orientales (1). *Echinodermes.*, Univ. Paris. Lab. Arago, (eds), France, 2: 118-123.
- Clarke F. W., Kamm R. M., 1917.** New Analyses of Echinoderms. *United states Acad. SCI.* vol. 3, no. 6, pp. 401-404,
- Conand C., 1989.** Les Holothuries Aspidochirotés du lagon de Nouvelle Calédonie: biologie, écologie et exploitation. *Etudes et Thèses, O.R.S.T.O.M.*, Paris : 393 p.
- Conand C., 1990.** The fishery resources of Pacific island countries. Part 2. Holothurians. *FAO Fisheries Technical Paper*, no. 272.2. Roma, FAO. 108 p.
- Conand C., 2004.** Present status of world sea cucumber resources and utilisation: an international overview. p. 13–23 *In: Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F. and Mercier A. (eds.) Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper*, 463. 425 p.

Conand C., Byrne M., 1993. A review of recent developments in the world sea cucumber fisheries. *Marine Fisheries Review*, 55: 1-13.

Conand C., De Ridder C., 1990. Reproduction asexuée par scission chez *Holothuria atra* (Holothuroidea) dans des populations de platiers récifaux. In : *De Ridder, Dubois, Lahaye & Jangoux., (eds), Echinoderm. Research, Belkema, Rotterdam* : 71-75

Cutress B. M., 1996. Changes in dermal ossicles during somatic growth in Caribbean littoral sea cucumbers (Holothuroidea: Aspichirotida). *Bull. Mar. Sci.*, 58 (1): 44-116.

Daniel A.B.G., Ivy G.W., 2010. Potentiel aquacole de deux espèces tropicales d'holothuries *Holothuria scabra* et *H. lessoni* dans la région indo-pacifique, *Bulletin de la CPS La bêche-de-mer*, 30 : 29-30.

De Blainville H. M., 1834. Manuel d'actinologie et de zoophytologie. Paris, 688p.

Deichmann E., 1958. The holothurians collected by the Valero III & IV during the years 1932 to 1954. Part II. Aspidochirota. *Allan Hancock Pacif. Exped.* 11:249-349.

Delle Chiaje S., 1823. Memorie sulla storia e notomia degli animali senza vertebre regno di Napoli. *Fratelli Fernandes., Napoli*, 1: 1-184.

Eeckhaut I., Lavitra T, Rasoforinina R., Rabenevanana M.W., Gildas P. et Jangoux M., 2008. Madagascar Holothurie SA : la première entreprise commerciale axée sur l'aquaculture des holothuries à Madagascar. *Bulletin de la CPS La bêche-de-mer* 28:22–23.

Felsenstein J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17 : 368-376.

Felsenstein J., 2004a. Theoretical Evolutionary Genetics, synthèse des cours de Génétique Evolutive de Joseph Felsenstein à la Washington University (version 2004). Seattle. 383 pp.

Ferdouse F., 2004. World markets and trade flows of sea cucumber/beche-de-mer. pp. 101-118. In: Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J -F., Mercier A (eds). *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO, Rome, Fisheries Technical Paper No. 463: 425 p.*

Finkler A., 2010. Modèle d'évolution avec dépendance au contexte et Corrections de statistiques d'adéquation en présence de zéros aléatoires. *Mathematics. Université de Strasbourg, French.* <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00490844>

Fisher R.A., 1936. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics* 7: 179–188.

Fleury F., 2008. Cours de Génétique des Populations. Université Claude Bernard de Lyon 1. <http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr>.

Francoeur S., 2006. Analyse Canonique, Graphique Biplot et Application. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en mathématiques, Montréal, Université du Québec à Montréal. 135 p.

Francour P., 1984. Biomasse de l'herbier à *Posidonia oceanica*: données préliminaires pour les compartiments matte, échinodermes et poissons. DEA. Univ. Paris VI, France, 1-72.

Francour P., 1990. Dynamique de l'écosystème à *Posidonia oceanica* dans le parc national de Port-Cros des compartiments matte, litière, faune vagile, échinodermes et poissons. *Thèse. Doct.* Univ. Pierre et Marie Curie, Paris, 373p.

Friedman K., Purcell S.W., Bell J.D. Hair C., 2008. Sea cucumber fisheries: A manager's toolbox. Australian Government. *Australian Center for International Agricultural Research*, Canberra, Australia. 32 p.

Gilliland P. M., 1993. The skeletal morphology, systematics and evolutionary history of holothurians. *Spec. Pap. Paleoan.*, 47: 147.

Gmelin J. F., 1791. Caroli a Linné : Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. GE. Beer, Leipzig.

González-Wangüemert M., Cánovas F., Pérez-Ruzafa A., Marcos C., Alexandrino P., 2010. Connectivity patterns inferred from the genetic structure of white seabream (*Diplodus sargus* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 383, 23–31.

González-Wangüemert M., Froufe E., Pérez-Ruzafa A., Alexandrino P., 2011. Phylogeographical history of the white seabream *Diplodus sargus* (Sparidae): implications for insularity. *Marine Biology Research*, 7, 250–260.

Grube A. E., 1840. Actinien, Echinodermen und Wurmer des adriatischen und mittlemeers. J. H. Bon, Königsber, 92p.

Gustato G., Villari A., 1979b. “ About the question of the taxonomic status of *Holothuria stellati* Delle Chiaje”. In, *Proceeding of European Colloquium on Echinoderms*, Brussels. *Echinoderms: Present and past.* Balkema A. A., Rotterdam, 107-110.

Hall T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Hamad N., Millot C., Taupier-Letage I., 2005. A new hypothesis about the surface circulation in the eastern basin of the Mediterranean sea. *Progress in Oceanography*, 66, 287-298.

- Hamel J. F., Mercier A., 1996.** Early development, settlement, growth and spatial distribution of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata : Holothuroidea). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 253-271.
- Hampton J. S., 1958.** Chemical analysis of holothurian sclerites. *Nature*, London, Vol. 181: 1608-1609.
- Higgins D. G., Bleasby A. J., Fuchs R., 1992.** CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS*, 8 : 189-191
- Jaeger G. F., 1833.** De Holothuriis. Dissertatio Inauguralis. Turici, 40p.
- Janies D., 2001.** Phylogenetic relationship of extant echinoderm classes. *Can. J. Zool.*, 79: 1232-1250
- Jessica L., Maria B., Sven U., 2008.** Asexual reproduction by fission of a population of *Holothuria hilla* (Lesson 1830) at One Tree Island, Great Barrier Reef, Australia. *J. EXP. MAR. BIOL. ECOL*, vol. 365, no. 2, pp. 126-135
- Jukes T. H., Cantor C. R., 1969.** Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, pp. 21-132.
- Kerr A. M., Janies D. A., Cloude M., Samyn Y., Wheeler W. C., Kim, J., 2005.** Molecular Phylogeny of Coral-Reef Sea Cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) Based on 16S mt rDNA Sequence. *Mar. Biotech.*, 7: 53-60
- Kerr A. M., Kim J., 2001.** Phylogeny of Holothuroidea (Echinodermata) inferred from morphology. *Zool. J. Linn. Soc.*, 133: 63-81.
- Kerr A.M., 2000.** Holothuroidea. Sea cucumbers. Version 01 December 2000. <http://tolweb.org/Holothuroidea/19240/2000.12.01> in *The Tree of Life Web Project*, <http://tolweb.org/>.
- Kimura M., 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate bases substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16:111-120
- Kingman J. F. C., 2000.** The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*, 13 : 235-248.
- Klein B., Roether W., Manca B.B., Bregant D., Beitzel V., Kovacevic V., Luchetta A., 1999.** The large deep water transient in the Eastern Mediterranean. *Deep Sea Research I*, 46, 371-414.
- Klein J.T., 1734.** Naturalis dispositio echinodermatium. *Accesit Lucubratiuncula des aculeis echinorum marinorum, cun Spicilegio de belemnitis. Liutteris Schreiberianis*, Gedani, 78 p.

- Koehler R., Vaney C., 1906.** Mission des Pêcheries de la Côte occidentale d'Afrique. II. Echinodermes. *Actes de la Société Linnéenne de Bordeaux* 60, 58–66, pls 4–6.
- Koehler R., 1921.** Echinodermes. Faune de France, 1, 1–210.
- Koehler R., 1927** Les échinodermes des Mers d'Europe. 1. Doin, Paris, 362 pp.
- Kreitman M., McDonald J. H., 1991.** Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*, 351 : 652-654.
- Lacombe H., Tchernia P., 1972.** Caractères hydrologiques et circulation des eaux en Méditerranée. Mediterranean Sea, *In* D. Stanley, Hutchinson and Ross, 25-36.
- Lascaratos A., Roether W., Nittis K., Klein B., 1999.** Recent changes in deep water formation and spreading in the eastern Mediterranean Sea : a review. *Progress in Oceanography*, 44, 5-36.
- Lee J., Byrne M. et Uthicke S., 2008.** Asexual reproduction by fission of a population of *Holothuria hilla* (Lesson 1830) at One Tree Island, Great Barrier Reef, Australia. *J. EXP. MAR. BIOL. ECOL*, vol. 365, no. 2, pp. 126-135
- Lerman I. C., 1981.** *Classification et analyse ordinale des données*, Dunod.
- Linnaeus C., 1758.** Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decimal, reformata. Holmiae, 824p.
- Linnaeus C., 1767.** Systema naturae, Holmiae, 1: 1321-1336.
- Lodé T., 1998.** Cours de génétique des populations. *Ellipses Ed.*, Paris, 126 pp.
- Macé M., 2009.** Le Dauphin bleu et blanc (*Stenella caeruleoalba*) en Méditerranée : de la vicariance à l'épisode à Morbillivirus. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat. Université de Toulouse III-Paul Sabatier, France, 304 p.
- Malanotte-Rizzoli P., Robinson A.R., 1988.** physical oceanography of the Eastern Mediterranean Sea. POEM, EOS : The Oceanography Report, 69, 194-198.
- Massin C., 1994.** Ossicles variation in Antarctic dendrochirote holothurians (Echinodermata). *Bull. Inst. Roy. Sc. Nat. Belg.*, 64: 129-146
- Mayr E., 1942.** Systematics and the origin of species, *Columbia University Press*, New York, 334p.
- Mezali K., 1998.** Contributions à la systématique, la biologie et la dynamique des populations de cinq espèces d'holoturies aspidochirotes (*Holothuria tubulosa*, *H. poli*, *H. forskali* et *H. sanctori*) de l'herbier à *Posidonie oceanica* (L) Delile de la presqu'île de Sidi Fredj. Thèse magistère. Ecole National des Sciences de la Mer et de l'Aménagement de Littoral, Algérie, 246 pp.

Mezali K., 2004b. Micro-répartition des holothuries aspidochirotés au sein de l'herbier de Posidonies de la presqu'île de Sidi-Fredj – Algérie. *Rapports P. V. Commission International pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*. Monaco, Vol. 37, p534.

Mezali K., 2007. Etude de la pollution de la côte de Mostaganem et étude systématique et écologique de la patelle *Patella ferruginea* (Gmelin, 1791) dans la zone de Stidia, Algérie. *7^{ème} Congrès Maghrébin des Sciences de Mer & 1^{er} Congrès Franco - Maghrébin de Zoologie et d'Ichtyologie sous le thème : Environnement aquatique et ses ressources, Connaissances, gestion et valorisation - El Djadida (Maroc) du 4 au 7 novembre 2007*. p. 130

Mezali K., 2008. Phylogénie, systématique, dynamique des populations et nutrition de quelques espèces d'Holothurie aspidochirotés (Holothuroidea: Échinodermata) inféodées aux herbiers de Posidonies de la région Algérienne. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Algérie*, 208 p.

Mezali K., Caulier G., Gerbaux P., Demeyer M., Corentin D.C., Eeckhaut et Flammang P., 2015 Chemical characterization of the saponins contained in the integument and the Cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Delle Chiaje, 1823). *Marine drugs* (in press).

Micael J., Alves M.J., Costa A.C., Jones M.B., 2009. Exploitation and conservation of echinoderms. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 47: 191-208.

Millot C., 1999. Circulation in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, 20, 423-442.

Millot C., Taupier-Letage I., 2005. Circulation in the Mediterranean Sea. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. K: 29-66. DOI: 10.1007/b107143

Muths D., 2006. Structures génétique et démographique des populations de deux espèces d'ophiures aux caractéristiques biologiques contrastées, *Acrocnida brachiata* et *Ophiothrix fragilis*, en Atlantique Nord-Est. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat de l'Université de ParisVI*, 256 pp.

Myers P. G., Haines K., 2002. Stability of the Mediterranean's thermohaline circulation under modified surface evaporative fluxes. *Journal of Geophysical Research*, 107, 3021, doi :10.1029/2000JC000550.

Nei M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics, *Columbia University Press*, New York, 512 pp

Nielsen J. N., 1912. Hydrography of the Mediterranean and adjacent waters. *Report of the Danish Oceanographic Expedition 1908-1910 to the Mediterranean and adjacent waters*, 1, 77-192.

O'Loughlin P.M., Paulay G., VandenSpiegel D., Samyn Y., 2007. New Holothuria species from Australia (Echinodermata: Holothuroidea: Holothuriidae), with comments on the origin of deep and cool holothuriids. *Memoirs of Museum Victoria* 64, 35–52.

Ocana A., Pérez-Ruzafa A., 2004. Los equinodermos de las costas andaluzas. *Acta Granatense* 3, 83–136.

Pagel M., 2002. Phylogenetic inference Methods. In: Pagel M., Frank S.A., Godfray C., Hall, B.K., Hawkes K., Hillis D.M., Kodric-Brown A., Lenski R.E. & Pomiankowski A. Eds., *Encyclopedia of Evolution*, Oxford University Press, vol. 2.: 895-904.

Patterson J., Chamberlain B., Thayer D., 2006. Finch TV Version 1.4.0. *Geospiza Inc.* Disponible sur : <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>

Pawson D. L., 1966. Phylogeny and evolution of holothuroids. In, Moor R. C., (ed.), *Treatise on invertebrate Paleontology.*, Vol. 2. *The Geological Society of America*, The University of Kansas Press, Lawrence, K. A., 614-646.

Pawson D. L., Fell H. B., 1965. A revised classification of the dendrochirote holothurians. *Breviora*. 214: 1-7.

Pawson D.L., Pawson D. J. et King R. A., 2010. A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA : 1. Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Zootaxa*, 2449: 1-48.

Pérez-Portela R., Villamor A., Almada V., 2010. Phylogeography of the sea star *Marthasterias glacialis* (Asteroidea, Echinodermata): deep genetic divergence between mitochondrial lineages in the north-western Mediterranean. *Marine Biology*, 157, 2015–2028

Pinardi N., Masetti E., 2000. Variability of the large scale general circulation of the Mediterranean Sea from observations and modelling: a review. *Palaeogeography, Palaeoclimatologie, Palaeocology*, 158, 153-173.

Plouviez S., 2009. Phylogéographie comparée des espèces hydrothermales de la dorsale du Pacifique oriental. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat. Université de Pierre et Marie Curie, France, 357 p.

Polzin T., Daneshmand S. V., 2011. NetWork 4.6, Copyright (2004–2011), *Fluxus technology Ltd.*, disponible sur : www.fluxus-technology.com

Posada D., 2008. jModeltest 0.1.1, Phylogenetic Model Averaging,. *Mol. Biol. Evol.* 25 : 1253-1256.

Rao C. R., 1951. An asymptotic expansion of the distribution of Wilks' Λ criterion. *Bulletin of the International Statistical Institute*, 33 , Part 2, 177-180.

- Rao C. R., 1965.** linear statistical interference and its applications, *J. Wiley, New York* 1965.
- Raup D. M., 1966.** The endoskeleton. *In*, Boolootian (ed.). *Physiology of Echinodermata*. Inter-sciences, New York, 379-395.
- Reich M., 1999.** Ordovizische und silurische Holothurien (Echinodermata). *Greifswalder Geowissenschaftliche Beitrage*, 6; 479-488.
- Reich M., 2001.** Ordovician holothurians from the Baltic sea. *In*, Barker M., (ed.), *10th international Echinoderm Conference, Echinoderm 2000*, Swets & Zeilinger, Lisse, 93-96
- Robinson A.R., Golnaraghi M., 1994.** The physical and dynamical oceanography of the Mediterranean sea. Ocean processes in climate dynamics : Global and Mediterranean Examples, *Kluwer Academic Edition*, 255-306.
- Rowe F. W. E., 1969.** A review of the family Holothuroidea (Holothurioidea: Aspidochirotida). *Bull. Mus. Nat. Hist., Zool.*, 18 (4): 119-170.
- Rozas J., Librado P., Sánchez-DelBarrio J. C., Messeguer X., Rozas R., 2010.** DNA SP (DNA Sequence Polymorphism v5.10.01). *Departement de Genetica, Universitat de Barcelona*. Spain.
- Rupolo V., Marullo S., Iudicone D., 2003.** Eastern Mediterranean Transient studied with Lagrangian diagnostics applied to a Mediterranean OGCM forced by satellite SST and ECMWF wind stress for the years 1988-1993. *Journal of Geophysical research*, 108, 8121, doi :10.1029/2002JC001403.
- Sa Pinto A., Branco M., Sayanda D., Alexandrino P., 2008.** Patterns of colonization, evolution and gene flow in species of the genus *Patella* in the Macaronesian Islands. *Molecular Ecology*, 17: 519-532
- Samuel S., Haines K., Josey S., Myers P.G.G., 1999.** Response of the Mediterranean Sea thermohaline circulation to observed changes in the winter wind stress field in the period 1980-1993. *Journal of Geophysical research*, 104,7771-7784.
- Samyn Y., Appeltans W., Kerr A. M., 2005.** Phylogeny of Labidodemas and the Holothuriidae (Holothuroidea: Aspidochirotida) as inferred from morphology. *Zool. J. Linn. Soc.*, 144: 103-120
- Samyn Y., Vandenspiegel D., Massin C., 2006.** Taxonomie des holothuries des Comores. *ABC Taxa*, (1): 1-130.
- Selenka E., 1867.** Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien. *Zeitschrift Wissenschaftliche Zoologie*, 17: 291-374.

Semper C., 1867. Reisen im archipel der Philippinen Zweiter Theil. Wissenschaftliche Resultate. Erster Band, Holothurien Heft IV & V. Wilhem Engelmann, Leipzig, 288p.

Semroud R., 1993. Contribution à la connaissance de l'écosystème à *Posidonia Océanica* (L.) Delile dans la région d'Alger : étude de quelques compartiments. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Algérie*, 219 p.

Smith A. B., 1984. Classification of Echinoderms. *Paleontology*, 27: 431-459.

Stratford K., Williams R.G., 1997. A tracer study of the formation, dispersal, and renewal of Levantine Intermediate Water. *Journal of Geophysical Research*, 102, 12,539-12,549

Stricker S.A., 1986. The fine structure and development of calcified skeletal elements in the body wall of holothurian echinoderms. *Journal of Morphology* 188:273-288.

Tajima F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105 : 437-460.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Software version 5.03, *Bioinformatics*. <http://www.megasoftware.net/>.

Tchernia P., 1978. Océanographie Régionale : Description physique des océans et des mers. *Ed. ENSTA*, Paris, 257 pp.

Thandar A. S., 1988. A new subgenus of Holothuria with a description of a new species from the south-east Atlantic Ocean. *J. Zool.*, London, 215: 47-54.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Oxford University Press, Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680.

Tiago C. G., Brites A. D., Kawauchi G. Y., 2005. A simple enzymatic method for examining calcite ossicles of Echinodermata. *J. Microsc.*, 218: 240-46.

Toral-Granda V., 2006. Situation biologique et commerciale des concombres de mer des familles Holothroidae et Stichopodidae. *CITES Workshop on the conservation of sea cucumbers*, Lima (Perou). (Doc 16). 32p.

Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M., 2009. Etat des stocks et commerce mondial des holothuries. *Bulletin de la CPS La bêche-de-mer*, 28 : 4-6

Tortonese E., 1965. Fauna d'Italia. Echinodermata. *Calderini publ.*, Bologna, Ital., 422p.

- Toulemont A., 1982.** Sous la mer. Faune et flore. *Guide point vert*, 7-123.
- Uthicke S., Benzie J., 2001.** Restricted gene flow between *Holothuria scabra*(Echinodermata: Holothuroidea) populations along the north-east coast of Australia and the Solomon Islands. *Marine Ecology Progress Series*, 216, 109–117.
- Vargas-Yanez M., Plaza F., Garcia-Lafuente J., Sarhan T., Vargas J.M., Velez-Belchi P., 2000.** About the seasonal variability of the Alboran Sea Circulation. *Journal of Marine Systems*, 35, 229-248.
- Ward J.H.Jr.** 1963 Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function, *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236–244.
- Zavodnik D., 2003.** Marine fauna of Miljet National park (Adriatic Sea, Croatia). 2. Echinodermata. *Acta Adriatica*, 44:105–160.

Sites Web

- [*] [http:// lib. stat. cmu. edu/ DASL/ Stories/ FleaBeetles. html](http://lib.stat.cmu.edu/DASL/Stories/FleaBeetles.html) (15/12/2013)
- [*] [http:// lib. stat. cmu. edu/ DASL/](http://lib.stat.cmu.edu/DASL/) (17/12/2013)
- [*] [http:// lib. stat. cmu. edu/ DASL/ Datafiles/ Fisher's Irises. html](http://lib.stat.cmu.edu/DASL/Datafiles/Fisher'sIrises.html) (5/1/2014)
- [*] [http:// www. volle. com/ ouvrages/ andon. htm](http://www.volle.com/ouvrages/andon.htm) (18/3/2014)
- [*] [http:// www. r-project. org/](http://www.r-project.org/)(1/4/2014)
- [*] [http:// www. statgraphics. fr](http://www.statgraphics.fr) (1/4/2014)
- [*] [http:// www. adscience. fr/ logiciels/ statel](http://www.adscience.fr/logiciels/statel) (2/4/2014)
- [*] [http:// eric. univ-lyon2. fr/ ~ricco/ tanagra/ fr/ tanagra. html](http://eric.univ-lyon2.fr/~ricco/tanagra/fr/tanagra.html) (5/4/2014)
- [*] [http:// www. xlstat. com](http://www.xlstat.com) (12/4/2014)

Annexes

Banyuls-sur-Mer

Banyuls est située dans les Pyrénées-Orientales sur la côte Vermeille au sud de Perpignan aux coordonnées 42° 28' 59" Nord et 3° 07' 41" Est. Elle groupe autour de sa baie la vieille ville, le port, une plage (galets et sable). La commune est limitrophe à l'Espagne. Cette station a été considérée pour l'étude phylogéographique uniquement.

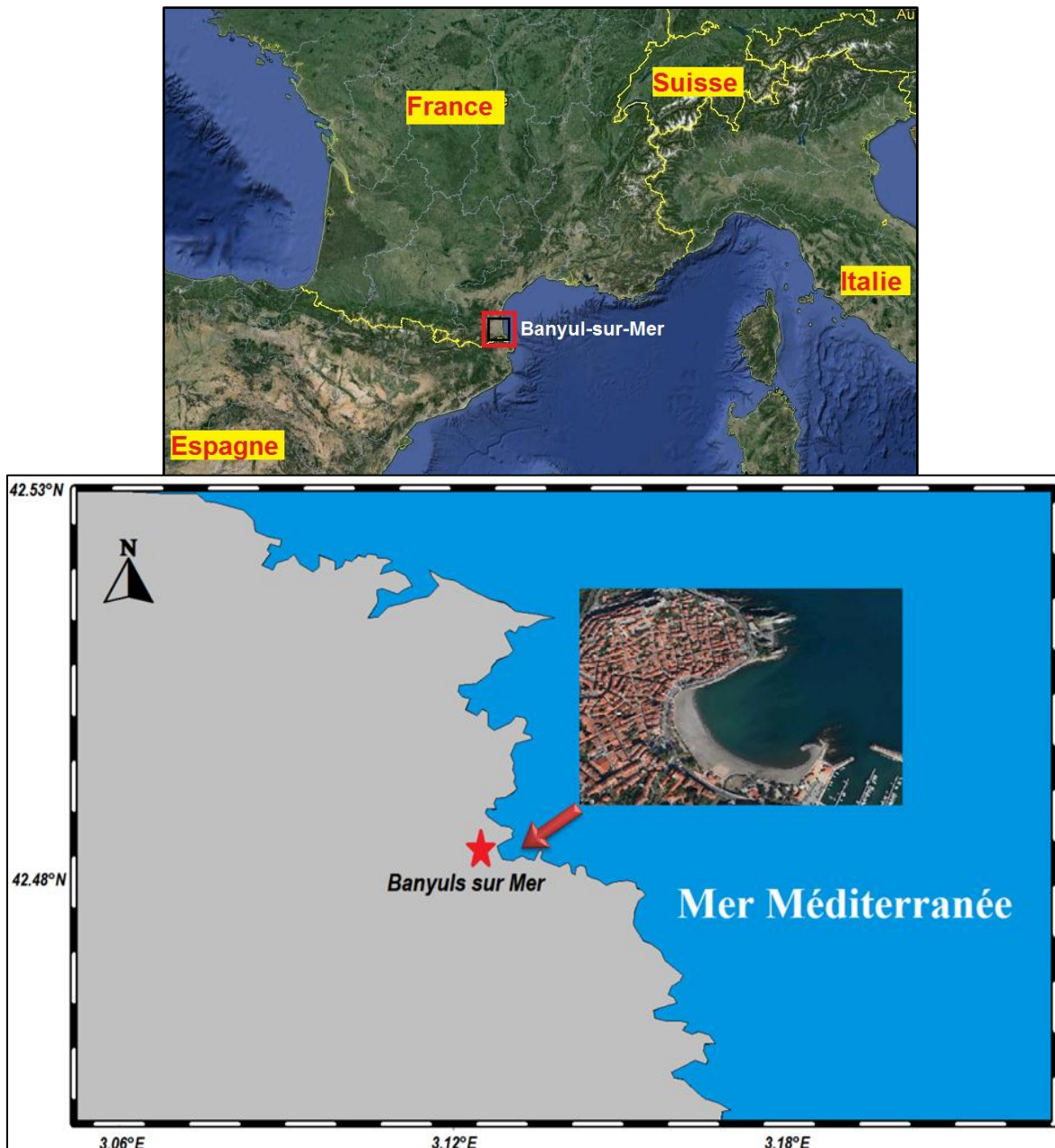


Figure I : Localisation de la station de Banyuls-sur-Mer (Google earth modifié par Mansouri).

Annexe 01

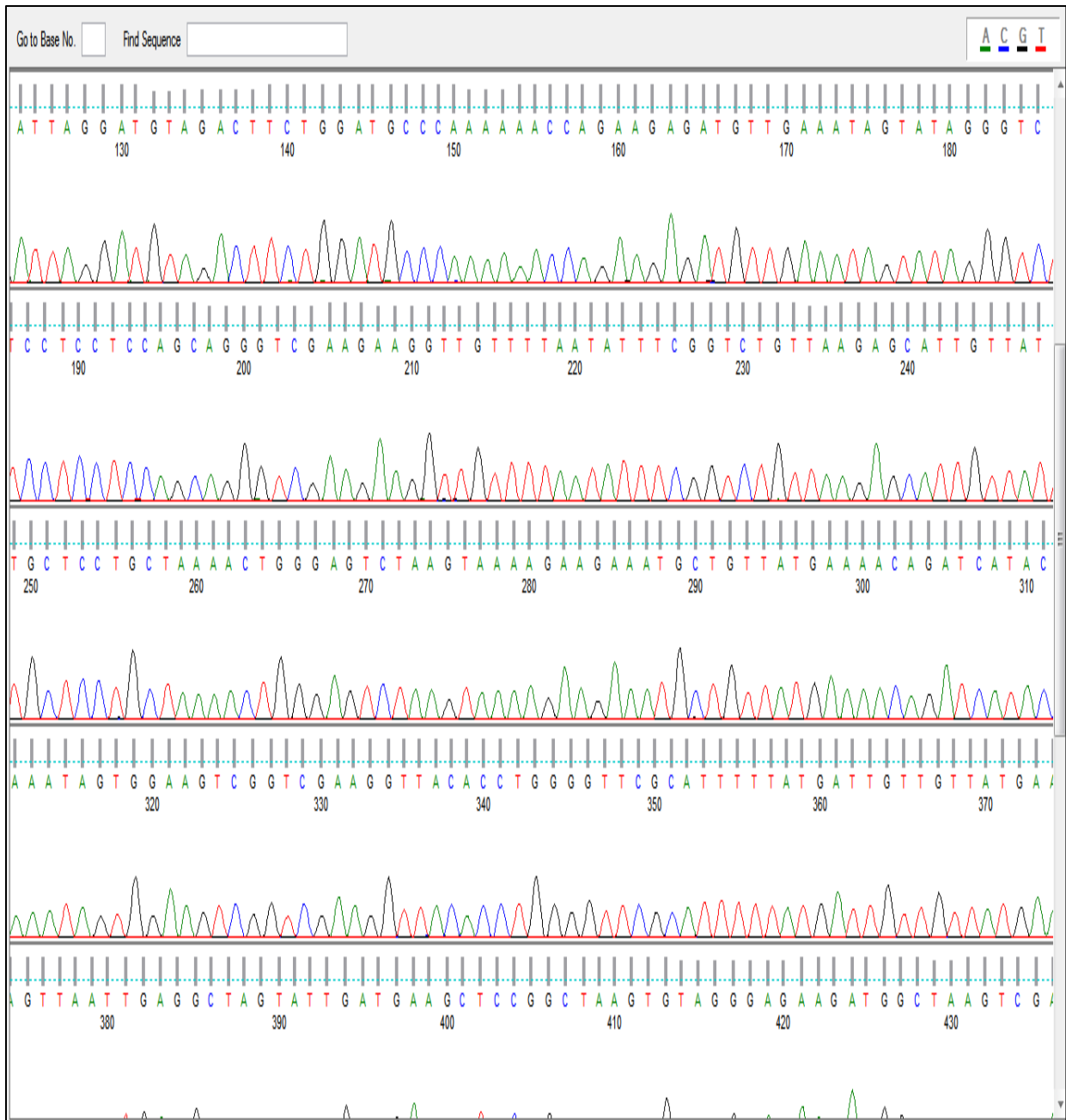


Figure II : Exemple de chromatogramme d'une séquence de l'ARNr 16S de l'espèce *Holothuria poli* B prise du présent travail établi par le programme Finch TV 1.4.

Explication de la méthode du maximum de vraisemblance « ML »

La fonction de vraisemblance, notée $L(x_1, \dots, x_n | \theta_1, \dots, \theta_k)$ est une fonction de probabilités conditionnelles qui décrit les paramètres θ_j d'une loi statistique en fonction des valeurs x_i supposées connues. Elle s'exprime à partir de la fonction de densité $f(x|\theta)$ par :

$$f(x; \theta) = \begin{cases} f_{\theta}(x) & \text{si X est une v.a. continue} \\ P_{\theta}(X = x) & \text{si X est une v.a. discrete} \end{cases}$$

Sachant que $f_{\theta}(x)$ représente la densité de X (où θ apparaît) et $P_{\theta}(X = x)$ représente une probabilité discrète (où θ apparaît).

On appelle vraisemblance de θ au vu des observations $(x_1, \dots, x_i, \dots, x_n)$ d'un n-échantillon indépendamment et identiquement distribué selon la loi \mathcal{D}_{θ} , le nombre :

$$L(x_1, \dots, x_i, \dots, x_n; \theta) = f(x_1; \theta) \times f(x_2; \theta) \times \dots \times f(x_n; \theta) = \prod_{i=1}^n f(x_i; \theta)$$

On cherche à trouver le maximum de cette vraisemblance pour que les probabilités des réalisations observées soient aussi maxima. Ceci est un problème d'optimisation. On utilise généralement le fait que si L est dérivable (ce qui n'est pas toujours le cas) et si L admet un maximum global en une valeur $\theta = \hat{\theta}$, alors la dérivée première s'annule en $\theta = \hat{\theta}$ et que la dérivée seconde est négative. Réciproquement, si la dérivée première s'annule en $\theta = \hat{\theta}$ et que la dérivée seconde est négative en $\theta = \hat{\theta}$, alors $\theta = \hat{\theta}$ est un maximum local (et non global) de $L(x_1, \dots, x_i, \dots, x_n; \theta)$. Il est alors nécessaire de vérifier qu'il s'agit bien d'un maximum global.

La vraisemblance étant positive et le logarithme népérien une fonction croissante, il est équivalent et souvent plus simple de maximiser le logarithme népérien de la vraisemblance (le produit se transforme en somme, ce qui est plus simple à dériver). On peut facilement construire la statistique $Y_n = \Theta$ qui est l'estimateur voulu.

Ainsi en pratique:

- La condition nécessaire :

$$\frac{\partial L(x_1, \dots, x_i, \dots, x_n; \theta)}{\partial \theta} = 0$$

Ou :

$$\frac{\partial \ln L(x_1, \dots, x_i, \dots, x_n; \theta)}{\partial \theta} = 0$$

$\theta = \hat{\theta}$ est un maximum local si la condition suffisante est remplie au point critique $\theta = \hat{\theta}$:

$$\frac{\partial^2 L(x_1, \dots, x_i, \dots, x_n; \theta)}{\partial \theta^2} \leq 0$$

Ou :

$$\frac{\partial^2 \ln L(x_1, \dots, x_i, \dots, x_n; \theta)}{\partial \theta^2} \leq 0$$

Pour simplifier, dans les cas de lois continues, où parfois la densité de probabilité est nulle sur un certain intervalle, on peut omettre d'écrire la vraisemblance pour cet intervalle uniquement.

Généralisation

Pour une variable aléatoire réelle X de loi quelconque définie par une fonction de répartition $F(x)$, on peut considérer des petits voisinages V autour de (x_1, \dots, x_n) dans \mathbb{R}^n , par exemple une boule de rayon ε . On obtient ainsi une fonction de vraisemblance:

$$L(\theta; V) = P[(X_{1,\theta}, \dots, X_{n,\theta}) \in V]; \text{ Dont on cherche un maximum } \theta = \hat{\theta}(V).$$

On fait ensuite tendre la taille de V vers 0 dans $\hat{\theta}(V)$ pour obtenir l'estimateur $\hat{\theta}$ de maximum de vraisemblance. On retombe sur les fonctions de vraisemblance précédentes quand X est à loi discrète ou continue.

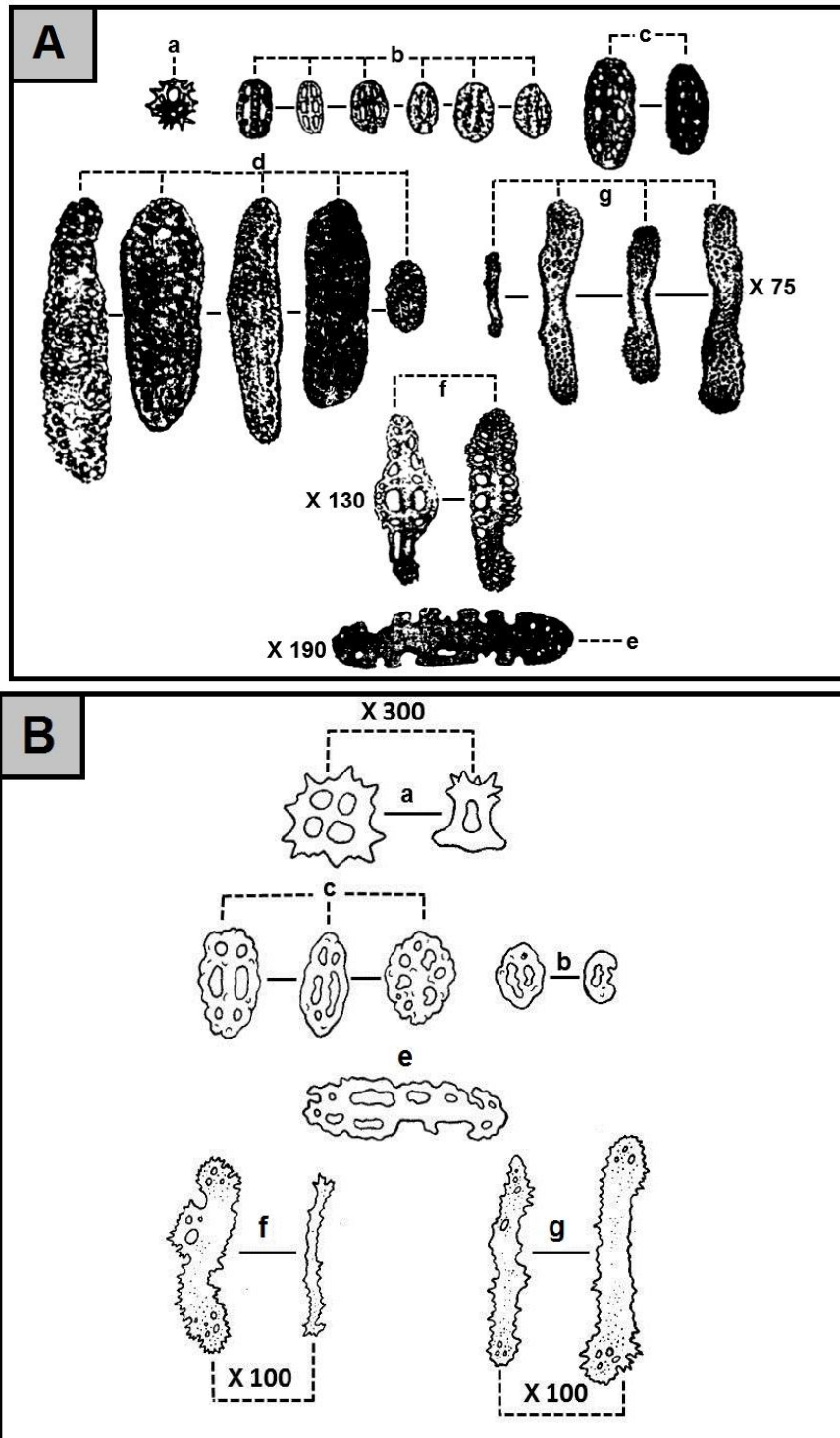


Figure III : Sclérites de *H. (H) tubulosa*. Description d'après (A) : Koehler, 1921 ; (B) : Tortonese, 1965. a: corpuscules turriformes ; b: petites boucles ; c: boucles plus grandes ; d: boucles très ; e: plaques à contours irréguliers des papilles dorsales ; f: bâtonnets élargies des papilles dorsale ; g: bâtonnets des tentacules ; i: plaque élargie.

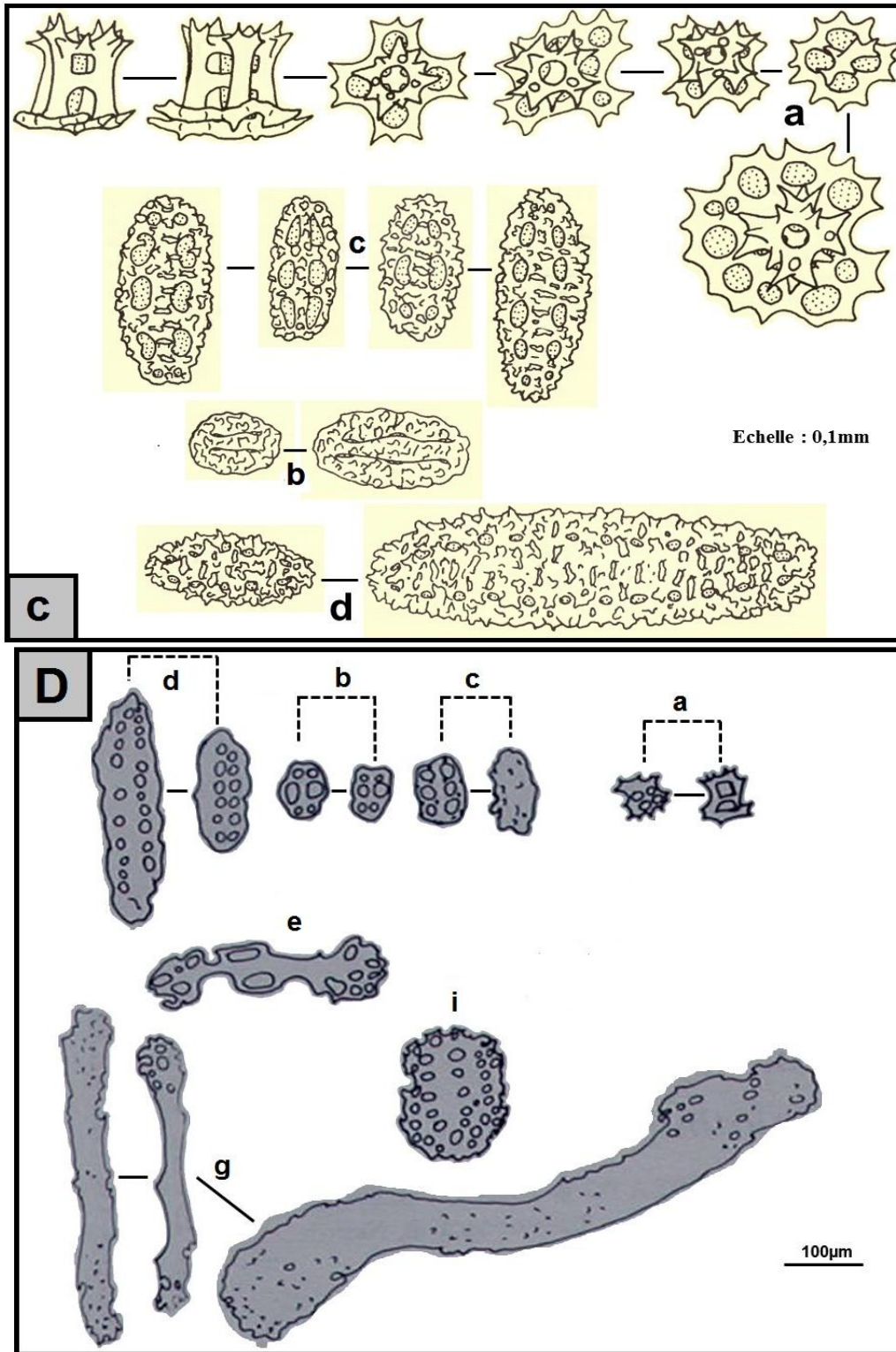


Figure IV : Sclérites de *H. (H) tubulosa*. Description d'après (C) : Rowe, 1969 ; (B) : Gustato et Villari, 1979b. a : corpuscules turriformes ; b : petites boucles ; c : boucles plus grandes ; d : boucles très ; e : plaques à contours irréguliers des papilles dorsales ; f : bâtonnets élargies des papilles dorsale ; g : bâtonnets des tentacules ; i : plaque élargie.

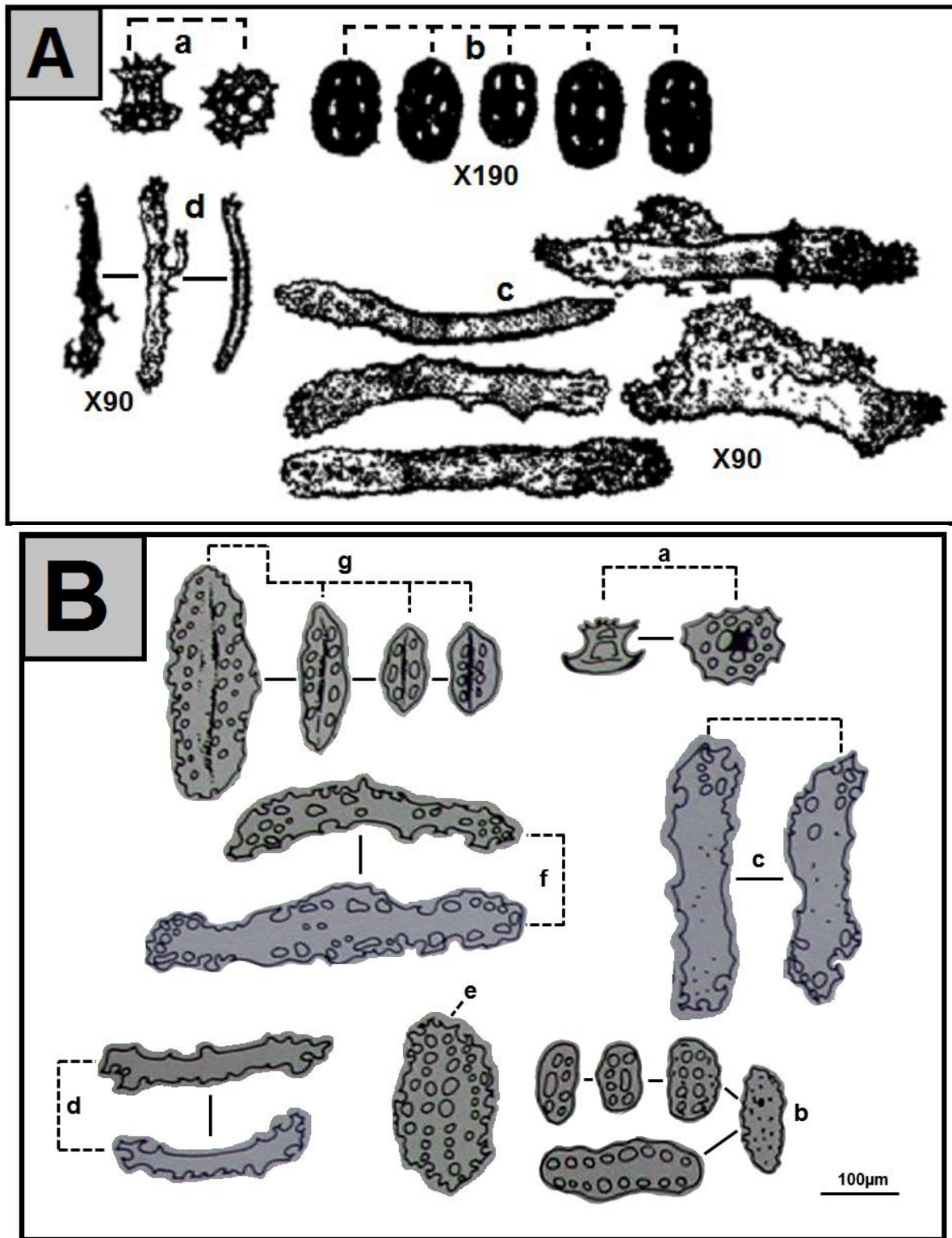


Figure V : sclérites de *Holothuria (Holothuria) stellati*. Description d'après : (A) : Koehler, 1921 ; (B) : Gustato et Villari, 1979b. a : corpuscules turriformes ; b boucles ; c : bâtonnets épais des tentacules ; d : bâtonnets arqués ; e : plaque large ; f : plaques perforées ; g : boucles présentant des stries longitudinales.

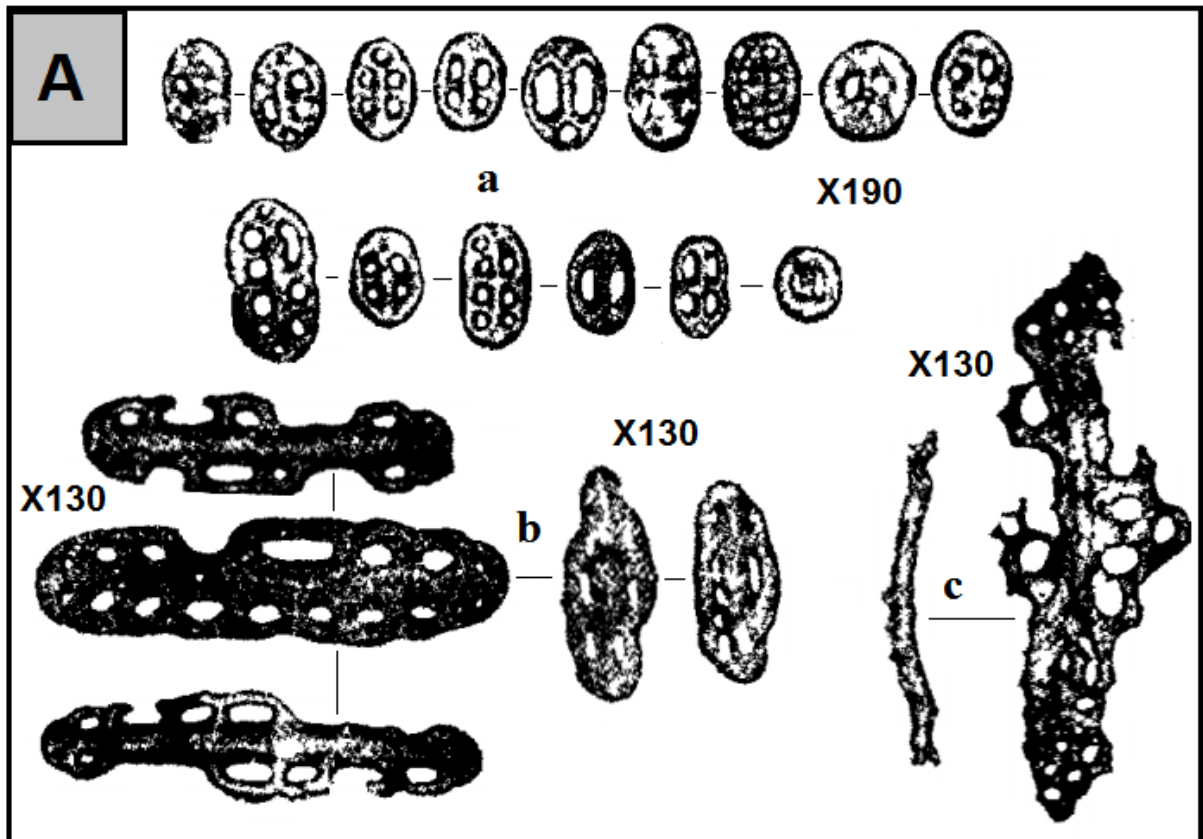


Figure VI : sclérites de *Holothuria (Roweothuria) poli*. Description d'après : Koehler, 1921. a : boucles; b : plaque allongées; c : bâtonnets.

Annexe 07

Tableau II : Variables actuellement absentes du modèle discriminant.

Variables	Λ_{Wilk}	$\Lambda_{\text{partiel de Wilk}}$	F inclusion	niveau p	Tolérance	1-Tolérance (R^2)
IBfd	0.000003	0.702029	0.565923	0.666068	0.195668	0.804332
STfd	0.000003	0.64075	0.747562	0.57772	0.291059	0.708941
PBfd	0.000004	0.830428	0.272264	0.843191	0.073707	0.926293
FCfd	0.000003	0.801743	0.32971	0.805562	0.499583	0.500417
FAfd	0.000003	0.750248	0.443856	0.734724	0.370375	0.629625
Mfd	0.000002	0.571462	0.999863	0.478996	0.493309	0.506691
LBfv	0.000003	0.765113	0.409329	0.755513	0.609457	0.390544
IBfv	0.000003	0.706688	0.553401	0.672759	0.487128	0.512872
NtBfv	0.000002	0.50432	1.310493	0.387021	0.12172	0.87828
STfv	0.000004	0.929002	0.101898	0.954721	0.388543	0.611457
SBfv	0.000004	0.833751	0.265866	0.847439	0.688541	0.31146
PBfv	0.000003	0.802113	0.328943	0.806057	0.650673	0.349327
FCfv	0.000002	0.546573	1.106109	0.444353	0.250494	0.749506
DdTfd	0.000004	0.812588	0.307516	0.819976	0.197065	0.802935
Kfd	0.000003	0.76846	0.401738	0.760161	0.576239	0.423761
IFTfd	0.000002	0.449794	1.630985	0.316525	0.283986	0.716014
DdTfv	0.000003	0.698743	0.574856	0.661342	0.279119	0.720881
Kfv	0.000003	0.676708	0.63699	0.629591	0.2399	0.7601

Sites Polymorphes analysés par le programme DNASP 5.10

Nombre de séquences: 31 ; **Nombre de séquences utilisées:** 31

Régions Sélectionnées: 1-411 ; **Nombre de sites:** 411

Nombre total des sites [sans compter les sites avec les vides (gaps) /données manquantes]:
404

Sites avec les alignement des vides (gaps) ou données manquantes: 7

Sites invariables (monomorphiques): 351

Sites variables (polymorphiques): 53 ; **Nombre total de mutations:** 58

Sites variables singletons: 11

Sites parsimonique informatifs: 42

Sites variables singletons: (deux variants): 11

Site positions: 18 88 92 126 137 217 276 316 365 381 411

Sites parsimoniques informatifs (deux variants): 37

Site positions: 59 65 77 84 85 87 106 111 120 144 146 147 178 179 183 190 191 194 195
196 197 198 208 214 221 239 261 263 275 277 278 293 295 296 298 324 358

Sites variables singletons (trois variants): 0

Sites parsimoniques informatifs (trois variants): 5

Positions des sites: 112 193 215 250 294

Sites variables (Quatre variants):0

Polymorphisme d'ADN analysé par le programme DNA_{SP} 5.10

Nombre de séquences: 31 ; **Nombre de séquences utilisées:** 31

Région sélectionnées: 1-411

Nombre de sites: 411

Nombre total de sites [sans compter les sites avec les vides (gaps) /données manquantes]:
404

Nombre de sites polymorphique (ségrégation), **S:** 58

Nombre Total de mutations, Etat: 58

Nombre d'Haplotypes, h: 18

Diversité haplotipique (gène), Hd: 0,927

Variance de la diversité haplotipique: 0,00089

Déviatiion standard de la diversité haplotipique: 0,030

Diversité Nucléotidique, π : 0,04982

Diversité Nucléotidique (Jukes / Cantor), π (JC): 0,05240

Θ (par site) à partir d' η : 0,03594

Θ (par site) à partir de S, Θ -W: 0,03284

Variance de Θ (sans recombinaison): 0,0001174

Déviatiion standard de Θ (sans recombinaison): 0,01084

Variance de Θ (recombinaison libre): 0,0000203

Déviatiion standard de Θ (recombinaison libre): 0,00451

Θ (par site) à partir de π : 0,05336

Θ (per site) à partir de S: 0,03556

Θ (per site) à partir d' η : 0,03747

Nombre des différences nucléotidiques, k: 20,472

Variance stochastique de k (sans recombinaison), **Vst(k):** 78,153

Variance of k par échantillonnage (sans recombinaison), **Vs(k):** 5,441

Variance total de k (sans recombinaison), **V(k):** 83,594

Annexe 09

Variance stochastique de k (recombinaison libre), $V_{st}(k)$: 6,709

Variance de k par échantillonnage (recombinaison libre), $V_s(k)$: 0,447

Variance total de k (recombinaison libre), $V(k)$: 7,15

Θ (par séquence) à partir S , $\Theta-W$: 13,267

Variance de Θ (sans recombinaison): 19,164

Variance de Θ (recombinaison libre): 3,321

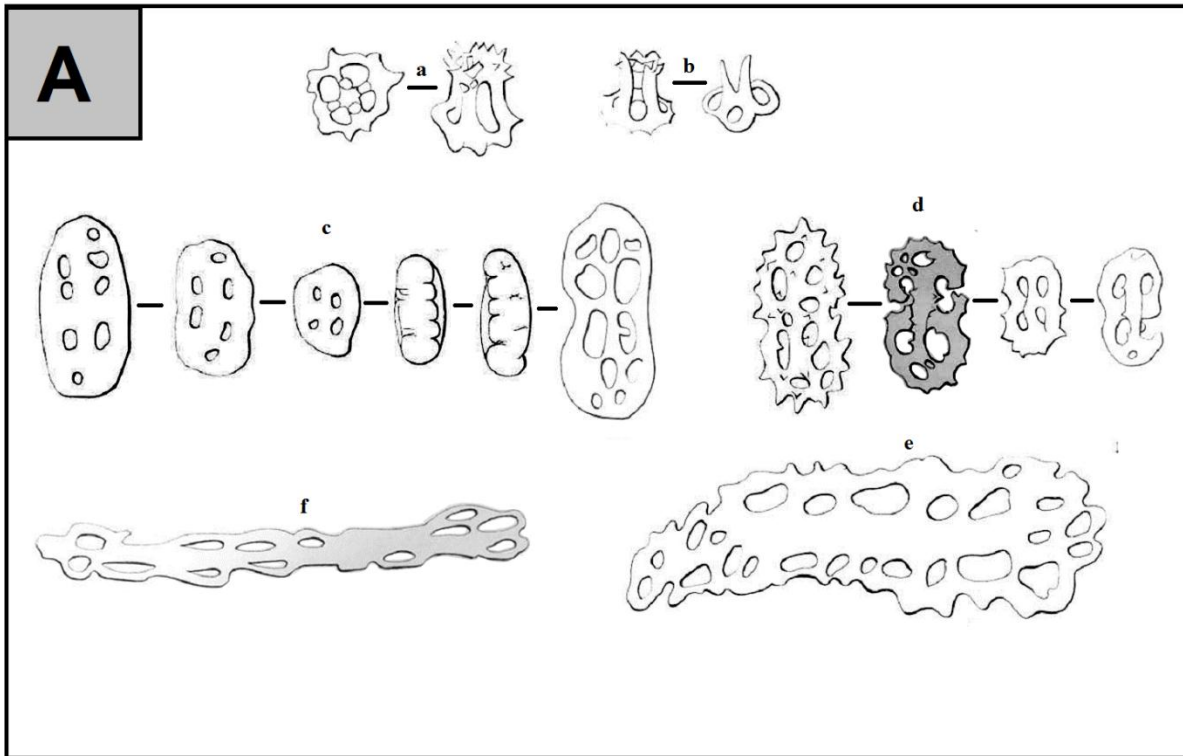


Figure VII : sclérites de *Holothuria (Roweothuria) arguinensis*. Description d'après : Koehler et Vaney, 1906. a-b corpuscules turriformes; c : boucles de la face ventrale ; d : boucles de la face dorsale; f : plaque perforée à contour irrégulier ; e : plaque large.

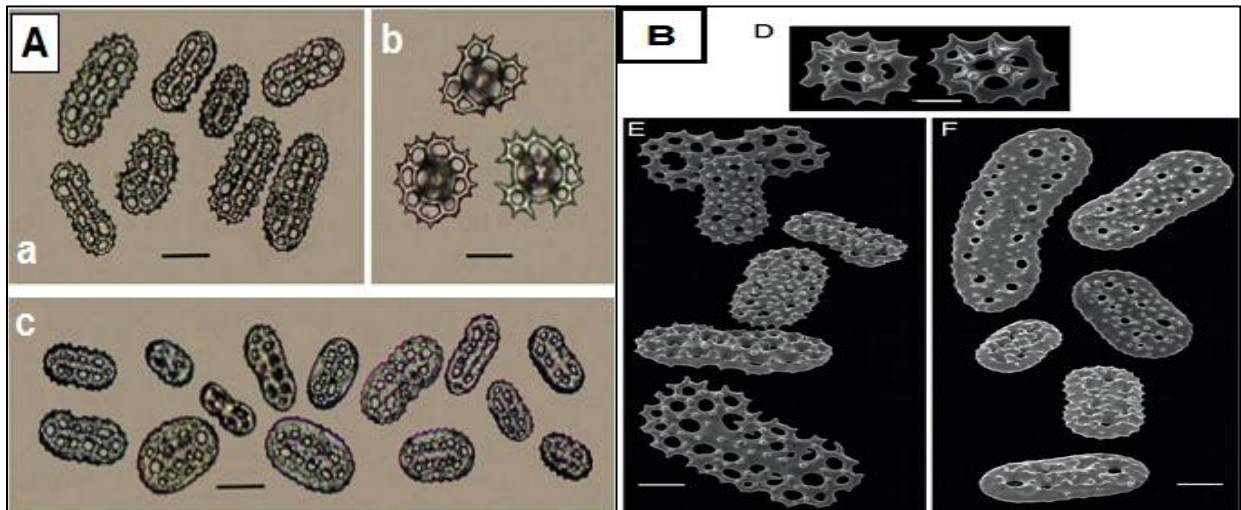


Figure VIII : sclérites de *Holothuria (Roweothuria) arguinensis*. D'après : Gonzalez-Wanguemert *et al.*, (2012). A-a : boucles de la boucles de la face dorsale ; A-b : tourelles de la face dorsale; A-c : boucle de la face ventrale. B-D : tourelles de la face dorsale ; B-E : boucles de la face dorsale ; B-F : boucles de la face ventrale. Échelle : 20µm. (A) : sclérites d'une espèce de l'Espagne. (B) : sclérites d'une espèce des Îles Canaries.

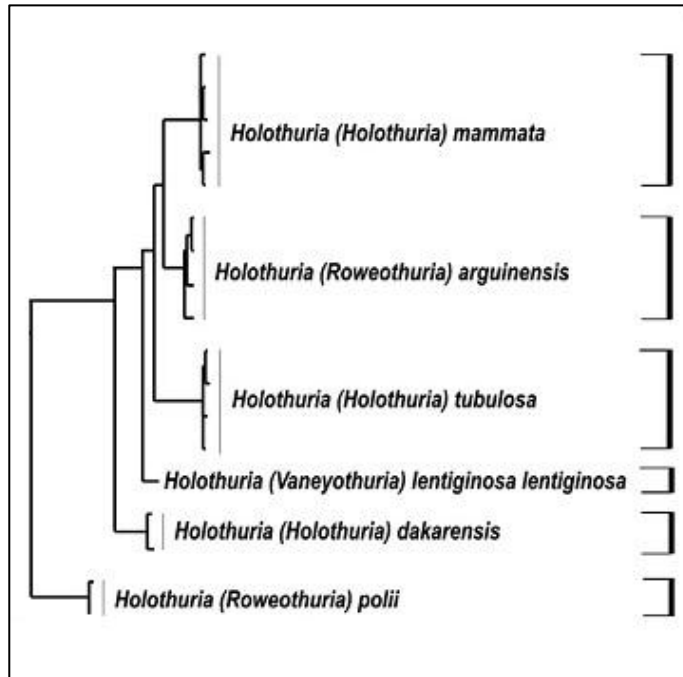


Figure IX : Arbre phylogénétique de quelques espèces d'holothuries (Borrero-Pérez *et al.*, 2010)
