



HAL
open science

Diversité génétique du bénitier (*Tridacna maxima*) en Polynésie française et réponse au stress thermique : une approche intégrée de génomique fonctionnelle

Vaimiti Dubousquet

► To cite this version:

Vaimiti Dubousquet. Diversité génétique du bénitier (*Tridacna maxima*) en Polynésie française et réponse au stress thermique : une approche intégrée de génomique fonctionnelle. Sciences agricoles. Université de la Polynésie Française, 2014. Français. NNT : 2014POLF0008 . tel-01482877

HAL Id: tel-01482877

<https://theses.hal.science/tel-01482877v1>

Submitted on 3 Mar 2017

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

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

THÈSE

Présentée par

Vaimiti DUBOUSQUET

Pour l'obtention du grade de :

Docteur en Sciences de l'Université de la Polynésie française

Spécialité : Biologie moléculaire

ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE (ED 469)

**Diversité génétique du bénitier (*Tridacna maxima*) en
Polynésie française et réponse au stress thermique : une
approche intégrée de génomique fonctionnelle**

Soutenue publiquement le 8 Décembre 2014,
devant le jury composé de :

Pr. Giacomo BERNARDI , Professeur des Universités University of California	Président
Pr. William AALBERSBERG , Professeur des Universités Directeur de l'IAS, University of South Pacific	Rapporteur
Dr. François BONHOMME , Directeur de Recherche CNRS Directeur de l'Equipe Génomique Intégrative, Université de Montpellier	Rapporteur
Dr. Gaël LECCELLIER , Maître de Conférences HDR Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines	Examineur
Dr. Jean-Yves MEYER , Chargé de Recherche Délégué à la Recherche de la Polynésie française	Examineur
Dr. Véronique BERTEAUX-LECELLIER , Chargée de Recherche CNRS (HDR) Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement	Co-Directrice de thèse
Pr. Phila RAHARIVELOMANANA , Professeur des Universités Université de la Polynésie française	Co-Directrice de thèse



Remerciements...

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de participer ainsi aujourd'hui à l'aboutissement de cette belle aventure. Merci donc au Dr François Bonhomme, au Pr Giacomo Bernardi, au Pr William Aalbersberg et au Dr Jean-Yves Meyer pour leur présence. Je pense également à mes directrices et mon encadrant scientifique, le Pr Phila Raharivelomanana, le Dr Véronique Berteaux-Lecellier et le Dr Gaël Lecellier, pour ces trois années passées autour de ce sujet passionnant. Merci Phila d'avoir cru en moi dès le début, merci aussi pour tes encouragements et les dégustations de chocolat (et de champagne !) du monde entier, tous meilleurs les uns que les autres... Merci Véro et Gaël de m'avoir accompagnée tout au long de ce processus, j'étais ravie de découvrir le vaste monde de la génétique. Je remercie enfin les membres de mon comité de thèse qui m'ont suivi pendant les deux dernières années, merci Mireille Chinain, Denis Saulnier et Yannick Gueguen pour vos conseils avisés.

Je tiens aussi à remercier sincèrement la directrice de l'UMR-EIO, le Pr Nabila Mazouni, le directeur du CRIOBE, le Dr Serge Planes, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, ainsi que le Dr Marc Taquet pour m'avoir accueillie sur le site de l'IRD. Merci à la DGA pour leur autorisation de prélever des échantillons à Moruroa et de divulguer les résultats. Merci à la Direction des Ressources Marines et Minières pour leur collaboration.

Et voilà, c'est là que cette belle histoire commence... Du fond du cœur un immense merci à... A Clémence, la plus sensuelle des salseras, comment te remercierais-je assez ? Merci de m'avoir montré, entre deux pas de danse, le chemin de la thèse (quelle idée tout de même !), de m'avoir montré qu'on peut croire en ses rêves et vivre de sa passion. Tu as été le déclencheur, la personne clé qui se trouve sur ta route on ne sait pas trop pourquoi, et qui changera ta vie sans que tu ne t'en rendes compte... Le CDI de tes rêves (et la voiture de frimeuse qui va avec ;)) sont amplement mérités jolie demoiselle. Je suis tellement contente que ça ait marché pour toi. J'ai aussi une pensée pour Laurent, avec qui tout a commencé. Je n'oublie pas que tu étais au départ de cette belle aventure. Merci de m'avoir encouragée à poursuivre ma voie.

La suite des remerciements n'est absolument pas hiérarchisée, et un grand, un immense mea culpa si j'ai oublié quelqu'un ...

A toute l'équipe de l'IRD, Elodie, Martine, Mélanie, Corinne, Cécile, Marc et tous les autres, voilà une jolie page qui se tourne... Les 3 années sont passées, ça va faire drôle de ne plus vous voir !

A l'équipe de l'UPF, qui m'a vue essentiellement en blouse blanche devant des étudiants bien plus grands que moi, et que j'avais déjà eu au collège !! ;) Merci Marina de m'avoir fait confiance depuis 7 ans déjà ! Je me souviens de mon stress la première fois que je t'ai appelée pour te proposer d'effectuer des vacances, et l'accueil adorable que tu m'avais fait dès le premier jour. Ça a été un tournant pour moi je ne l'oublie pas. Merci Carol pour ton accueil au labo et les pauses café bien méritées, pour nos salades mangées sur le pouce et nos rigolades entre deux TP... Merci Stéphanie pour ta chaleur humaine. Carmela, merci pour le temps que tu as pris pour moi en ce début de reconversion, merci pour ton indulgence envers celle qui n'avait jamais tenu une pipette de sa vie ! Tu es une excellente pédagogue et tu as su faire bien preuve de patience quand il a fallu travailler sur mes « bébêtes ». Merci à Estelle, à Taivini, et à tous ceux que je n'ai pas cités, j'espère qu'on se reverra !

A l'équipe du CRIOBE, Serge, Yannick, Gilles, Pascal, Benoit, Franck, Christine, Elina, René, Suzie, Ricardo, Véro, Patou, Ophélie, loupotte, Julie, Pauline, Vatea, Charlotte et tous les autres qui m'ont vu passer, repasser, puis disparaître, revenir, m'installer, et repartir de nouveau... Le courant d'air que je suis a apprécié tous ces moments partagés autour d'un repas, d'une réunion, d'un aquarium... Bonne continuation à tous, j'espère vous retrouver très bientôt ! Je n'oublie pas les PU, Laetitia et Mathieu, « assistants dissecteurs de bénitiers réchauffés ». Matthieu qui aurait cru que tu reviendrais ?? Au fait j'attends toujours de te voir à poney ! Et mes amis de nuitée, avec qui j'ai découvert les joies de la vie en communauté : Laurie, Nanuk, Flo et Marc pour les soirées coinch et mime inoubliables. Trop facile les platax, les rotifères de Ricardo et le must : « dormir à côté de Nanuk ». Sophie et Brendan merci pour votre gaieté et pour ces expériences culinaires inoubliables !!

Je n'oublie pas l'équipe de l'ILM, Mireille, Clémence (-re !), Taiana, André, Rémi, qui ont su m'encourager au détour d'une séance de dressage ou d'une conversation à bâtons rompus !

Je pense également à l'équipe du LCBE, Cédric, Bernard, Isabelle, Nathalie, Anaïs, Bruno, France, Vanessa, Khoubaid... J'ai passé un séjour inoubliable parmi vous, à coups de kinder bueno et de repas de fin d'année bien arrosé (:-), de séjour au ski... J'ai toujours ma bague, elle ne me quitte pas...

A l'équipe de l'IRD Nouméa, Cécile, J-B, Daphné, Josina, et mon panaméen préféré, mon hôte de choc, le plus beau, Juan. Je garde un souvenir chaleureux de mon séjour parmi vous, merci pour tout !!

A tous les stagiaires qui ont connu les joies du labo de bio mol : Elodie, Laura, Makalani, Gnahina, Margaux et Mathieu qui a connu les joies du terrain au Méridien de Bora Bora ! Merci à tous pour votre contribution.

A tous ceux qui ont participé d'une manière ou d'une autre, et toujours de bon cœur, au prélèvement des bénitiers, à leur dissection ou encore au transport à haut risque des échantillons d'ADN et d'ARN ☺, merci à tous d'avoir œuvré pour cette belle cause ! Yannick (qui a bravé tous les océans pour récolter des échantillons), Pauline, Mélanie, Maël, Gaël, Véro, Phila, Carmela, Benoit, Laura, Marcel le Pennec, la maman de Florent, Denis Saulnier, Dominique Laurent, Loïc Charpy, Esperanza et Jose Antonio, William Aalbersberg, sans oublier Melaoli et Jean-Gui ! Les pahua vous remercient !

A Pascale pour nos skypes du lundi soir qui m'ont appris que le temps n'était pas linéaire et pour mon protocole anti-stress largement éprouvé depuis !

Un immense merci à mes soutiens du sprint final, Fanny, Elodie, Patou et Flo. C'était bon de pouvoir s'appuyer sur vous, professionnellement et psychologiquement ! Fanny tu as été ma 1^{ère} lectrice, ça n'a pas dû être drôle mais pour moi ça vaut de l'or. Toi que j'ai appris à connaître tout doucement, et j'en suis ravie, tu es tombée du ciel au moment où je ne m'y attendais pas. Elodie notre système gagnant-gagnant m'a bien plu et a été d'un très grand réconfort. J'ai appris la leçon sois en sûre ! Merci pour ma gamelle « made in carrefour » et les chocolats post-prandiaux ! Tu chausse tes palmes quand tu veux jolie demoiselle... :) Et mon Flo, qui m'a translâtée du bureau au fare potee, comme ton chat de compèt', tous les midis ces derniers mois. Allez je te fais ton petit paragraphe il est amplement mérité :

*A mon geek préféré, merci pour les parties de rigolade, les poulpes endiablés, les « organes » luminescents (ah qu'est ce que j'ai hâte d'être à ta soutenance !!!), merci pour les « pause ponton », les schoko-bons, pour avoir dompté les figures, les tableaux, et les points GPS rebelles, pour ton tee-shirt génialissime qui m'a tenu compagnie les derniers soirs, mais surtout pour avoir subi ma cyclothymie hebdomadaire (non sans mal) Je suis contente de t'avoir ré-appris à rêver ;-)
Tu peux réécrire ta pancarte maintenant !!! Promis je passerai de temps en temps te faire du café...*

A mon Mentor pour son soutien discret mais inconditionnel, pour ses clips rétro et son rhum arrangé made in La Réunion qui j'avoue n'est pas dégueu ☺ Je t'attends avec mon Zacapa !!!

A mon coursier préféré, pour avoir supporté mes interminables mails..., pour avoir rigolé quand je t'ai dis que tu étais prévisible (et qu'en plus je ne tenais pas compte de ce que tu disais !). La cigale que je ne suis pas te remercie de ton soutien et de ton auto-dérision :)

A Mélanie, discrète et efficace, on ne s'est pas beaucoup vues malgré la proximité mais sache que je suis ravie que tu aies trouvé ta place dans notre beau pays.

A Nico M. à qui je ne dois plus un verre, mais à qui j'en payerai volontiers un au détour d'un congrès... Tu as su être présent. La princesse s'est transformée, tu verras je suis sûre qu'elle va te plaire !

A Mareva, notre Matarêveuse adorée, j'ai passé 3 années dans le bureau d'à côté et même pas un « post » : je suis déçue ;)

A ma petite putupu bon courage pour ta dernière année, n'hésite pas à faire appel à tes anciens collègues quand tu seras sur la fin, tu verras que ce n'est pas du luxe !!!

A Nico L., mon dealer de chocolat préféré :) qui a eu le privilège d'assister à ma « danse des orteils » à Taiwan. Heureusement que tu étais là, t'as géré comme un chef !!

A Simon, merci pour les free Irish coffee ;) Peut être qu'un jour tu ne seras pas en mission et qu'on le boira ensemble, ce verre !!

A Héloïse pour m'avoir tant chambrée et pour avoir bien encaissé en retour ! J'étais ravie de te réconcilier avec les canassons, ça te va comme un gant, enfin comme ta combi de plongée joli petit poisson.

A Ophélie la jolie blondie, le naturel à l'état pur, merci pour nos questionnements communs et pour cette soirée Reggae mémorable. Tu reviens camper dans mon jardin quand tu veux bichette !

A ma Patou, tu es non seulement une brillante scientifique, mais une personne au grand cœur. Je suis vraiment heureuse que nos routes se soient croisées, je te dois beaucoup. Je te souhaite plein de bonheur avec ce petit ange qui vient aujourd'hui compléter ta jolie famille.

A Gilles, mon binôme de plongée préféré, merci de pour ta patience et ta compréhension, et c'est peu dire !!!

A Ron pour ta caméra bien planquée ;) Tu as su être là pile au bon moment. Pour ton soutien, tes conseils avisés et surtout ton vin blanc délicieux, un grand merci !

A mon cricri, le plus cubain des tahitiens, merci pour toutes ces dances et ces dégustations de rhum sur fond de Los Van Van. Je dois l'admettre aujourd'hui rien ne vaut la rumba et le son !

*A Seb, pour ta présence et ta compréhension, et pour avoir dompté mes données GPS rebelles !!
Spéciale dédicace à Cyril, tu vois j'en suis venue à bout de ce « mémoire ». Saplin !*

A Gaby, Kader et Nico, toujours là pour plaisanter ou pour un câlin. Merci les gars !!!

A Camille et François, bisous les loulous, plein de bonheur dans votre nouvelle aventure...

A Christelle, notre sportive de compèt', merci ma chérie pour tes mots encourageants, je te dis à très bientôt pour nos belles balades, sous l'eau ou en montagne...

A Cha, que j'ai bien peu vu mais qui a pris soin de prendre des nouvelles régulièrement. La plus bienveillante des amies et des mamans. Tu es un ange tombé du ciel. Merci pour ton attention et tes anecdotes qui finissent toujours en fou rire, pour ta vision de la vie que tu as pris le temps de partager avec moi, merci pour ce beau cadeau.

A Linda et Damien, les « anciens », on a passé bien peu de temps ensemble ces dernières années mais je savais que vous étiez là. Cette fois-ci je vous dis à bientôt.

A Vaiana, ma plus fidèle, on se suit depuis notre plus tendre enfance, et j'ai toujours autant de plaisir à partager des moments avec toi. Même si mes visites étaient furtives et de plus en plus rares tu as su être présente à chaque instant. Tes princesses sont dans mon cœur, je suis la plus heureuse des taties.

A mon Beubeu, pour tes conseils avisés et ton franc parler !

A ma Caro, ma sœur de cœur, tu es une prof merveilleuse, une maman extraordinaire et une amie en or. Je t'aime ma chérie.

A Manu, tu es un rayon de soleil, merci d'être, merci d'être là, encore et toujours, envers et contre tout... Je ne sais pas si tu réalises à quel point notre amitié est chère à mes yeux ni quelle importance tu as dans ma vie. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

Ma Fo Fie la reine du bricolage je ne t'oublie pas. Tu as raison rien ne vaut l'authenticité, voilà une belle leçon que j'ai apprise à tes côtés. A appliquer dans TOUS les domaines de sa vie ;)

Paupiette ma rockeuse adorée, je me souviens d'un anniversaire mémorable, le dernier en date d'ailleurs ! Tu as raison chaque couvercle a son pot : je te souhaite de trouver le tien (de pot). C'est poétique hein ! Parce que tu le vaux bien ;)

Lu, ma jumelle de cœur, je ne trouve pas les mots... merci pour ton écoute infallible, ta compréhension et ton soutien inconditionnel, pour les « chiens, chats et éclairs au chocolat » et les innombrables Belvédères thérapeutiques qui sont des bulles de légèreté et d'authenticité. Pour notre listing des « mots moches », congruence, assertivité, triangle de Karpman... qui s'allonge à chaque petite marche. Toi la belle âme bercée d'un petit grain de folie, je te souhaite de trouver ta route, et que nos chemins de croisent à l'infini... tout simplement, parce que la vie est magique.

A Ingrid qui a, contre vents et marrées, été à mes côtés depuis le début et finalement jusqu'à la fin de cette aventure. Toi qui a su me réconforter et me donner confiance, pour ces 3 années « ma Chérie » je te dis merci. Tu es une belle personne, juste et franche, très franche ! 😊 Merci

pour tous ces merveilleux moments partagés. A notre amitié qui ne s'arrêtera ni à la thèse ni à la colocation nous trinquerons très bientôt ! ;)

A ma famille de France, qui a suivi de loin mon parcours et a su mettre un petit mot d'encouragement aux moments clé de cette aventure (merci facebook !), à mes grands parents qui nous ont quitté récemment et qui auraient été heureux de voir la réussite de leur petite fille, et à mon couz' Will qui a fait son baptême de l'air en traversant la planète pour venir nous rejoindre et partager une tranche de vie polynésienne, à tous un grand merci.

Et enfin à ma famille, papa, maman, Chris, Maeva et ce petit ange Manotea, mon « bébé-chou » qui a agrandi la famille depuis un peu plus d'un an et fait le bonheur de tous. Je pourrais écrire une thèse de remerciements pour vous 5, mais au final cela se résumerait en 3 mots : Je vous aime. Tout simplement.

A tous, ceux que j'ai cité et ceux que j'ai oublié, vous qui n'avez jamais douté (je m'en chargeais largement toute seule !), du fond du coeur merci.

Maintenant que c'est fini, « Vamos a beber l'éthanol !!!!! »

Je terminerai par cette citation qui me correspond bien :

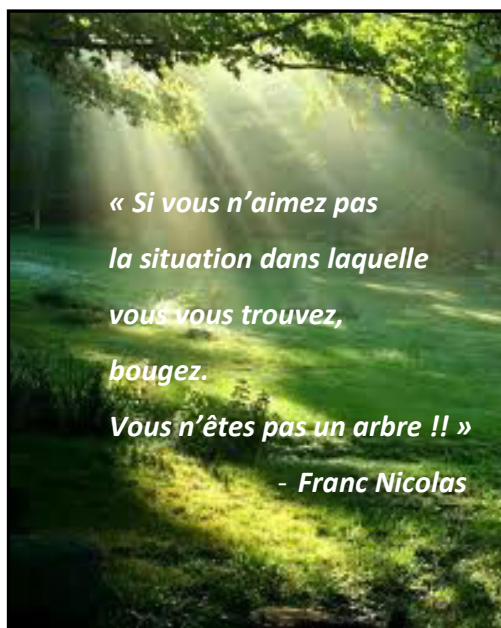
*« Il est tellement important de
laisser certaines choses disparaître.
De s'en défaire, de s'en libérer.
Il faut comprendre que personne
ne joue avec les cartes truquées.*

*Parfois on gagne, parfois on perd.
N'attendez pas que l'on vous rende
quelque chose, n'attendez pas que
l'on comprenne votre amour.
Vous devez clore des cycles, non
par fierté, par orgueil ou par
incapacité, mais simplement parce
que ce qui précède n'a plus sa
place dans votre vie.*

*Cessez d'être ce que vous étiez et
Devenez ce que vous êtes... »*

- Paulo Coelho

Et, avec toute la tendresse que je voue aux dicotylédones :



Je dédis cette thèse à ma grand-mère, Antoinette Millet.

1^{er} prix du concours de poésie, Raraka (Tuamotu)

Merci Annie Aubanel pour cette petite merveille.

Le bénitier vu avec toute l'innocence et la candeur d'un regard d'enfant...

Rencontre avec le bénitier

Ce matin,
Plus détour du récif
J'ai rencontré un bénitier géant
Vêtu comme un marquis,
Il avait mis des points noirs et blancs
à son manteau marron.
Des coraux roses, mauves, jaunes et gris
l'entouraient.
Quelle joie c'était pour mes yeux !
Je lui ai dit : "Tu es magnifique !"
Il riait, et il riait...
Il était comme une fleur de lumière
Parmi les fleurs récifales.
Et il s'en alla sur le chemin
Pompant et sautant un peu
Sur un pied invisible
Il a ainsi parcouru
Le tour du récif de KARAKA
Pompant, séduisant et heureux.
Et l'atoll entier lui a souri.

EBB-TAVE Eugénie CM1
TAPI Lionel CM2

SOMMAIRE

PARTIE I - INTRODUCTION GENERALE	26
I. La diversité des mollusques bivalves	29
I.1 Généralités	29
I.2 Le cas particulier des bécotiers (Tridacnidae)	33
I.2.1 Classification et datation	33
I.2.2 Distribution et état des stocks	37
I.2.2.1 La répartition mondiale des bécotiers	37
I.2.2.2 Le cas particulier de la Polynésie française	40
I.2.3 Diversité génétique des bécotiers dans différents contextes géographiques et géomorphologiques.....	45
I.2.3.1 En région Indo-Pacifique et en mer rouge	45
I.2.3.1 En Polynésie française	49
II. Biologie et écologie des bivalves marins	49
II.1 Généralités sur les bivalves	49
II.2 Le cas particulier des bécotiers.....	51
II.2.1 Les bécotiers, organismes symbiotiques.....	51
II.2.2 La diversité des <i>Symbiodinium</i> associés aux bécotiers	53
III. Les approches « omiques » chez les bivalves marins	61
III.1 Diversité génomique, protéomique et métabolomique	61
III.1.1 Génomes et transcriptomes	61
III.1.2 Protéome	62
III.1.3 Métabolome	63
III.1.3.1 Les lipides	64
III.1.3.2 Les métabolites secondaires	71
III.2 La réponse à divers types de stress	74
III.2.1 Exemples d'étude intégrative de la réponse au stress	74
III.2.2 Les grandes voies de la réponse aux stress.....	75
III.2.2.1 Les protéines chaperones	76
III.2.2.2 Les protéines de stress oxydant	76
III.2.2.3 La modification du cytosquelette.....	77
III.2.3 Le cas particulier du stress thermique.....	77
III.2.4 Le cas particulier des bécotiers	82
III.2.4.1 Particularités physiologiques et adaptation à différentes conditions environnementales	82
III.2.4.2 Le rôle des <i>Symbiodinium</i> dans la réponse au stress	84
PARTIE II - MATERIELS ET METHODES	86
I. Stratégie et technique d'échantillonnage	87
I.1 Choix des sites	87
I.1.1 Pour l'étude de la diversité génétique.....	87
I.1.1 Pour l'étude de la réponse au stress thermique	88
I.2 Techniques de prélèvement et de stockage	88
I.2.1 Pour la diversité génétique	88
I.2.2 Pour les approches « omiques »	88

II. Expérience de stress thermique	88
III. Analyse cytologique	91
IV. Analyse Génomique	91
IV.1 Extraction d'ADN total	91
IV.2 Marqueurs génétiques et amorces.....	92
IV.3 Amplification standard et séquençage	94
IV.4 Amplifications nichées	95
IV.5 Analyse des données	97
V. Analyses transcriptomiques	98
V.1 Extraction d'ARN total	98
V.2 Séquençage, assemblage et annotation	99
V.3 Analyse des données transcriptomiques	99
VI. Analyses métabolomiques	99
VI.1 Tests anti-oxydants	100
VI.2 Dosage des lipides totaux	100
VI.3 Extractions des métabolites secondaires totaux et des lipides	100
VI.4 Techniques chromatographiques	101
VI.4.1 Préparation des échantillons.....	101
VI.4.1.1 Stérols, acides et alcools gras	101
VI.4.1.2 Fraction apolaire totale.....	101
VI.4.2 Obtention des profils métabolomiques	102
VI.4.2.1 L'analyse en CG-SM.....	102
VI.4.2.2 L'analyse en CLHP-SM	102
VI.5 Analyses des données chromatographiques	104
 PARTIE III- DIVERSITE GENETIQUE DE <i>TRIDACNA MAXIMA</i> ET COMMUNAUTES DE SYMBIOTES ASSOCIEES EN POLYNESIE FRANÇAISE	105
I. Approche par barcoding	106
I.1 <i>Tridacna maxima</i>	106
I.1.1 Choix des 3 marqueurs génétiques étudiés : COI, 16S et 18S.....	106
I.1.2 Diversité des 3 marqueurs génétiques et phylogénie.....	107
I.1.3 Diversité génétique et connectivité.....	114
I.1.3.1 La diversité génétique	114
I.1.3.2 Structure spatiale de la variation génétique	116
I.1.4 Structure génétique des populations dans les 4 archipels et flux géniques	120
I.1.5 Phylogénie à l'échelle du Pacifique et datation de la divergence.....	123
I.2 <i>Symbiodinium</i> spp	125
I.2.1 Identification des clades grâce au marqueur génétique nucléaire 28S.....	125
I.2.2 La PCR nichée ou l'identification des clades sans passer par le séquençage	128
I.2.3 Identification des sous-clades par séquençage	131
II. Synthèse et discussion partielle	133
 PARTIE IV- REPOSE DE <i>TRIDACNA MAXIMA</i> AU STRESS THERMIQUE	150
I.Choix du stress thermique appliqué et mesures des paramètres l'eau au cours de l'expérience .	151
II.Expression différentielle des gènes au cours du stress chez <i>T. maxima</i>	155

II.1 Transcriptome global de <i>T. maxima</i>	156
II.2 Transcriptome différentiel	162
II.2.1 Analyse globale de l'expression génique	162
II.2.2 Analyse spécifique de certains gènes de la réponse au stress	163
III.Des profils métabolomiques caractéristiques de l'état de stress.....	180
III.1 La réponse des métabolites secondaires apolaires	181
III.1.1 Exemple de résultat obtenu pour un échantillon	182
III.1.2 Analyse globale.....	182
III.1.3 Analyse spécifique.....	188
III.1.3.1 Effet du stress thermique.....	188
III.1.3.2 Impact de l'amplitude du stress thermique	192
III.1.3.2 Effet de la présence de coraux à proximité des bénitiers	194
III.1.3.3 Effet de l'ajout d'un second type de stress	195
III.1.3.4 Bilan.....	196
III.2 La réponse des acides gras.....	197
III.2.1 Réponse quantitative globale.....	197
III.2.2 Réponse qualitative et variation quantitative de certains métabolites	198
III.2.2.1 Exemple de résultat obtenu pour un échantillon	200
III.2.2.2 Analyse globale de l'ensemble des résultats	202
III.2.2.3 Analyse spécifique.....	205
III.2.2.3.1 Effet du stress thermique	205
III.2.2.3.2 Effet de la présence de coraux.....	207
III.2.2.3.3 Effet de l'ajout d'un second type de stress.....	208
III.2.2.3.4 Bilan	211
III.3 L'activité anti-oxydante.....	211
IV.Caractérisation des communautés de <i>Symbiodinium</i> au cours du stress	213
IV.1 Densité et caractéristiques morphologiques.....	213
IV.2 Identification des clades et sous-clades	215
IV.2.1 Résultats de la PCR nichée.....	215
IV.2.2 Résultats obtenus grâce aux données transcriptomiques	217
V.Synthèse et discussion partielle.....	220
PARTIE V- DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	223
I. Génétique	224
I.1 2 nouveaux clades de <i>T. maxima</i> en Polynésie française et à Tonga : implications quand à leur origine	224
I.1.1 Hypothèse 1 Arrivée des deux clades de <i>T. maxima</i> en Polynésie française.....	225
I.1.2 Hypothèse 2 : arrivée d'un haplotype fondateur unique en Polynésie française	230
I.2 Faible structure génétique des bénitiers en PF	231
I.3 Dispersion et plans de gestion de la ressource en bénitiers.....	234
II. Réponse de <i>T. maxima</i> au stress thermique.....	235
II.1 Le rôle des <i>Symbiodinium</i> dans la réponse au stress thermique chez <i>T. maxima</i>	235
II.2 Réponses transcriptomique et métabolomique de <i>T. maxima</i> au stress thermique	235
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	241
ANNEXES.....	267

Acronymes et abréviations

ADNm : ADN mitochondrial

ADNr : ADN ribosomique

AG : Acide gras

AG NMI : Acide gras non interrompu de méthylène

ARA : acide arachidonique

ARNr : ARN ribosomique

CCES : Contre Courant Equatorial Sud

CES : Courant Equatorial Sud

CG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CITES : Convention of International Trade of Endangered Species

CLHP-SM : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse

COI : cytochrome c oxydase I

DGEE : électrophorèse sur gel en gradient dénaturant

EAO : espèces actives d'oxygène

EPA : acide eicosapentaénoïque

ITS : espaceur transcrit interne

MAAs : Acides Aminés Mycosporine-like

MUFA : acides gras mono-insaturés

MT : métallothionéine

NCBI : Centre National de l'Information sur les Biotechnologies

Nm : nombre de migrants effectifs

PLSDA ou ADMC : Analyse discriminante des moindres carrés

PUFA : acides gras poly-insaturés

SST : Sea surface temperature

qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

UICN : Union mondiale pour la Nature

Liste des figures

Figure 1. Répartition mondiale des récifs de coraux.....	27
Figure 2. Photo d'un bénitier de l'espèce <i>T. maxima</i> sur son support corallien	28
Figure 3. Classification phylogénétique des mollusques indiquant l'emplacement des bivalves.	30
Figure 4. Arbre ultramétrique des bivalves réalisé avec l'échelle des temps géologiques	32
Figure 5. Classification phylogénétique de 8 espèces de Tridacnidae établie grâce au marqueur mitochondrial <i>16S</i>	34
Figure 6. Arbre phylogénétique du genre <i>Tridacna</i> basé sur des séquences d'ADN mitochondrial (<i>COI</i> et <i>16S</i>) concaténées.....	35
Figure 7. Recoupement des résultats phylogénétiques obtenus pour 6 espèces du genre <i>Tridacna</i> et 2 espèces du genre <i>Hippopus</i> à partir de séquences d'ADN mitochondrial <i>16S</i> avec les données stratigraphiques sur les fossiles.	36
Figure 8. Répartition mondiale des différentes espèces de bénitiers.	39
Figure 9. Variation du nombre d'espèces de coraux dans le monde mettant en évidence le gradient de biodiversité présent dans l'océan Pacifique	40
Figure 10. Bathymétrie et histoire géologique de la Polynésie française	41
Figure 11. Localisation et caractéristiques des stocks de bénitiers.	43
Figure 12. Photo d'un « mapiko » de Tatakoto.....	44
Figure 13. Cartes illustrant : (a) les flux géniques ($N_e m$) parmi les populations de <i>T. maxima</i> dans l'Indo-Ouest Pacifique, (b) les courants de surface océaniques actuels et ceux présents à 100m de profondeur dans le Pacifique central.	46
Figure 14. A : Réseau d'haplotypes représentant le lien entre les 117 haplotypes obtenus à partir de 211 séquences <i>COI</i> de <i>T. maxima</i> prélevés dans l'archipel Indo-Malais et la mer rouge.B : Carte de la répartition des clades dans l'Indo-Ouest pacifique.	48
Figure 15. Schéma simplifié de l'anatomie des bivalves.	50
Figure 16. Cycle biologique du bénitier.....	51
Figure 17 Anatomie du bénitier montrant l'emplacement des tubules contenant les <i>Symbiodinium</i>	52
Figure 18. Arbre phylogénétique du genre <i>Symbiodinium</i> élaboré par la méthode du maximum de vraisemblance	55
Figure 19. Arbre phylogénétique construit avec la méthode « <i>Neighbor-Joining</i> » établi avec les séquences <i>COI</i> de <i>Tridacna</i> spp avec les clades majoritaires de chaque espèce.....	60

Figure 20. Répartition des principaux types de lipides en deux sous-catégories.	65
Figure 21. Structure et nomenclature de 3 types d'acide gras.	66
Figure 22. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés.....	69
Figure 23. Biosynthèse des acides gras NMI et du 20 :1n-11.....	70
Figure 24. Biosynthèse des acides gras ramifiés.....	70
Figure 25. Caroténoïdes identifiés chez le bénéitier <i>T. squamosa</i>	72
Figure 26. Structure moléculaire des MAAs identifiées chez les bénéitiers et leur longueur d'onde d'absorption maximum.	73
Figure 27. Schéma général de la réponse au stress chez les bivalves.	81
Figure 28. Carte des îles échantillonnées	87
Figure 29. Photo d'une partie du dispositif en place lors des expériences de réchauffement..	90
Figure 30. Carte du gène <i>45S</i> avec un agrandissement de la région <i>28S</i>	96
Figure 31. Carte de la région <i>28S</i> et des amorces utilisées pour identifier les sous-clades de <i>Symbiodinium</i> par la technique d'amplification nichée.	97
Figure 32. Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode « <i>Maximum Likelihood</i> » à partir de 314 séquences <i>COI</i> (461 pb) de <i>Tridacna maxima</i>	108
Figure 33. Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode « <i>Maximum Likelihood</i> » à partir de 102 séquences <i>16S</i> (392 pb) de <i>Tridacna maxima</i>	110
Figure 34. Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode « <i>Maximum Likelihood</i> » à partir de 68 séquences <i>18S</i> (604 pb) de <i>Tridacna maxima</i>	111
Figure 35. Relations phylogénétiques entre les espèces du genre <i>Tridacna</i>	112
Figure 36. Echelle multi-dimensionnelle associée au regroupement hiérarchique des différences 2 à 2 des <i>Fst</i> entre les populations.....	118
Figure 37. Carte de la répartition des 2 clades dans les 4 archipels de Polynésie française ..	120
Figure 38. Arbre phylogénétique réalisé avec la méthode de « <i>Maximum Parsimonie</i> » avec nos séquences <i>COI</i> de Polynésie française et des séquences de référence issues de <i>GenBank</i>	123
Figure 39. Zoom sur la branche comprenant les échantillons de Polynésie française et de Tonga, mettant en évidence les deux sous-clades présents en Polynésie française	124
Figure 40. Arbre phylogénétique des séquences <i>28S</i> (402 pb) de <i>Symbiodinium</i> selon la méthode « <i>Maximum Likelihood</i> ».	126
Figure 41. Résultat de l'électrophorèse et séquence <i>28S</i> partielle (nucléotides 209 à 243) des clades majoritaires et minoritaires de <i>Symbiodinium</i> de l'échantillon prélevé à Teahupoo, Tahiti (TEA4).....	127

Figure 42. Résultats des tests de spécificité et de sensibilité du couple d'amorces spécifiques du clade A sur l'ADN de clade A.	129
Figure 43. Distribution des sous-clades de <i>Symbiodinium</i> sur 4 sites de Polynésie française : Moorea, Tahiti ouest, Mururoa et Raivavae.....	133
Figure 44. Classification biogéographique montrant la distribution des 232 écorégions.	138
Figure 45. Carte des principaux courants de surface moyens du Pacifique sud observés de janvier 1993 à janvier 2001 et localisation des îles de Fidji, Tonga et Polynésie française. .	140
Figure 46. Distribution des sous-clades de <i>Symbiodinium</i> présents au sein des bécitiers, mise en évidence à partir de séquences ITS2.....	142
Figure 47. Diagramme en réseau du clade A de <i>Symbiodinium</i> présent au sein du genre <i>Tridacna</i>	143
Figure 48. Fréquence de chaque type de <i>Symbiodinium</i> chez <i>T. maxima</i>	147
Figure 49. Disposition des aquariums dans les deux expériences de réchauffement.....	152
Figure 50. Courbe de température des expériences de réchauffement et temps de prélèvement des bécitiers.....	153
Figure 51. Photos d'un bécitier avant (A) et après (B) le blanchissement.....	155
Figure 52. Répartition des 6 groupes de transcrits du transcriptome global de <i>T. maxima</i> . ..	157
Figure 53. Répartition des transcrits du groupe « Processus cellulaire ».....	158
Figure 54. Répartition des transcrits du groupe « Traitement de l'information sur l'environnement »	158
Figure 55. Répartition des transcrits du groupe « Traitement de l'information génétique » .	159
Figure 56. Répartition des transcrits du groupe « Métabolisme ».....	160
Figure 57. Répartition des transcrits du groupe « Différents systèmes de l'organisme ».....	161
Figure 58. Corrélations de l'expression des gènes des différents groupes de bécitiers comparés deux à deux.....	163
Figure 59. Arbre obtenu avec la classification des distances euclidiennes avec la méthode ward pour l'ensemble des transcrits du groupe « Chaperonnes »	164
Figure 60. Variation de la quantité de transcrits du cluster 8 du groupe des chaperonnes au sein des bécitiers au cours de l'expérience 1.	165
Figure 61. Variation de la quantité de transcrits des clusters 10 et 12 du groupe des ubiquitines au sein des bécitiers au cours de l'expérience 1.....	166
Figure 62. Variation de la quantité de transcrits des clusters 2 et 8 du groupe du protéasome au sein des bécitiers au cours de l'expérience 1.....	167

Figure 63. Variation de la quantité de transcrits du cluster 4 du groupe des exosomes au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	168
Figure 64. Variation de la quantité de transcrits des clusters 2 et 10 du groupe des protéines de réparation et de recombinaison de l'ADN au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	169
Figure 65. Variation de la quantité de transcrits du cluster 5 du groupe des protéines de réplication d'ADN au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	169
Figure 66. Variation de la quantité de transcrits du cluster 2 du groupe des canaux ioniques au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	170
Figure 67. Variation de la quantité de transcrits du cluster 2 du groupe du cytochrome au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	171
Figure 68. Variation de la quantité de transcrits du cluster 8 du groupe des molécules du cytosquelette au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	172
Figure 69. Variation de la quantité de transcrits des cluster 3 et 5 du groupe des protéines de synthèse des lipides au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	173
Figure 70. Variation de la quantité de transcrits du cluster 8 du groupe des protéines mitochondriales au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	174
Figure 71. Variation de la quantité de transcrits du cluster 4 du groupe des protéines G au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	175
Figure 72. Variation de la quantité de transcrits des clusters 11 et 12 du groupe des kinases au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	176
Figure 73. Variation de la quantité de transcrits du cluster 2 du groupe des lectines au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	177
Figure 74. Variation de la quantité de transcrits du cluster 2 du groupe des molécules d'adhésion cellulaire au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.	178
Figure 75. Schéma représentant les étapes d'une étude métabolomique.	180
Figure 76. Profils obtenus en CL-SM, sur deux échantillons de bénitiers prélevés dans le même bac (M) à t0 (26°C) et t3 (32°C).	182
Figure 77. Représentation de la PLSDA 2D des profils métaboliques des 168 bénitiers prélevés lors des deux expériences de réchauffement et discriminés en fonction du temps de prélèvement, observés en CLHP-SM.	184
Figure 78. Exemple de groupe de métabolites qui évolue de la même façon au cours du réchauffement dans toutes les conditions de stress.	185
Figure 79. Représentation en « chips » des proportions de chacun des 364 métabolites présents au sein des bénitiers de l'expérience 1, obtenus en CLHP-SM.	186

Figure 80. Représentation en « chips » des proportions de chacun des 364 métabolites présents au sein des bénéitiers de l'expérience 2, obtenus en CLHP-SM.	187
Figure 81. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénéitiers obtenus en CL-MS.....	189
Figure 82. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénéitiers des bacs ne contenant que des bénéitiers (bacs B) de la première expérience, obtenus en CL-SM.	191
Figure 83. Variation de la proportion de 11 métabolites qui réagissent de la même façon au cours du stress thermique.	192
Figure 84. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénéitiers de la deuxième expérience ayant subi uniquement un stress thermique, obtenus en CL-MS.	193
Figure 85. Variation de la proportion de 17 métabolites discriminant les bénéitiers qui ont subi un stress thermique modéré (E) de ceux qui ont subi un stress thermique conséquent (F) à T3.	193
Figure 86. Représentation de la PLSDA 2D des profils métaboliques des bénéitiers en présence (bacs M) et en absence (bacs B) de coraux lors de la première expérience, obtenus par CLHP-SM.	194
Figure 87. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénéitiers de la deuxième expérience.	195
Figure 88. Représentation de la PLSDA-3D des profils métaboliques des bénéitiers des deux expériences à t0T0, t3 T3 et t4T4, obtenus en CL-MS.	196
Figure 89. Histogramme du taux de lipides totaux des échantillons de la première expérience.	198
Figure 90. Profils obtenus en CG-SM, sur deux échantillons de bénéitiers placés en conditions différentes (26°C et 32°C), au 6 ^{ème} jour de l'expérience 1.....	201
Figure 91. Acides gras identifiés sur les chromatogrammes présentés en figure 2.....	201
Figure 92. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des 168 bénéitiers prélevés lors des deux expériences de réchauffement et discriminés en fonction du temps de prélèvement, observés en CG-SM.....	203
Figure 93. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénéitiers présents seuls dans les bacs lors de la première expérience, obtenus en CG-SM.....	205
Figure 94. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénéitiers de la deuxième expérience ayant subi uniquement le stress thermique, obtenus en CG-SM.....	206
Figure 95. Variation des proportions des acides gras du groupe de métabolites N°6.....	207

Figure 96. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénitiers de la première expérience, obtenus en CG-SM.....	208
Figure 97. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénitiers de la deuxième expérience, obtenus en CG-SM.	209
Figure 98. Variation des proportions des acides gras du groupe de métabolites N°1	210
Figure 99. Variation des proportions des acides gras du groupe de métabolites N°5	210
Figure 100. Histogramme représentant la quantité relative de DPPH capté pour les temps de prélèvement t0 à t6 et pour l'ensemble des échantillons des deux expériences.	212
Figure 101. Photographies de manteau de bénitier prises au microscope optique.....	214
Figure 102. Photographies de manteau de bénitier prises au microscope optique au grossissement 63, mettant en évidence les granulations présentes dans certains <i>Symbiodinium</i>	215
Figure 103. Carte des courants de surface du Pacifique sud estimés durant les périodes de régression marine du Pliocène et du Pléistocène (-3 Ma à -12000 ans).....	225
Figure 104. Carte des courants de surface moyens actuels dans le Pacifique Sud.	226
Figure 105. Carte des courants de surface lors des évènements climatiques exceptionnels tels qu'El Niño ou La Niña.	227
Figure 106. Schéma représentant l'hypothèse 1 de la colonisation de la Polynésie française par les deux clades de <i>T. maxima</i>	229
Figure 107. Schéma représentant l'hypothèse 2 de la colonisation de la Polynésie française par un clade de <i>T. maxima</i>	230
Figure 108. Carte de la fréquence de passage des tempêtes tropicales et des cyclones observés entre 1970 et 2009 en Polynésie française.	233
Figure 109. Schéma récapitulatif des voies cellulaires et protéines associées activées ou inhibées lors du stress thermique chez <i>T. maxima</i>	238

Liste des tableaux

Tableau 1. Tableau des principaux clades et sous-clades de <i>Symbiodinium</i> identifiés au sein des bénitiers, avec la référence de l'article et la technique utilisée.....	58
Tableau 2. Clades de <i>Symbiodinium</i> présents chez <i>Tridacna</i> spp. Nombre d'hôtes dans lesquels chaque combinaison de clades de <i>Symbiodinium</i> a été identifiée.	59
Tableau 3. Composition en acides gras des branchies de <i>Ruditapes philippinarum</i> et <i>Crassostrea gigas</i>	68
Tableau 4. Caractéristiques des couples d'amorces utilisés.....	93
Tableau 5. Contenu d'un mélange de réaction PCR pour un tube.	94
Tableau 6. Profils thermiques des PCR pour différents couples d'amorces.	95
Tableau 7. Conditions analytiques en CLHP-SM.....	103
Tableau 8. Conditions analytiques en CLHP-SM : spectromètre de masse.....	103
Tableau 9. Localisation géographique des haplotypes uniques.....	109
Tableau 10. Bilan des substitutions observées pour les séquences <i>COI</i> , <i>16S</i> et <i>18S</i>	111
Tableau 11. Tableau des résultats statistiques et des tests de neutralité des différents sites étudiés en Polynésie française.....	115
Tableau 12. Différences 2 à 2 des <i>Fst</i> entre les populations et p-value associée.	117
Tableau 13. Test AMOVA avec valeurs de <i>Fst</i> et <i>Fct</i>	119
Tableau 14. Valeurs des migrants effectifs.	122
Tableau 15. Tests de spécificité et de sensibilité du couple d'amorces spécifiques du clade A sur l'ADN de clade A.....	128
Tableau 16. Clades de <i>Symbiodinium</i> identifiés au sein des bénitiers par la PCR nichée.....	130
Tableau 17. Provinces et écorégions des zones géographiques concernées par notre étude phylogénétique de <i>T. maxima</i>	139
Tableau 18. Clades et sous-clades de <i>Symbiodinium</i> identifiés chez <i>T. maxima</i> de la mer rouge à la Polynésie française, incluant les résultats de notre étude.....	145
Tableau 19. Proportions des différentes combinaisons de clades observées au sein de <i>T. maxima</i> en Indonésie et dans nos échantillons de Polynésie française.....	146
Tableau 20. Répartition des prélèvements et nombre de bénitiers prélevés.	154
Tableau 21. Comparaison du transcriptome global de 3 espèces de bivalves marins.....	161
Tableau 22. Bilan des variations de l'expression génique observée au cours du stress, en présence/absence de coraux à proximité des bénitiers.	179
Tableau 23. Liste des métabolites primaires identifiés en CG-SM chez les bénitiers non stressés et leurs proportions.....	199

Tableau 24. Distribution des métabolites primaires identifiés en CG-SM chez les bécitiers non stressés en fonction de leurs caractéristiques	200
Tableau 25. Résultats de l'identification des clades de <i>Symbiodinium</i> présents au sein des bécitiers utilisés dans l'expérience de réchauffement pour différents types de stress, et obtenus pas la technique de PCR nichée.	215
Tableau 26. Proportions de chaque combinaison de clades de <i>Symbiodinium</i> présents dans les bécitiers ayant subi divers types de stress, obtenues par la technique de PCR nichée.	217
Tableau 27 Clades identifiés au sein des groupes de bécitiers de l'expérience de réchauffement grâce aux analyses transcriptomiques	218

Liste des annexes

Annexe I : Article	268
Annexe II : Tableau des caractéristiques des 392 échantillons de bénitiers de notre étude : nomenclature, lieu et date de récolte.	289
Annexe III : Tableau bilan sur l'identification des clades de <i>Symbiodinium</i> présents au sein des échantillons de bénitiers	290
Annexe IV : Tableau des caractéristiques des échantillons de bénitiers utilisés pour réaliser le transcriptome global de <i>T. maxima</i>	292

Avant-propos

Les bénitiers, organismes iconiques des récifs coralliens, font partie des espèces menacées, mais l'espèce *T. maxima* reste encore très présente en Polynésie française, ce qui en fait un lieu d'étude privilégiée. Tout comme les coraux, les bénitiers sont présents dans les zones récifales et vivent en symbiose avec des organismes unicellulaires symbiotiques, les *Symbiodinium*. Malgré ces caractéristiques communes, les bénitiers sont connus pour être plus résistants au stress que la majorité des espèces de coraux (Mumby *et al.*, 2001 ; Leggat *et al.*, 2003). Dans le contexte du réchauffement climatique et du déclin des récifs coralliens, l'étude de la réponse de ces organismes au stress thermique représente un des enjeux majeurs de la recherche actuelle en biologie marine dans le but d'aider à la gestion des ressources naturelles récifales. Peu d'études ont été réalisées sur les mécanismes mis en œuvre chez le bénitier, lui conférant ses facultés d'adaptation aux variations environnementales. Afin de pouvoir mettre à jour leur faculté et capacité de réponse à un stress thermique, une approche intégrée de génomique fonctionnelle a été réalisée dans le cadre de cette thèse. Elle fait appel à 3 approches « omiques » : génomique, transcriptomique et métabolomique. Ce travail représente ainsi la première étude intégrée utilisant à la fois les outils de génomique, de transcriptomique et de métabolomique, réalisée chez un bivalve.

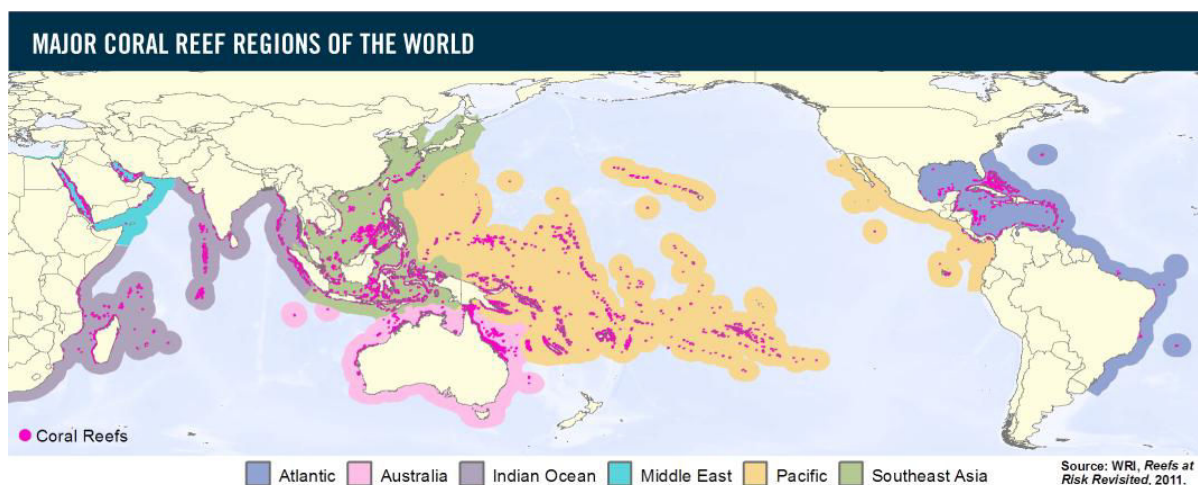
Dans un premier chapitre, une synthèse des connaissances actuelles des différents domaines exploités lors de ce travail sera présentée. Le second chapitre est consacré aux techniques et matériels utilisés. L'étude de la diversité génétique de *T. maxima* et des *Symbiodinium* associés est développée dans le troisième chapitre. Ces travaux ont permis dans un premier temps de sélectionner et disposer d'individus avec un fond génétique homogène, pour pouvoir ensuite réaliser l'étude comparative de la réponse cellulaire en condition stressante, développée dans le quatrième chapitre. L'étude génétique également a permis de mettre à jour la structuration génétique des populations de bénitiers en Polynésie française et leur connectivité. Les résultats permettent d'émettre des hypothèses sur les facteurs déterminant les flux géniques présents entre les populations et sur l'histoire de la colonisation de la Polynésie française par les bénitiers. De plus, la diversité génétique d'une espèce représente un indicateur de sa vulnérabilité aux variations des conditions environnementales. Un second chapitre de cette thèse est consacré à l'étude de la capacité de réponse cellulaire des bénitiers au stress thermique. Ne disposant d'aucunes données génomiques ou transcriptomiques, il a été nécessaire dans un premier temps, de disposer d'un transcriptome de

référence afin de pouvoir analyser les expressions géniques différentielles en fonction des conditions environnementales. Ainsi, ce chapitre est constitué de l'analyse du transcriptome *de novo* de *T. maxima* réalisé au cours de cette thèse, premières données génomiques de Tridacnidae, de l'analyse des expressions géniques différentielles et des variations métabolomiques en fonction des conditions. Le dernier chapitre est consacré à la présentation du bilan de ce travail et de son apport aux connaissances actuelles dans ce domaine, ainsi que les perspectives qui en découlent.

PARTIE I

Introduction générale

Les océans couvrent environ 70% de la surface terrestre, et les récifs coralliens seulement 1,5% de la surface des océans. Bien que leur aire de répartition soit assez restreinte, ces écosystèmes présentent une biodiversité, une productivité et une biomasse importantes, parmi les plus riches des écosystèmes de la planète (Roberts *et al.*, 2002). Ils représentent une zone de diversité marine souvent comparée à la forêt amazonienne sur terre. En effet, les récifs coralliens hébergent plus de 30% des espèces marines connues et sont importants à bien d'autres égards : tourisme, pêche, protection des côtes, etc. Ils sont caractéristiques des eaux chaudes tropicales et subtropicales peu profondes et oligotrophes, situées entre 30° de latitude sud et 30° de latitude nord (Figure 1) où ils forment des barrières externes et des atolls (Veron, 2000).



**Figure 1. Répartition mondiale des récifs de coraux
(WRI, *Reefs at Risk Revisited*, 2011)**

Certains types de coraux, les scléactiniaires, sont capables de synthétiser un squelette externe en carbonate de calcium, et l'agrégation de ces coraux constitue la fondation structurelle des récifs coralliens. Ces récifs représentent à la fois un support et une ressource trophique pour les nombreuses espèces qu'il héberge. Parmi ces espèces se trouve un des groupes présentant la plus grande diversité spécifique, les mollusques. Ce groupe comprend des organismes calcificateurs, les bivalves, dont font partie les bénitiers. Le support de la plupart des bénitiers est le corail lui-même (Figure 2), bien que certains se retrouvent également directement sur le sable.

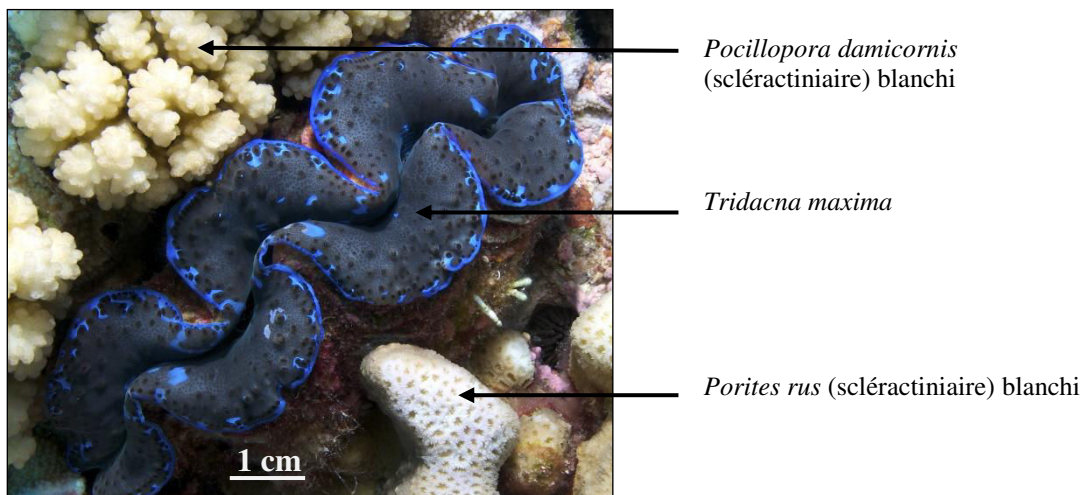


Figure 2. Photo d'un bécitier de l'espèce *T. maxima* sur son support corallien, prise à Marutea sud (Tuamotu-sud). © Yannick Chancerelle, CRIOBE.

La pression humaine sur les littoraux se traduit par un processus d'occupation et d'utilisation progressive de l'espace naturel littoral lié au développement des activités humaines (Lefebvre, 2011). L'effet synergique des stress globaux liés au changement climatique et des stress locaux liés à des facteurs anthropiques et naturels (Hughes *et al.*, 2003) a entraîné le déclin drastique des coraux observé ces 30 dernières années (De'ath *et al.*, 2012). Les organismes des récifs coralliens sont également affectés par ces stress environnementaux, auxquels se rajoutent l'effet subséquent lié au blanchissement massif et à la mortalité des coraux qui les hébergent.

Les mécanismes de résistance et de résilience de coraux constructeurs de récifs font l'objet de nombreuses études, comparativement aux organismes qu'ils hébergent. L'étude de la capacité d'adaptation aux changements climatiques globaux d'organismes emblématiques des récifs coralliens représente un enjeu majeur de la recherche actuelle en biologie marine. Les zones côtières les plus vulnérables dans le monde sont celles des petites îles océaniques, dont font partie les îles de la Polynésie française, qui vivent économiquement de l'exploitation des ressources côtières et marines ainsi que des activités de tourisme (Lefebvre, 2011). L'étude de la diversité génétique de l'espèce de bécitier majoritaire en Polynésie française et de sa capacité d'adaptation au réchauffement climatique devrait fournir des éléments permettant d'optimiser les plans de gestion de la ressource en bécitiers de cet écosystème fragilisé.

I. La diversité des mollusques bivalves

I.1 Généralités

Le bénitier fait partie de la classe des bivalves appartenant à l'embranchement des mollusques (Cuvier, 1795). Cet embranchement du règne animal contient plus de 130 000 espèces. La classification phylogénétique définit les mollusques comme des métazoaires triploblastiques bilatériens protostomiens dont les synapomorphies sont la présence d'une radula et d'un manteau (G. Lecointre & H. Le Guyader, 2006). Les eumollusques (Figure 3) correspondent aux mollusques à corps mou, non segmenté, et présentant une symétrie bilatérale. Ils regroupent tous les mollusques à l'exception des solénogastres et des caudofovéates. Les conchifères sont un sous-embranchement des eumollusques regroupant les mollusques possédant une coquille d'une seule pièce au moins à l'état larvaire. A ce titre, les conchifères regroupent l'ensemble des eumollusques à l'exception des polyplacophores. Les ganglioneures sont une classe de conchifères se distinguant par la réduction du nombre de muscles rétracteurs à une ou deux paires. Ils comprennent tous les conchifères à l'exception des monoplacophores. La sous-division des ganglioneures en deux classes, les viscéroconques et les diasomes, est aujourd'hui remise en question par plusieurs études (*Giribet et al., 2006; Kocot et al., 2011; Smith et al., 2011*). Les viscéroconques étaient caractérisés par la présence d'une tête particulièrement développée, ils comprenaient les gastéropodes et les céphalopodes (G. Lecointre & H. Le Guyader, 2006). Les premiers sont caractérisés par la torsion de leur masse viscérale et les seconds par un pied, divisé en bras, qui surmonte la tête. Les diasomes étaient un clade réunissant les ganglioneures dont la tête a secondairement presque disparu, c'est-à-dire les scaphopodes et les bivalves, dont un représentant, le bénitier *Tridacna maxima*, fait l'objet de cette thèse.

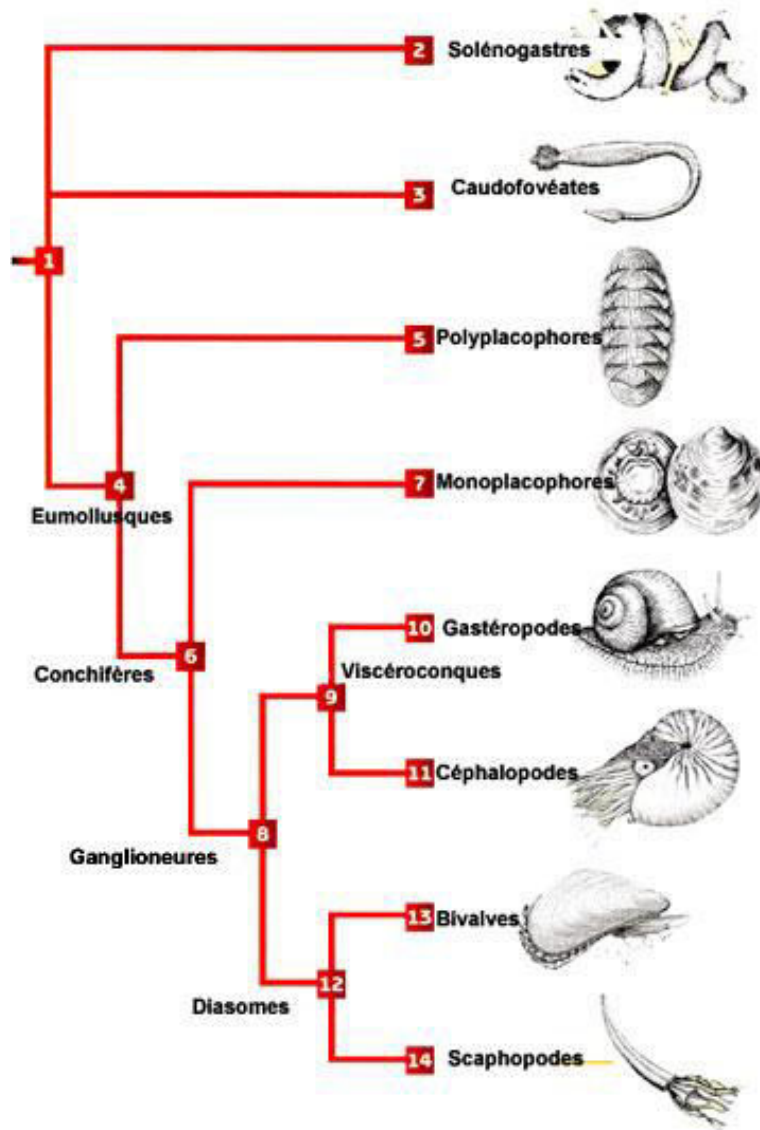


Figure 3. Classification phylogénétique des mollusques indiquant l'emplacement des bivalves.
(D'après G. Lecointre & H. Le Guyader, 2006)

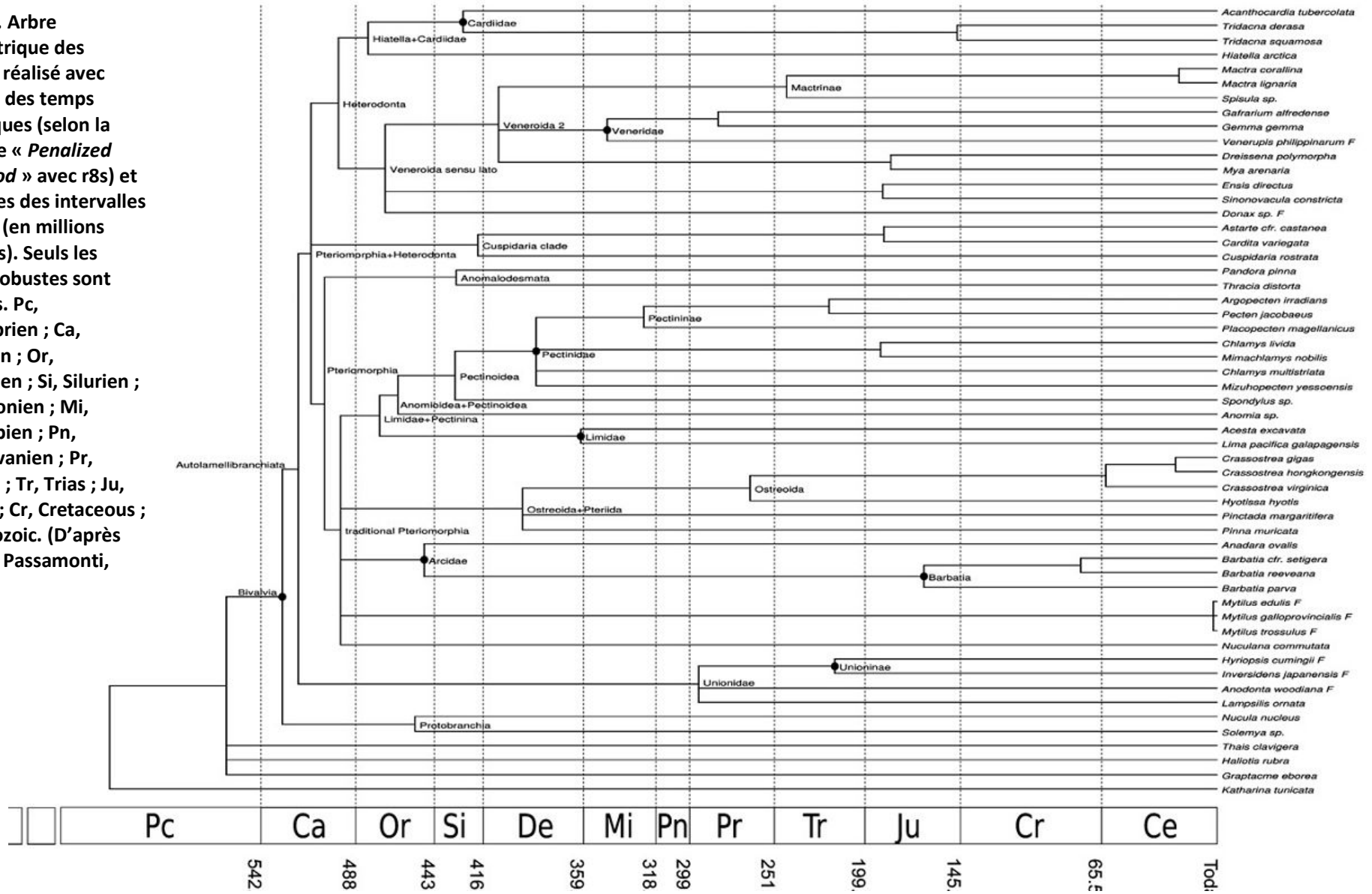
Les données phylogénomiques récentes ont remanié cette classification phylogénétique, avec entre autres le groupe des gastéropodes qui se retrouve évolutivement plus proche des bivalves et les céphalopodes plus proches des monoplacophores (Kocot *et al.* 2011; Smith *et al.* 2011).

Les bivalves sont parmi les organismes les plus communs des environnements marins. Ils représentent une classe de mollusques aquatiques comprenant 12 000 espèces vivantes. Ils sont munis, comme leur nom l'indique, d'une coquille à deux valves. Ils sont caractérisés par la disparition de la tête, le manteau et la coquille entourant alors la totalité de l'animal et un pied

en forme de doigt. La classification des bivalves est en perpétuel remaniement, et celle adoptée par le *World Register of Marine Species* (WoRMS) en 2012 a été établie à partir de données moléculaires, anatomiques, morphologiques (des coquilles) ainsi que de données biogéographiques, paléobiogéographiques et stratigraphiques (Bouchet *et al.*, 2010). Dans cette classification, 324 familles sont reconnues, dont 214 connues uniquement à partir de fossiles et 110 qui ont encore des représentants aujourd'hui.

Le plus ancien fossile de bivalve remonte au début du Cambrien, il y a 530 millions d'années. Une phylogénie des bivalves, établie à partir de 4 gènes mitochondriaux, les petites sous-unités ribosomiques mitochondriales ADNr 12S et ADNr 16S, le gène codant la cytochrome c oxydase I (*COI*) et le cytochrome b (*cytb*) (Plazzi & Passamonti, 2010) a permis de calibrer dans le temps les évènements importants de l'histoire évolutive des bivalves. Les nœuds, dont la datation est la plus robuste, sont ceux des bivalves (530 Ma), des Arcidae (449,5 Ma), des Cardiidae (427,2 Ma), des Pectinidae (385,9 Ma), des Limidae (360,7 Ma), des Veneridae (345,3 Ma), des Unioninae (216,5 Ma) et des Barbatia (166,2 Ma) (Figure 4). Les espèces appartenant à chacune de ces classes présentent ensuite une diversité génétique qui leur est propre, et qui dépend de nombreux paramètres dont l'isolement géographique et les conditions environnementales.

Figure 4. Arbre ultramétrique des bivalves réalisé avec l'échelle des temps géologiques (selon la méthode « *Penalized Likelihood* » avec r8s) et les limites des intervalles majeurs (en millions d'années). Seuls les nœuds robustes sont nommés. Pc, Précambrien ; Ca, Cambrien ; Or, Ordovicien ; Si, Silurien ; De, Devonien ; Mi, Mississipien ; Pn, Pennsylvanien ; Pr, Permien ; Tr, Trias ; Ju, Jurassique ; Cr, Crétacé ; Ce, Cénozoïque. (D'après Plazzi et Passamonti, 2010)



I.2 Le cas particulier des bénitiers (Tridacnidae)

I.2.1 Classification et datation

Selon le *World Register of Marine Species*, les bénitiers appartiennent à la sous-classe des Heterodonta, à l'ordre des Veneroidea et à la famille des Tridacnidae (<http://www.marinespecies.org>). Cette dernière compte 2 genres : *Hippopus* et *Tridacna*. Le genre *Hippopus* comporte deux espèces, *Hippopus hippopus* (Linnaeus, 1758), et *Hippopus porcellanus* (Rosewater J., 1982). Le genre *Tridacna* comptait 8 espèces jusqu'à récemment : *Tridacna gigas* (Linnaeus, 1758), *Tridacna maxima* (Röding, 1798), *Tridacna derasa* (Röding, 1798), *Tridacna crocea* (Lamarck, 1819), *Tridacna squamosa* (Lamarck, 1819), *Tridacna teveroa* (Lucas J.S., 1991), *Tridacna rosewateri* (Sirenko BI, 1991) et *Tridacna costata* (Richter *et al.*, 2008). Une nouvelle espèce, proche de *T. crocea* et *T. squamosa*, vient d'être décrite (Huelsenken *et al.*, 2013). Une autre, *Tridacna noae*, déjà décrite en 1965 (Rosewater, 1965), avait été regroupée avec *T. maxima* lors d'une révision plus récente, avant d'être reproposée en tant qu'espèce distincte (Su *et al.*, 2014), portant ainsi à 12 le nombre d'espèces de Tridacnidae décrites à ce jour. *Tridacna teveroa* a été décrit à partir d'un individu vivant en 1991, mais il avait déjà été décrit auparavant, uniquement à partir de sa coquille, et identifié alors en tant que *Tridacna mbalavuana* (Ladd, 1934). De même, *T. costata*, décrit en 2008 à partir d'individus de la mer rouge, avait déjà été décrit lors de la « Pola » expédition qui avait eu lieu en mer rouge en 1899, et avait été alors nommé *T. squamosa* (Huber, M., 2011; Sturany R., 1899).

Une première classification phylogénétique, basée sur l'ADN mitochondrial *16S*, a été proposée en 1999 (Schneider and Foighil, 1999). Cette classification a permis de déterminer les liens de parenté de 8 espèces de Tridacnidae. Les deux espèces du genre *Hippopus* sont séparées des 6 espèces du genre *Tridacna* qui sont classées dans deux clusters distincts, le premier comprenant *T. gigas*, *T. derasa* et *T. teveroa*, et le second comprenant *T. maxima*, *T. squamosa* et *T. crocea* (Figure 5). En 2008 une nouvelle espèce de Tridacnidae, *T. costata*, est identifiée en mer rouge (Richter *et al.*, 2008a). L'analyse phylogénétique réalisée à partir du même marqueur que celui utilisé par Schneider & Foighil, l'ADN mitochondrial *16S*, a révélé que *T. costata* est plus proche du cluster formé par *T. maxima*, *T. squamosa* et *T. crocea* que celui de *T. gigas*, *T. derasa* et *T. teveroa*. La classification phylogénétique la plus récente (Huelsenken *et al.*, 2013), établie à partir des séquences mitochondriales concaténées (*16S* et *COI*), remet en cause cette classification puisque *T. maxima* est plus proche de *T. costata* que de *T. squamosa* et *T. crocea*, qui se retrouvent proches de la nouvelle espèce décrite par Huelsenken (2013) (Figure 6). L'espèce

T. rosewateri, pourtant décrite depuis 1991 (Sirenko & Scarlato, 1991), ainsi que *T. noae*, n'apparaissent dans aucune de ces classifications.

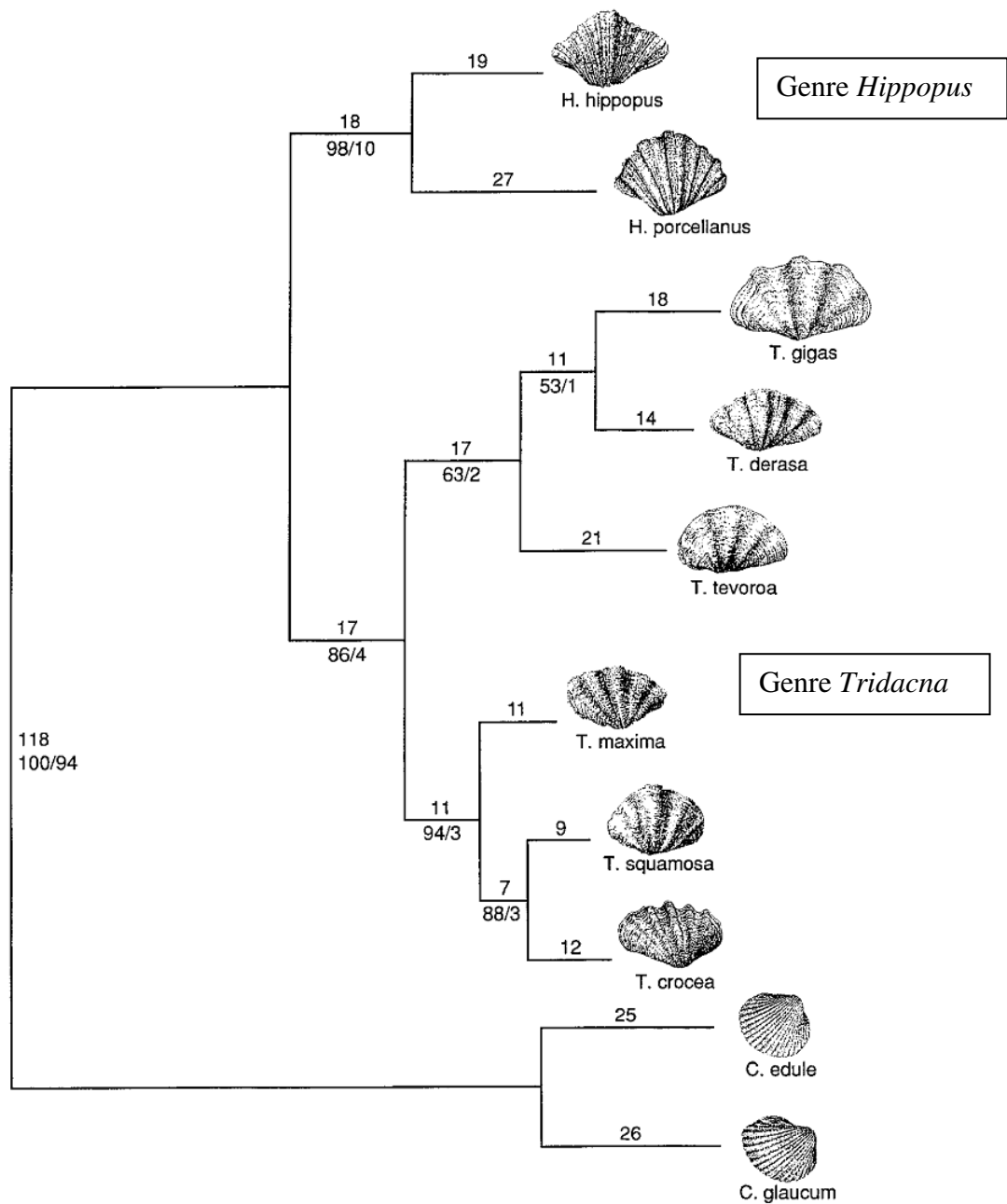


Figure 5. Classification phylogénétique de 8 espèces de Tridacnidae établie grâce au marqueur mitochondrial 16S. C : *Cerastoderma*, H : *Hippopus*, T. : *Tridacna*. (D'après Schneider & O' Foighil, 1999)

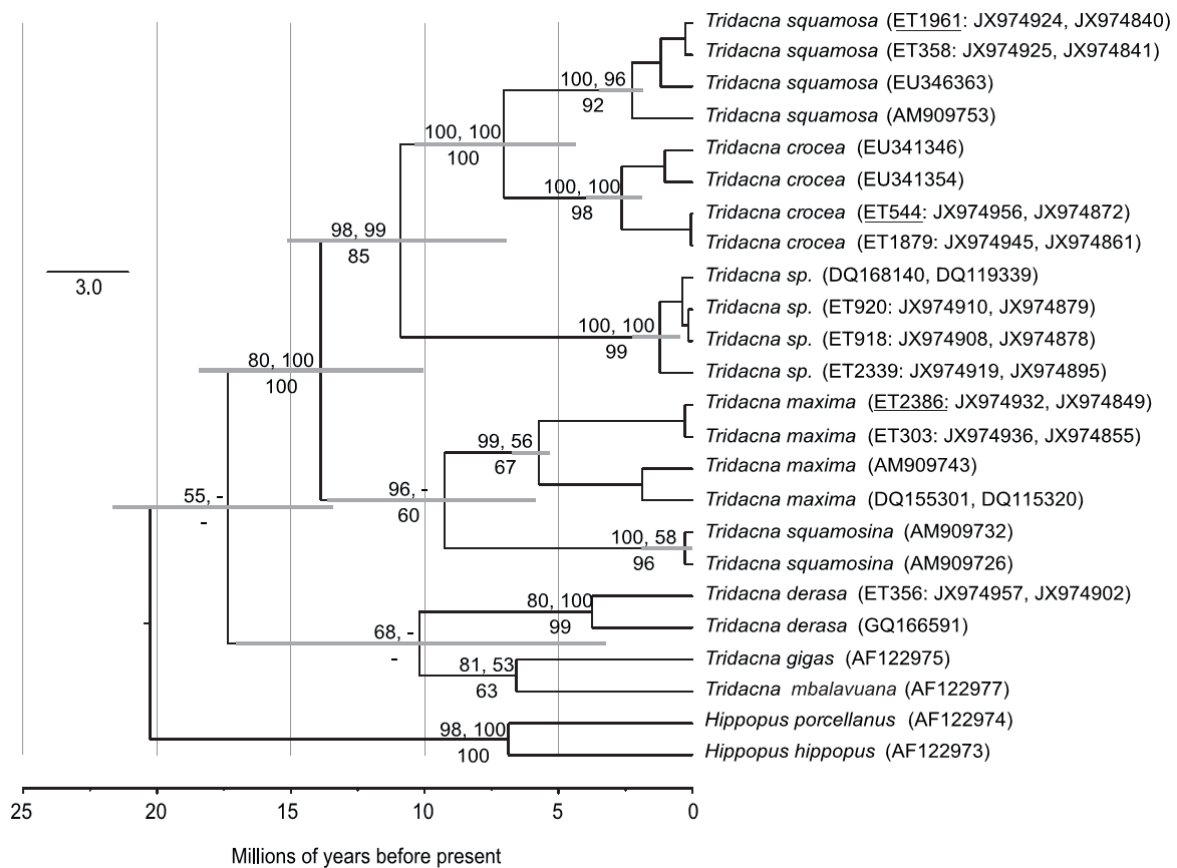


Figure 6. Arbre phylogénétique de 10 espèces de Tridacnidae basé sur des séquences d'ADN mitochondrial (*COI* et *16S*) concaténées et réalisé avec le logiciel StarBEAST selon un modèle « *birth-death* ». Les probabilités Bayésiennes postérieures issues de StarBEAST et MrBayes se trouvent au dessus des branches, et les valeurs de bootstrap RAxML en dessous. Les individus indiqués avec deux références Genbank, possèdent à la fois les séquences *COI* et *16S*. (D'après Huelsenken, 2013)

Ainsi, l'histoire évolutive ancienne des bivalves est toujours soumise à débat. Les phylogénies établies ont été depuis peu largement remaniées suite aux études basées sur l'ADN. Afin d'améliorer les études phylogénétiques sur les bivalves, plusieurs essais d'études utilisant à la fois les données morphologiques et moléculaires ont été proposées (Giribet et Wheeler 2002; Giribet et Distel 2003; Harper *et al.*, 2006; Mikkelsen *et al.* 2006; Olu-Le Roy *et al.* 2007). Depuis, en accord avec Giribet et Distel (2003), il est admis que les données morphologiques sont adaptées à la résolution des nœuds profonds alors que les données moléculaires sont adaptées pour la datation des embranchements récents.

L'établissement d'une échelle des temps géologiques s'effectue grâce à des données de géochronologie relative (stratigraphie et paléontologie) et absolue (radiochronologie) (Harland *et al.*, 1990). L'observation de fossiles dans des couches stratigraphiques datées de façon relative et surtout absolue indique à quelle époque ces organismes étaient présents sur terre, et permet

ainsi d'estimer l'âge de leur apparition. Il est aujourd'hui possible de recouper des résultats phylogénétiques obtenus à partir de données moléculaires avec l'observation de fossiles dans certaines couches stratigraphiques, et d'estimer ainsi la datation de certains nœuds (Figure 7). Par exemple avec ces résultats, la divergence entre les espèces *T. squamosa* et *T. derasa* est estimée autour de 18 Ma.

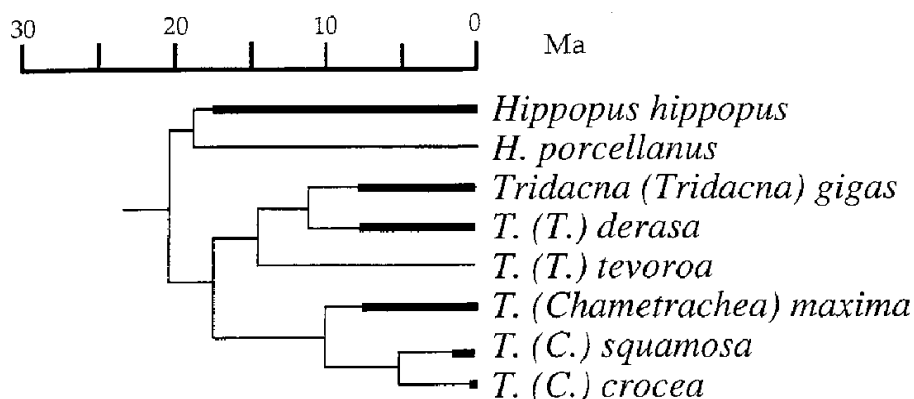


Figure 7. Recoupage des résultats phylogénétiques obtenus pour 6 espèces du genre *Tridacna* et 2 espèces du genre *Hippopus* à partir de séquences d'ADN mitochondrial 16S avec les données stratigraphiques sur les fossiles. L'échelle des temps, tirée de Harland *et al.* (1990), est en millions d'années avant le temps présent. L'observation stratigraphique de chaque espèce est représentée en trait gras. (D'après Schneider et O'Foighil, 1999)

Une phylogénie établie à partir d'un plus grand nombre d'espèces de Tridacninae (Harzhauser *et al.* 2008) confirme les résultats de Schneider et O'Foighil (1999). La chronologie établie à partir des publications de Schneider et Harzhauser (Harzhauser *et al.* 2008; Schneider et O'Foighil 1999) a été reprise par Huelsken (Huelsken *et al.*, 2013) afin de calibrer dans le temps ses résultats obtenus à partir de séquences mitochondriales (Figure 6). La divergence entre les espèces *T. squamosa* et *T. derasa* est alors à nouveau estimée autour de 18 Ma. Le clade comprenant *T. maxima* s'est séparé des autres clades il y a 14 Ma, et *T. maxima* s'est séparé de *T. costata* il y a 9 Ma.

1.2.2 Distribution et état des stocks

1.2.2.1 La répartition mondiale des bécards

Les bécards sont très prisés pour le marché de l'aquariophilie, ils font partie des 10 invertébrés les plus exploités ornementalement dans le monde (Tisdell, 1992; Wabnitz *et al.*, 2003; Othman *et al.*, 2010) mais aussi exploités à des fins agro-alimentaires avec leur chair (manteau, muscles et gonades) ou pour leur coquille qui est également très prisée pour réaliser des objets de décoration (Usher, 1984). Ces différents marchés lucratifs ont amené à une surexploitation des stocks de bécards sauvages (Lucas, 1994), qui peut avoir des conséquences importantes sur la dynamique des populations (Planes *et al.*, 1993, Planes et Laurent, 2004). Comme c'est le cas pour de nombreux organismes marins, le nombre de bécards a été ainsi grandement réduit à cause de la surpêche mais aussi par la diminution des habitats (CITES, 2004a, b, c et d; Othman *et al.*, 2010). De plus, ils sont sensibles au blanchissement induit par le stress, souvent associé à l'augmentation de la température des océans (Leggat *et al.*, 2003; Norton *et al.*, 1995; Othman *et al.*, 2010). Ils sont également affectés par l'augmentation de la sédimentation et de la pollution (Roberts *et al.*, 2002). Selon la liste rouge de l'IUCN (<http://www.iucnredlist.org>), 8 espèces de bécards sont identifiées comme « *Lower Risk Conservation Dependant* » (dont *T. maxima*) ou « *Vulnerable* », et *T. crocea* est classé comme « *Lower Risk Least Concern* », depuis 1996 (Othman *et al.*, 2010). Concernant les espèces découvertes après cette classification, pour *T. costata*, les auteurs (Richter *et al.*, 2008) proposent de l'inscrire dans la catégorie « *Critically endangered* », et pour la dernière espèce décrite (Huelsenken *et al.*, 2013), aucune suggestion ne semble avoir été énoncée pour l'instant. La plupart des bécards sont classés dans l'annexe II de la « *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* » (CITES), qui regroupe les organismes pas nécessairement menacés d'extinction, mais dont l'exploitation doit être contrôlée afin d'interdire une utilisation incompatible avec leur survie (CITES 2008), et leur transport à l'international doit obligatoirement faire l'objet d'un permis (Othman *et al.*, 2010). En revanche cette convention ne concerne pas l'exploitation locale, qui est donc autorisée.

Les bécards vivent au niveau des rivages de faible profondeur et sur les récifs situés entre 30°E et 120°W et entre 36°N et 30°S. Leur répartition n'est pas équitable, avec la diversité la plus importante au centre de l'Indo-Pacifique (Spalding *et al.* 2007). Les populations de bécards de certains récifs peuvent dépasser 500 individus par mètre carré en Polynésie française (Andrefouët *et al.*, 2005) ou à Taiwan (Su *et al.*, 2014). A l'opposé, certaines îles comme les Philippines, le Vanuatu et la République des Kiribati présentent des densités inférieures à 1 individu par hectare. *T. maxima* est l'espèce qui présente la distribution la plus vaste : son aire

de répartition englobe celles de toutes les autres espèces de bécotiers (Figure 8). En revanche, les espèces *T. costata*, *T. Rosewateri*, *T. tevoroa* et *H. porcellanus* présentent les aires de répartition les plus restreintes (Othman *et al.*, 2010). L'abondance de chaque espèce sur les sites étudiés est également un paramètre important. Par exemple 7 espèces différentes ont été identifiées au Sud-Est de l'Asie, mais de nombreuses populations sont aujourd'hui en déclin, voir éteintes, à priori à cause de la surexploitation. De même, on dénombre 6 espèces en Malaisie, mais seul *T. crocea* a une population stable (Tan & Zulfigar, 2003). *T. gigas* est probablement éteint dans la péninsule Malaisienne alors qu'*H. porcellanus* et *T. derasa* sont restreints à l'Est de la Malaisie (Tan & Zulfigar, 2003). A Singapour, *H. hippopus* et *T. maxima* sont éteints, et *T. squamosa* et *T. crocea* sont présents seulement en très petit nombre (Guest *et al.*, 2008). Des 3 espèces de bécotiers trouvés en Thaïlande, *T. squamosa* et *T. maxima* sont considérés comme « rares » (Thamrongnavasawat *et al.*, 2001). On trouve des bécotiers dans toute l'Océanie, même si leur diversité y est faible (Othman *et al.*, 2010). Cette diversité diminue au fur et à mesure qu'on s'éloigne de l'Australie : 7 espèces sont présentes près de l'Océanie alors qu'on ne retrouve que *T. maxima* à la limite Sud-Est de la distribution des bécotiers dans le Pacifique. *T. derasa*, *T. gigas* et *T. squamosa* ont été introduits par l'Homme à Hawaï et en Micronésie (Wells, 1996). *T. tevoroa* présente une aire de répartition limitée à Fidji et aux Tonga (Klump et Lucas, 1994). L'océan indien comprend 4 espèces de bécotiers : *T. maxima*, *T. squamosa*, *T. costata* et *T. Rosewateri*. *T. costata* se trouve uniquement en mer rouge (Richter *et al.*, 2008a) et *T. Rosewateri* uniquement à l'île Maurice (CITES, 2008). Le Japon représente la limite la plus au Nord de la distribution des bécotiers, avec 4 espèces présentes : *T. crocea*, *T. maxima*, *T. squamosa* et *H. hippopus*.

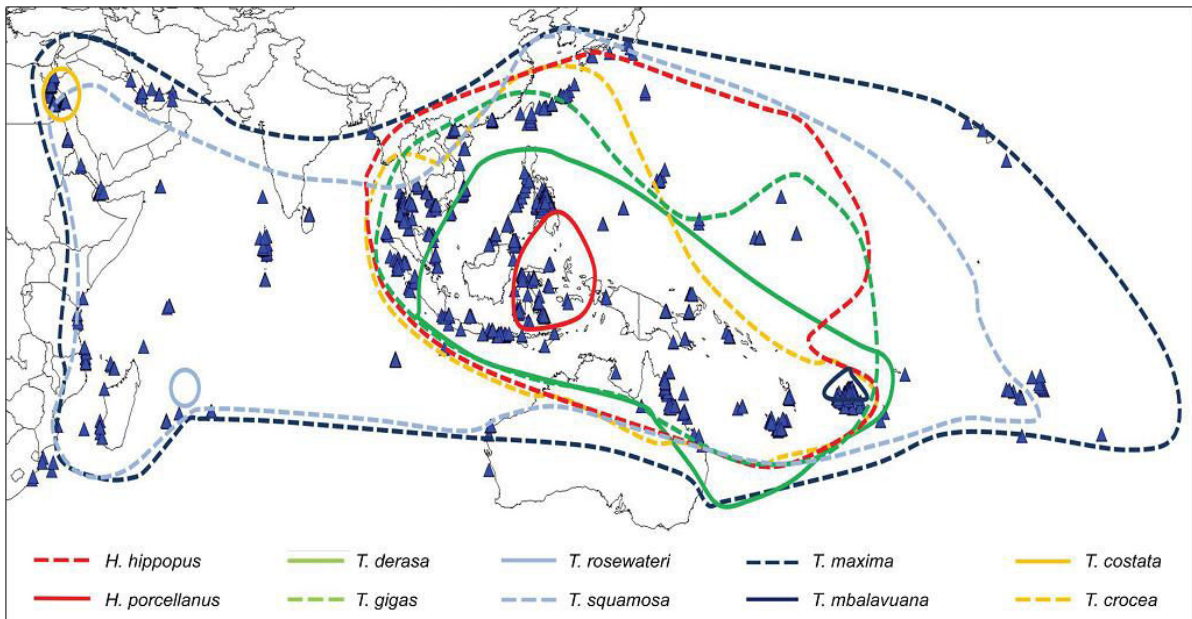


Figure 8. Répartition mondiale des différentes espèces de béditiers. Les triangles bleus représentent les observations de béditiers n'allant pas jusqu'à la détermination de l'espèce. *T.* = *Tridacna*, *H.* = *Hippopus*. (D'après Othman *et al.*, 2010)

Les densités de béditiers sont faibles dans de nombreuses régions, certainement à cause de l'augmentation de la pression de pêche et de la destruction des habitats, liée essentiellement à l'augmentation démographique. Dès 1987, Heslinga et Fitt suggéraient aux communautés locales de développer la culture de béditiers pour contrebalancer la pêche de subsistance. De nombreux pays, incluant les Tonga, Palau, Fidji, les îles Salomon, les îles Cook et la Polynésie française ont essayé de contrer le déclin des populations de béditiers par le développement de l'aquaculture assorti de programmes de réensemencements (Bell *et al.* 1999; Clarke *et al.* 2003; Lucas 1994; Anonyme 2006).

Les efforts de surveillance sont limités et les mesures pour protéger les béditiers réintroduits sont souvent peu respectées. Néanmoins, le *Marine Science Institute* (MSI) de l'Université des Philippines a depuis longtemps mis en place un élevage de béditiers conséquent qui lui permet de restaurer les stocks épuisés depuis 20 ans. Les béditiers sont adaptés à l'aquaculture, ce qui offre l'opportunité de maintenir les stocks, mais la survie des béditiers réensemencés nécessite l'investissement des communautés locales (Gomez et Mingoa-Licuanan, 2006) et le réensemencement des béditiers peut augmenter les risques sanitaires. De plus, la mise en place d'élevages de béditiers peut entraîner une homogénéisation du patrimoine génétique (Benzie *et al.* 1995; Bell *et al.* 1999).

1.2.2.2 Le cas particulier de la Polynésie française

Le triangle de corail, situé au niveau de la région Indo-Pacifique, constitue un « *hotspot* » de biodiversité (Veron *et al.*, 2009) à partir duquel la biodiversité diminue d'ouest en est, comme par exemple la diversité corallienne (Figure 9). Concernant les bédouilles, 7 espèces différentes sont présentes en Malaisie (*T. maxima*, *T. squamosa*, *T. crocea*, *T. gigas*, *T. derasa*, *Hippopus hippopus* et *Hippopus porcellanus*), alors qu'au bout du gradient de biodiversité, en Polynésie française, seulement 2 espèces (*T. maxima* et *T. squamosa*) sont présentes (Ahmad Syukri Bin Othman *et al.*, 2010).

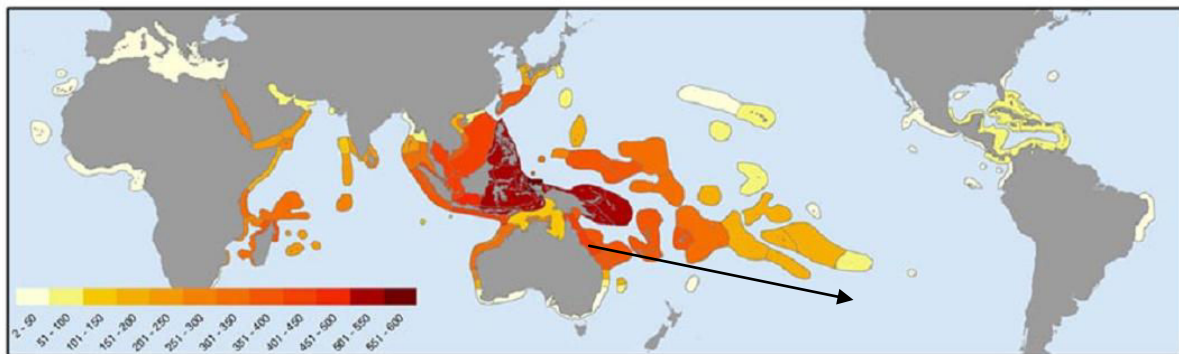


Figure 9. Variation du nombre d'espèces de coraux dans le monde mettant en évidence le gradient de biodiversité présent dans l'océan Pacifique que l'on retrouve aussi bien chez les espèces animales que végétales, terrestres que marines. Flèche = gradient de biodiversité décroissant. (D'après Veron *et al.*, 2009)

En plus d'être située à la fin du gradient de biodiversité, la Polynésie française est relativement isolée des autres pays : elle se trouve à 7 500 km à l'Ouest du Chili et 6 000 km à l'Est de l'Australie. Elle est composée d'un ensemble de 118 îles (comprenant des îles hautes et des atolls) situées dans le Pacifique sud, regroupées en 5 archipels, et couvrant un espace aussi grand que l'Europe. Sa surface marine est de 5 500 000 km² et sa surface terrestre d'environ 3 500 km². Les îles sont entourées d'un lagon, excepté dans l'archipel des Marquises qui possède quelques massifs de coraux mais pas de vraie barrière récifale. Elles sont séparées les unes des autres par des eaux profondes (plus de 2000 mètres de profondeur) et les courants locaux appuient encore davantage cette discontinuité et cette fragmentation (Rougerie, 1995).

La géomorphologie des îles de Polynésie française se définit en fonction de leur histoire géologique, et essentiellement de leur âge, puisque plus une île s'éloigne du point chaud dont elle provient, plus elle subit la subsidence et évolue vers le stade atoll. L'histoire géologique de la Polynésie française est découpée en plusieurs épisodes puisqu'elle se situe sur la plaque Pacifique qui se déplace vers le Nord- Ouest d'environ 11 cm/an (Dupon *et al.*, 1993) et qui possède plusieurs points chauds dont l'activité pouvait être séparée de plusieurs dizaines de

millions d'années (Figure 10). Trois de ces points chauds sont à l'origine des alignements d'îles de la Polynésie française et ont défini les différents archipels qui la composent. Le plus ancien est l'archipel des Tuamotu, formé entre -60 et -40 Ma (excepté l'île de Mehatia, âgée de 30 000 ans), puis l'archipel des Australes vers -10 Ma, les Gambier vers -5 Ma, et enfin la Société entre -4,5 et -0,5 Ma. Parmi les 14 îles qui constituent l'archipel de la Société, Tahiti est la plus grande et une des plus récentes puisque très proche du point chaud qui a donné naissance aux îles de cet archipel. L'activité volcanique conséquente qui a donné naissance à Tahiti est estimée entre -1,4 et -0,5 Ma (Hildenbrand, 2002). On distingue ainsi les îles plus récentes, hautes, dans les archipels de la Société, des Australes et des Gambier, et les atolls situés essentiellement aux Tuamotu (n = 77, soit presque 20% des atolls du monde), archipel le plus ancien de Polynésie française. Les atolls sont cependant présents également dans l'archipel de la Société (n = 5) et celui des Australes (n = 1) (Anonyme, 2010). Les Marquises ne sont pas prises en compte dans le contexte de cette étude puisque c'est le seul archipel de Polynésie française dans lequel on ne trouve pas de bénéitiers.

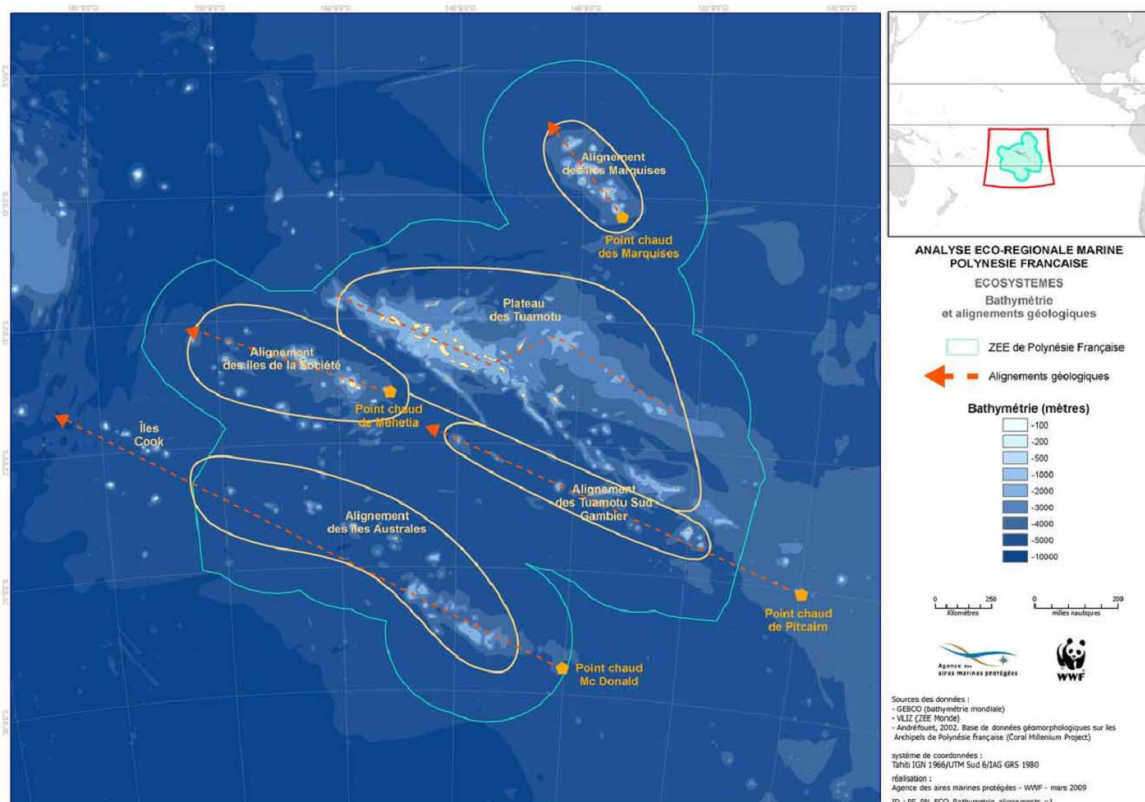


Figure 10. Bathymétrie et histoire géologique de la Polynésie française. (D'après Anonyme, 2010)

Les atolls peuvent présenter des caractéristiques différentes en fonction du nombre de passes présentes, qui déterminent l'ouverture sur l'océan, et donc les courants lagonaires et les

échanges entre le lagon et l'océan (Figure 11). C'est dans les atolls et plus particulièrement les lagons que se trouve la majorité des zones d'exploitation des bivalves, dont les bénitiers.

Ainsi, chaque île de Polynésie française présente des caractéristiques uniques : localisation géographique, géomorphologie de l'île, pression anthropique et densité de bénitiers. La pression anthropique exercée sur l'écosystème lagonaire est caractérisée par le nombre d'habitants, d'industries, d'exploitations agricoles et de complexes hôteliers. Le dernier recensement de la population humaine effectué en Polynésie française indique que 75% de la population (270 000 habitants) est concentrée sur Tahiti (68%) et Moorea (6%) (ISPF, 2012).

Deux espèces de bénitiers ont été identifiées en Polynésie française : *T. maxima* et *T. squamosa*, au niveau de la Société, des Tuamotu, des Gambier et des Australes (Gilbert *et al.*, 2007; Andrefouët *et al.*, 2014). L'espèce *T. maxima* mesure jusqu'à 35 cm et sa durée de vie peut atteindre cinquante ans, mais la taille moyenne constatée varie de 10 à 20 cm pour une longévité de 10 à 20 ans en fonction des milieux. On les trouve dans les lagons, à de faibles profondeurs (inférieures à 10 m), au niveau de la partie externe des récifs frangeants, des platiers et récifs barrière, ainsi que sur le tombant des pinacles (Richard, 1982). Ils sont cependant très rares sur la pente externe des récifs barrière.

Son abondance est très hétérogène au sein des îles de Polynésie française. Dans certaines îles des Australes (Raivavae et Tubuai) et surtout dans les atolls fermés des Tuamotu de l'Est (Fangatau, Fakahina, Tatakoto, Pukarua, Reao, Napuka, etc), *T. maxima* est l'espèce dominante du lagon (Anonyme 2006, Salvat, 1972; Andrefouët *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2006, 2007). Dans de nombreuses îles, leur densité reste particulièrement élevée et largement supérieure à celle de toute la région Indo-Pacifique. Des données de télédétection associées à des observations *in situ* ont permis d'estimer les populations de bénitiers dans plusieurs îles : 544 individus par m² ont été observés à Tatakoto (Gilbert *et al.*, 2005) avant l'épisode récent de mortalité massive (Andrefouët *et al.*, 2013), et respectivement 224 et 236 individus par m² à Reao (Salvat 1972; Gilbert *et al.*, 2005) et à Fangatau (Andrefouët *et al.*, 2005).

Les caractéristiques des populations de bénitiers et leur dynamique sont très différentes d'une île à une autre (Anonyme, 2010). Au niveau des Tuamotu, les populations fonctionnent en système hydrodynamique relativement fermé. Elles sont fragiles car sensibles aux périodes de calme et d'absence de houle pendant lesquelles les apports venant de l'océan sont très limités. Les individus s'y reproduisent toute l'année. La structure des peuplements est différente d'un atoll à l'autre : à Tatakoto, où les densités étaient les plus élevées de Polynésie française, les individus étaient majoritairement de petite taille (94% des individus de taille inférieure à 12 cm). Par opposition, à Fangatau, les densités sont plus faibles mais les individus plus grands (23% des

individus de taille supérieure à 12 cm, contre 6% à Tatakoto). Ces deux îles possèdent des accumulations structurelles de coquilles connues sous le nom polynésien de « mapiko » (Figure 12). Au niveau des Australes les populations fonctionnent en système hydrodynamique ouvert (présence de plusieurs passes), leur croissance est plus lente et leur reproduction est saisonnière (Figure 11), certainement en raison des températures plus basses (23°C : www.guida-polinesia.com/fr/polynésie_française/iles_australes/climat.html) dans cette région pendant l’hiver austral. A Tubuai, la biomasse de bénitiers est particulièrement importante et 64% des individus présentent une taille supérieure à 12 cm (Anonyme, 2010). Contrairement à ce qui était énoncé lors des observations de densités de bénitiers impressionnantes aux Tuamotu (Salvat, 1967, 1970), ces fortes densités ne semblent pas inféodées uniquement aux seuls lagons d’atolls fermés, puisque des densités importantes ont également été observées dans plusieurs îles hautes, sans passes, comme Tubuai et Raivavae (Gilbert *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2005, 2006), îles qui disposent d’un grand lagon avec de nombreux « motu ». Au final, il semblerait que cette hétérogénéité de densité des populations de bénitiers soit le résultat de conditions environnementales différentes qui peuvent varier au cours du temps (Planes et Laurent, 2004), et également, de l’impact de la collecte locale qui, placée à l’échelle de plusieurs générations, peut avoir modifié la dynamique des populations de bénitiers (Planes *et al.*, 1993).

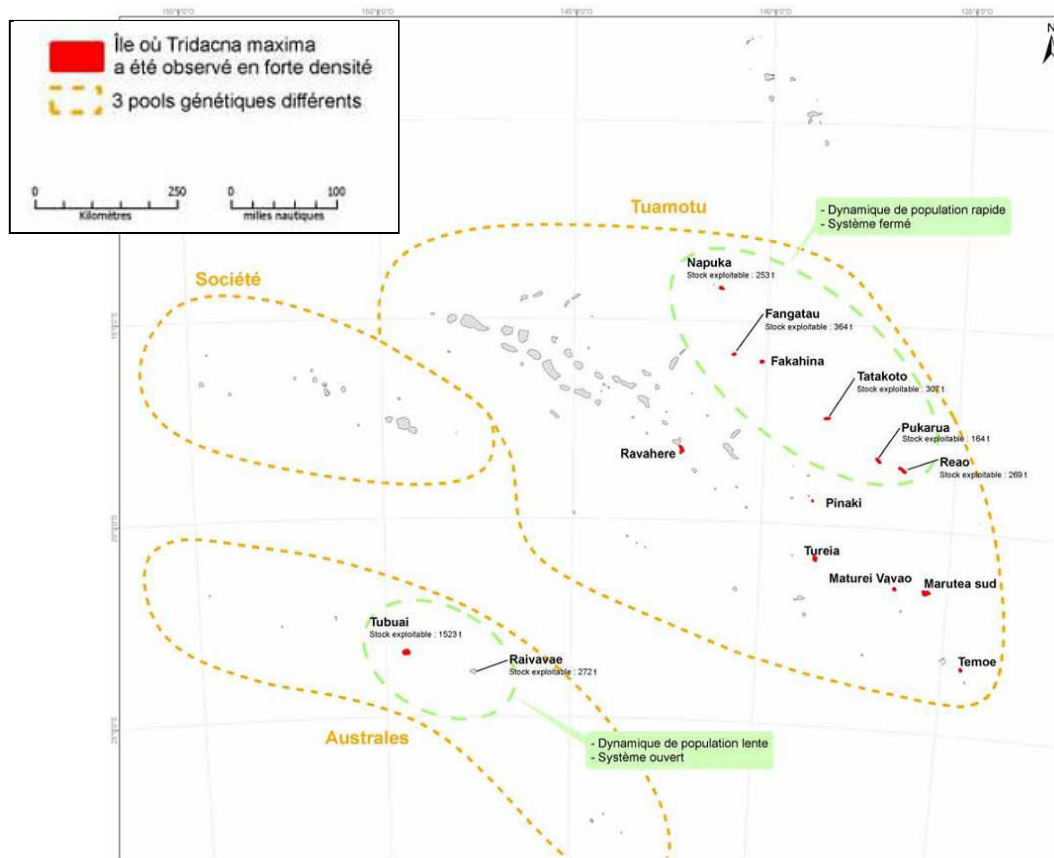


Figure 11. Localisation et caractéristiques des stocks de bénitiers. (D’après Anonyme 2010)



Figure 12. Photo d'un « mapiko » de Tatakoto. © Yannick Chancerelle, CRIOBE

L'espèce *T. maxima* est inscrite dans l'annexe II de la Convention de Washington depuis 1985, son transport et son commerce international sont ainsi soumis à des autorisations délivrées par la CITES. Elle est également inscrite sur la liste de l'UICN depuis 1996, dans la catégorie « *Lower risk/Conservation dependant* » (www.iucnredlist.org). En Polynésie française, face à leur exploitation massive (50 tonnes de chair en 2002, Anonyme 2002, 70 tonnes en 2013 d'après la Direction des Ressources Marines et Minières), les autorités locales et spécialistes des récifs coralliens ont adopté dès 2001 des mesures combinant études scientifiques et régulation du commerce afin d'avoir une gestion sur le long terme de cette ressource. La mise en place du programme « Bénitier » comprend des travaux portant sur des essais de collectage, d'élevage, de transport et de réensemencement, ainsi que des études des stocks (IRD-UPF), de la dynamique des peuplements et des pêcheries (IRD-ENSAR et UPF) et une étude de génétique (CNRS-EPHE-UPVD). En Polynésie française, un arrêté datant de 1988 (délibération n° 88-184/AT du 08/12/1988) interdit la pêche de bénitiers de taille coquillère inférieure à 12cm, aussi bien pour le commerce que pour la consommation personnelle, dans le but de permettre aux organismes d'atteindre la maturité sexuelle et de se reproduire. Comme le renouvellement des stocks ne peut plus s'effectuer aujourd'hui de façon naturelle, des conventions établies avec le Secrétariat de la Communauté du Pacifique (SPC), l'Agence française de développement (AFD) et la Direction des Ressources Marines et Minières (DRMM) permettent de financer une étude visant à rassembler les données économiques nécessaires au développement de la filière bénitier (Anonyme, 2013).

Etant donné que la Polynésie française dispose de stocks de bécards recensés dont l'abondance, le recouvrement et les densités sont les plus importants des récifs coralliens de la planète (Gilbert *et al.*, 2006), et que les études locales sont principalement axées sur le suivi et l'entretien des stocks, cela en fait un lieu d'étude privilégié de la diversité génétique de l'espèce *T. maxima*.

1.2.3 Diversité génétique des bécards dans différents contextes géographiques et géomorphologiques

1.2.3.1 En région Indo-Pacifique et en Mer Rouge

L'échange d'individus entre populations dans un contexte spatial et temporel détermine la connectivité d'une espèce (Lowe et Allendorf, 2010; Palumbi, 2003; Lemer, 2010). La connectivité génétique représente l'étude des flux géniques entre populations et leurs effets sur les processus évolutifs au sein de ces populations (Waples et Gaggiotti, 2006; Lemer, 2010). La variabilité génétique des bécards est étudiée dans plusieurs régions depuis les années 1970, grâce aux marqueurs allozymiques. En ce qui concerne l'espèce *T. maxima*, dans le Pacifique centre et ouest, un haut niveau d'échange de gènes sur de longues distances (jusqu'à 5000 km) a été observé mais seulement dans les chaînes d'îles (Benzie et Williams, 1997). Le flux de gènes trouvé lors de cette étude, hautement directionnel, est décrit par les auteurs comme perpendiculaire aux courants actuels (Figure 13). Ce résultat est identique à ceux obtenus chez de nombreuses espèces comme les bivalves *T. gigas*, *T. derasa* et *Pinctada margaritifera* (Benzie et Williams, 1997; Benzie et Ballment, 1994). L'étude de populations de bécards de l'espèce *T. maxima* de la grande barrière de corail australienne, séparées de plusieurs milliers de km, a montré des variations génétiques réellement importantes pour des organismes marins (22 % d'hétérozygotie). Les résultats ont mis en évidence que des espèces vivant dans des environnements trophiques stables peuvent présenter une forte variabilité génétique (Campbell *et al.*, 1975), mais également que la différence génétique augmente en fonction de la séparation géographique (Benzie et Williams, 1992).

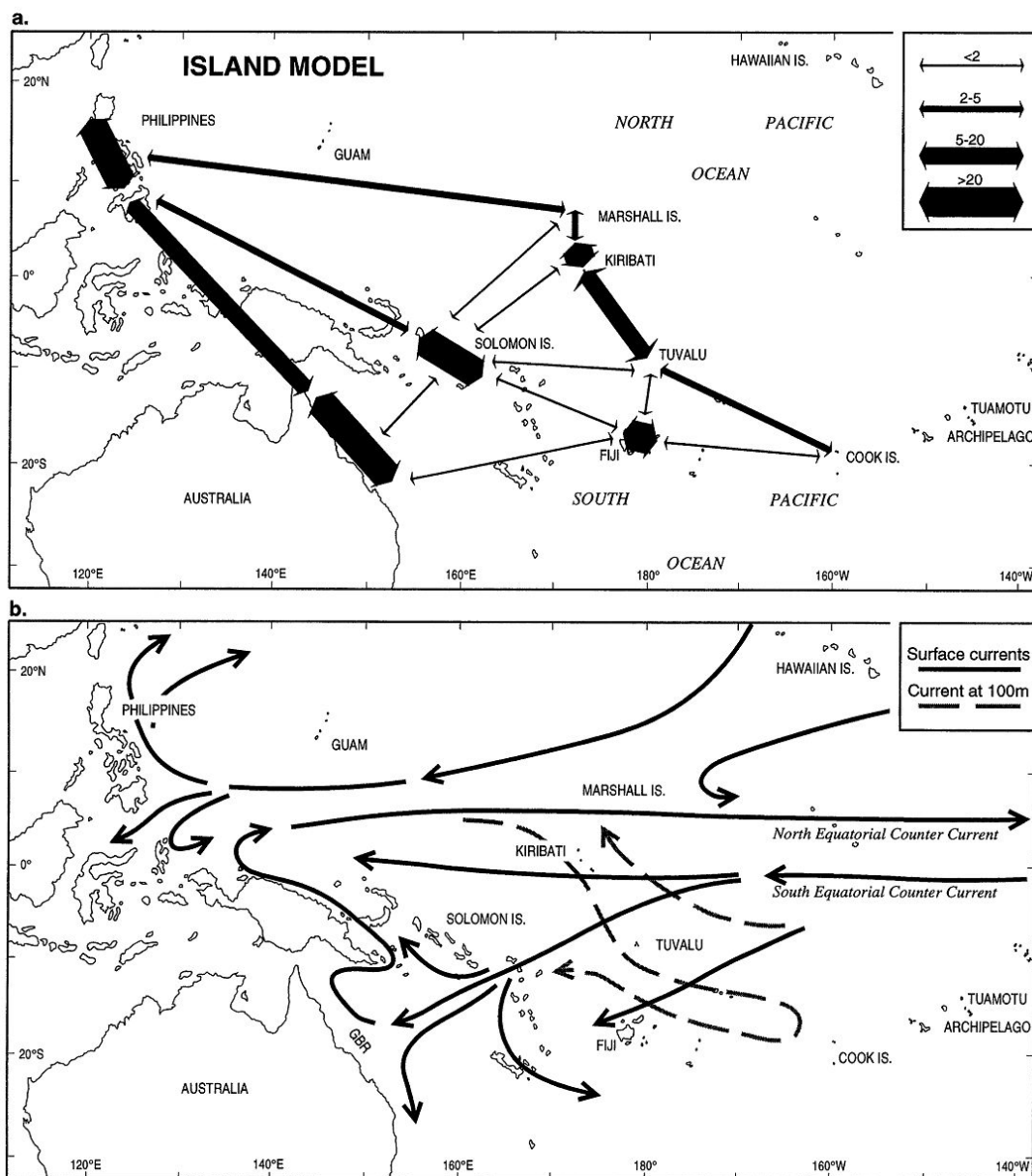


Figure 13. Cartes illustrant : (a) les flux génétiques (N_{em}) parmi les populations de *T. maxima* dans l'Indo-Ouest Pacifique, (b) les courants de surface océaniques actuels et ceux présents à 100m de profondeur dans le Pacifique central. (D'après Benzie et Williams, 1997)

L'étude de la connectivité des populations a connu un essor important, notamment dans le contexte des récifs coralliens, depuis le développement récent d'outils de génétique moléculaire tels que les marqueurs génomiques (Jones *et al.*, 2005), ce qui a permis notamment de compléter et de préciser les données précédemment obtenues sur les bénitiers avec les marqueurs allozymiques. Ainsi, la structure génétique de populations de *T. maxima* et *T. crocea* du triangle de corail a été étudiée à partir d'un fragment du gène de la cytochrome c oxydase1 (*COI*) (DeBoer *et al.*, 2008; Kochzius et Nuryanto, 2008; Nuryanto et Kochzius, 2009). Ces études ont montré une différenciation génétique significative parmi les sites dans le Pacifique Indo-

ouest et à travers l'archipel Indo-malais, indiquant un flux de gènes limité entre les populations de bénitiers. Chez *T. crocea*, huit clades différents ont été identifiés par Kochzius et Nuryanto (2008) dans l'archipel Indo-malais, alors que DeBoer et ses collaborateurs (2008) n'en ont identifié que trois. En dépit de cette différence quantitative, les auteurs s'accordent sur le fait que les clades sont spécifiques d'une localisation géographique, ce qui indique une forte structuration génétique et un flux de gènes limité. L'existence de 3 clades distincts parmi les individus de *T. crocea* de l'archipel Indo-Malais ainsi que leur répartition géographique sont également mis en évidence par des analyses phylogénétiques, réalisées avec le marqueur mitochondrial *16S* (DeBoer *et al.* 2008) et des marqueurs nucléaires (DeBoer *et al.*, 2014). Dans cette dernière étude, l'utilisation de microsatellites a confirmé l'existence d'un isolement par la distance.

Dans la même région, en ce qui concerne *T. maxima*, trois clades ont été identifiés (Nuryanto et Kochzius, 2009). Chaque clade est inféodé à une zone géographique particulière, le 4^{ème} clade de *T. maxima* étant limité aux individus de la Mer Rouge (Figure 14). Le clade 1 semble le plus répandu, il correspond au centre de la zone étudiée, autour de Sulawesi, où les courants ascendants et descendants engendrent certainement des flux géniques et augmentent ainsi la connectivité entre les individus.

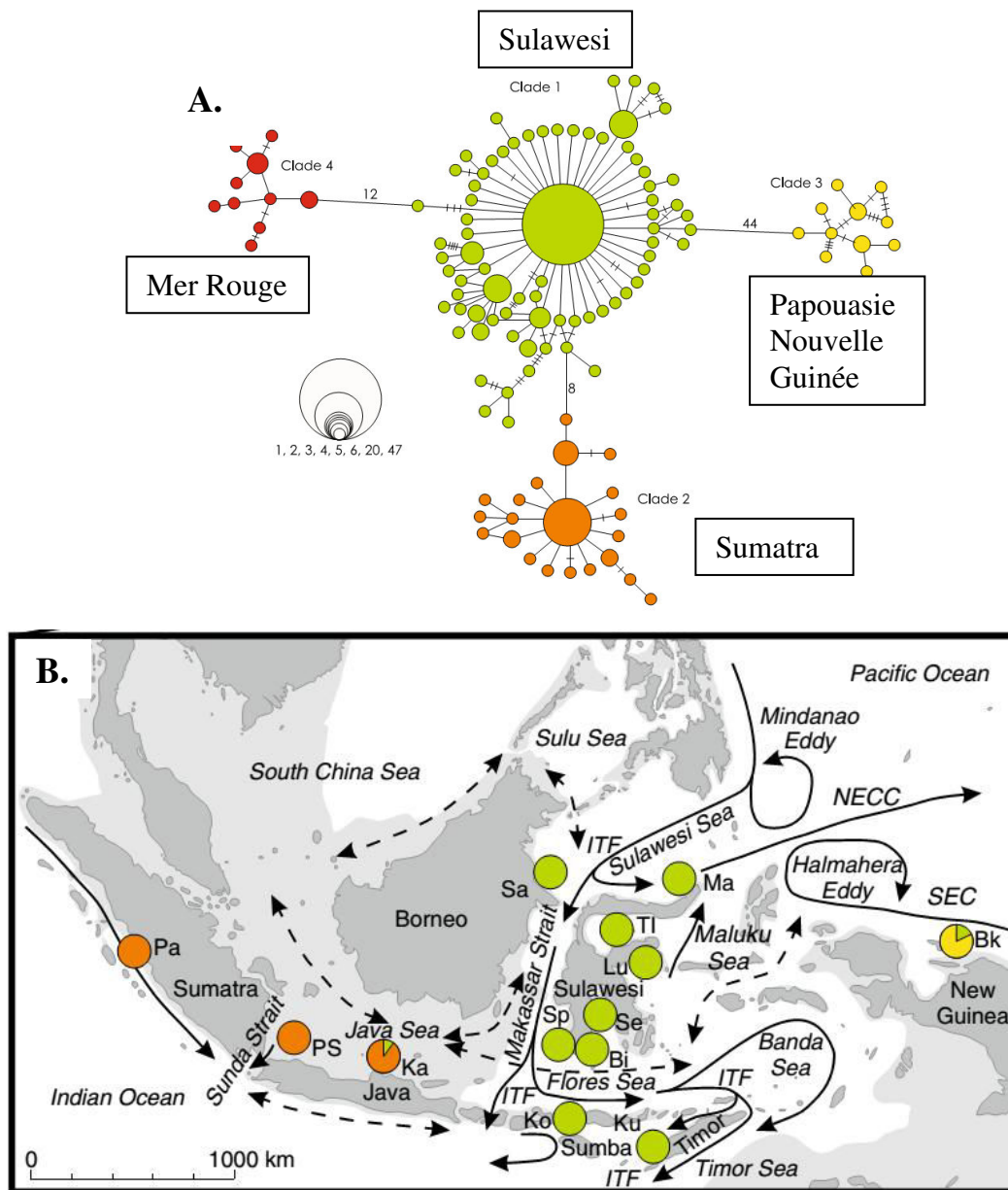


Figure 14. A : Réseau d'haplotypes représentant le lien entre les 117 haplotypes obtenus à partir de 211 séquences *COI* de *T. maxima* prélevés dans l'archipel Indo-Malais et la Mer Rouge. B : Carte de la répartition des clades dans l'Indo-Ouest Pacifique. Les flèches pleines représentent les courants dominants, les flèches discontinues les courants saisonniers. (D'après Nuryanto et Kochzius, 2009)

L'étude de la diversité génétique de *T. maxima* et *T. crocea* dans le Triangle de corail à partir de marqueurs mitochondriaux (*COI* et *16S*) et nucléaire (*ITS*) (Huelsken *et al.*, 2013) a renforcé le paradigme émergent de l'existence fréquente d'espèces cryptiques parmi les invertébrés marins, même parmi les taxons connus et étudiés. De plus, cette étude a permis d'ajouter des régions qui présentent une importante différenciation génétique à celles déjà identifiées dans l'Indo-Pacifique central. Enfin elle souligne comment les modèles phylogéographiques peuvent différer même entre espèces proches et sympatriques.

1.2.3.1 En Polynésie française

En Polynésie française, la structure génétique des populations de *T. maxima* a été étudiée à des échelles spatiales différentes : dans une île, entre les îles du même archipel et entre les archipels de la Société, des Tuamotu et des Australes (Laurent *et al.*, 2002; Planes et Laurent, 2004). Des différences génétiques significatives ont été observées seulement entre des populations d'archipels différents et la différenciation génétique était corrélée avec la séparation géographique. Cependant, ces résultats, basés sur l'étude des allozymes, n'ont été soutenus que par un locus sur les dix étudiés. Les auteurs pensent que la structure génétique peut s'expliquer par la sélection et que les facteurs sélectifs dépendent très probablement de l'habitat respectif de chaque archipel. Aucune étude s'appuyant sur les marqueurs mitochondriaux et nucléaires n'a été réalisée en Polynésie française à ce jour, ce type d'étude a donc été réalisée pour la première fois au cours de cette thèse.

II. Biologie et écologie des bivalves marins

II.1 Généralités sur les bivalves

Les bivalves possèdent une coquille composée de deux valves, articulées entre elles par une charnière et manœuvrées grâce aux muscles adducteurs (<http://www.mer-littoral.org>). Le pied très musclé sert à l'enfouissement (Figure 15). La tête se limite à la bouche et ils ne possèdent pas de radula. Ce sont des organismes filtreurs, Ils se nourrissent de micro-organismes, essentiellement du phytoplancton ou des détritits. L'eau chargée en particules nutritives et en dioxygène est pompée par le battement de millions de cils des branchies et pénètre par le siphon inhalant. Les particules sont triées au niveau des branchies, et les nutriments retenus sont envoyés vers la bouche. Ils passent alors dans l'estomac où une partie de la digestion est effectuée. Ensuite le contenu stomacal arrive dans l'intestin et les résidus sont transformés en fèces et expulsés par le siphon exhalant.

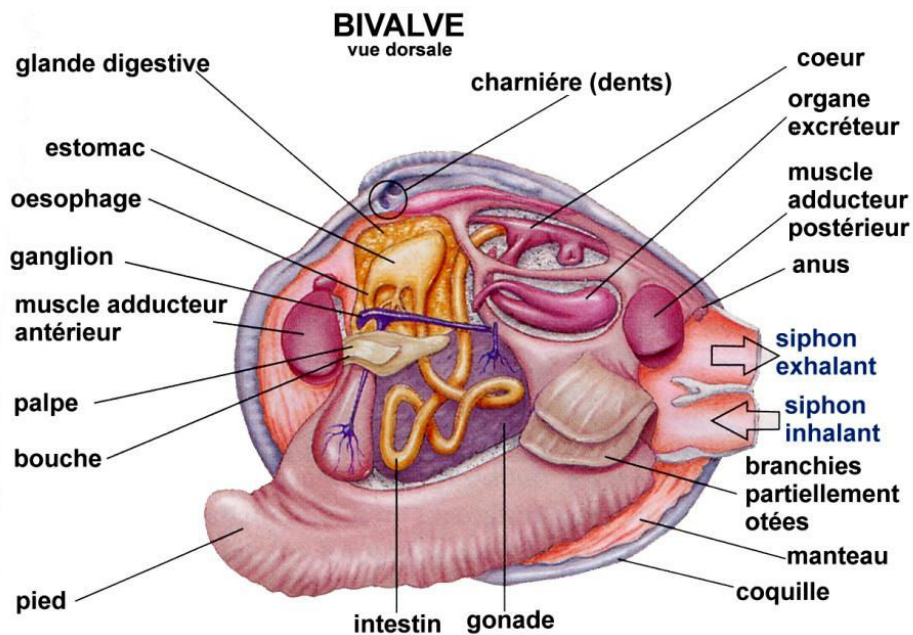


Figure 15. Schéma simplifié de l'anatomie des bivalves.

(<http://plongee.cours.free.fr/bio/mollusques.htm>)

Les bivalves sont capables de coloniser tous les substrats (www.mer-littoral.org). Sur les fonds durs, ils se fixent en cimentant une valve (huitres) ou en s'attachant à l'aide de leur byssus (moules, bénitiers). Ils peuvent s'enfouir dans les substrats meubles (palourdes) ou perforer le bois (tarets). Les espèces marines sessiles présentent une mobilité réduite en tant qu'adulte, mais environ 70% d'entre elles possèdent une larve pélagique (Mileikovsky, 1971) qui fournit une importante capacité de dispersion permettant de compenser les contraintes et les limitations liées à la vie adulte fixée. La dispersion des bivalves s'effectue donc au gré des courants lors de la phase larvaire mobile, dont la durée varie selon les espèces.

Parmi la classe des bivalves, seuls les Tridacnidae et deux espèces de Cardiidae, *Corculum cardissa* (Linnaeus, 1758) et *Fragum unedo* (Linnaeus, 1758) vivent en symbiose avec des organismes unicellulaires photosynthétiques du genre *Symbiodinium* (Dame, 2011). Cette association symbiotique est donc une particularité d'un tout petit nombre d'espèces de bivalves, et en particulier, les 11 espèces de bénitiers actuellement décrites.

II.2 Le cas particulier des bénitiers

II.2.1 Les bénitiers, organismes symbiotiques

Les bénitiers possèdent les caractéristiques classiques des bivalves et présentent la particularité d'avoir une coquille massive, épaisse, présentant de nombreuses ondulations (les côtes), ainsi qu'un manteau très développé. Avec leur grande taille (comprise à l'âge adulte entre 15 cm chez *T. crocea* et 120 cm chez *T. gigas*), la structure caractéristique de leur coquille et leur manteau coloré, les bénitiers sont des invertébrés iconiques des récifs coralliens. En effet, en plus de ses couleurs vives, le manteau arbore des motifs uniques qui lui confèrent un attrait visuel très prisé des plongeurs et des aquariophiles. La couleur du manteau est liée à la présence d'organes particuliers, les iridophores (Griffiths *et al.*, 1992).

Hermaphrodite protandre, la première étape de la reproduction du bénitier est l'émission du sperme qui a lieu toutes les 2 ou 3 minutes, puis environ une demi-heure après les ovocytes sont émis (Wada, 1954 ; Anonyme, 2006 ; observation personnelle). Après la fécondation et l'éclosion, la phase larvaire, mobile, dure 8 à 10 jours chez *T. maxima* (Jameson, 1976; Lucas, 1988). Sa dispersion, associée aux premiers stades de vie (Cowen et Sponaugle, 2009; Hauser, 2001), dépend fortement des courants. Elle équivaudra par exemple à 8,6 km par jour pour un courant de surface moyen de 10 cm/s. La larve se fixe au stade pédivéligère, de préférence dans un site possédant déjà des bénitiers adultes (Lucas, 1994 ; Anonyme, 2006) : c'est la phase de fixation et de métamorphose en naissain (10^{ème} au 14^{ème} jour). Le cycle biologique du bénitier est détaillé dans la figure 16.

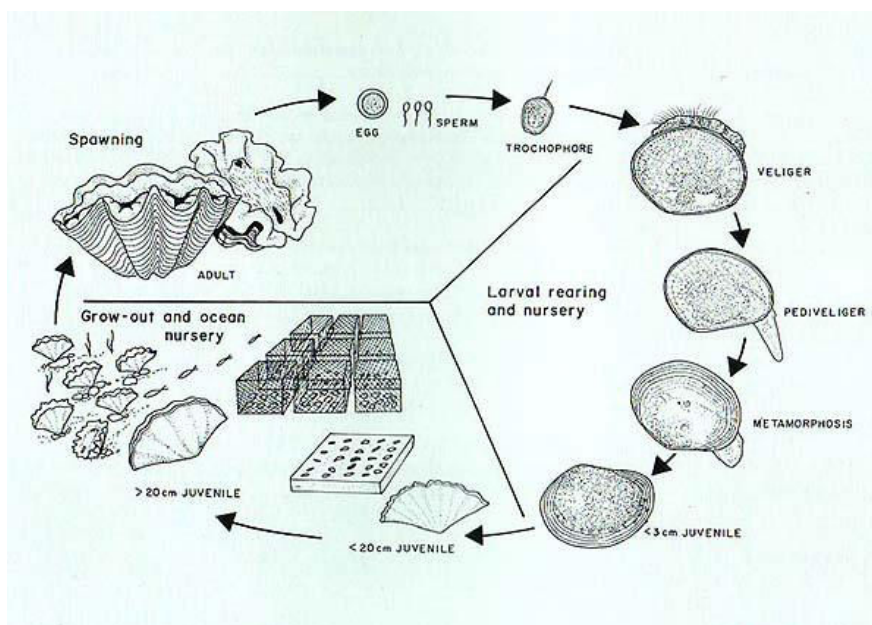


Figure 16. Cycle biologique du bénitier. (D'après "The Giant Clam: an Ocean Culture Manual," 1992)

La larve pédivéligère capture les *Symbiodinium* présents dans l'environnement et les maintient dans l'estomac jusqu'au stade juvénile. Elles remontent ensuite par des diverticules digestifs, les tubules primaires et secondaires, jusqu'au manteau (Leggat *et al.*, 2002; Norton *et al.*, 1992) (Figure 17). La symbiose s'établit donc après la métamorphose (Anonyme, 2006). Dans la plupart des symbioses impliquant les *Symbiodinium*, ceux-ci sont contenus dans les cellules de leur hôte, mais dans certains cas, comme pour le bénitier, ils sont intercellulaires. C'est une exosymbiose.

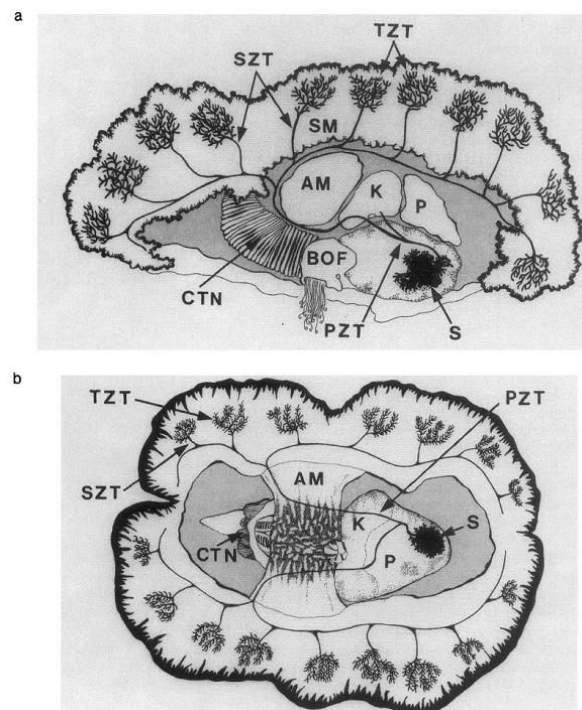


Figure 17 Anatomie du bénitier montrant l'emplacement des tubules contenant les *Symbiodinium*. a. vue latérale, b. vue dorsale. La structure dense et ramifiée située à la surface de l'estomac (S) est le diverticule digestif. Les tubules primaires (PZT) proviennent d'un des conduits diverticulaires. AM = muscle adducteur ; BOF = organe byssal/pied ; CTN = cténidie ; K = rein ; P = péricarde ; PZT = tubule primaire ; S = estomac ; SM = muscle siphonal ; SZT = tubule secondaire ; TZT = tubule tertiaire. (D'après Norton *et al.* 1992)

La présence des symbiotes dans le manteau explique qu'il ait pris des proportions très importantes chez le bénitier, qui l'expose aux rayons du soleil pendant la journée afin que les *Symbiodinium* bénéficient de la lumière nécessaire à la réalisation de la photosynthèse (Ambariyanto et Hoegh-Guldberg, 1999; Reid *et al.*, 1984; Trench *et al.*, 1981; Yonge, 1975). Il

semblerait que les iridophores présents dans le manteau permettent la diffraction de la lumière qui serait ainsi redirigée vers les *Symbiodinium*, permettant ainsi d'optimiser la photosynthèse.

Les *Symbiodinium* participent à la physiologie de l'organisme (Muscatine, 1967; Muscatine, 1965) ; ils jouent un rôle significatif dans l'alimentation et la physiologie de l'hôte (Muscatine et Le Porteur, 1977). Par exemple, le carbone fixé par la photosynthèse, sous forme de glycérol et d'autres molécules simples, peut être soit excrété par les *Symbiodinium* soit être directement ingéré par digestion du symbionte afin de pourvoir aux besoins nutritionnels des hôtes (Dubinsky *et al.*, 1990). Ainsi, si la lumière est suffisante, le bécitier peut vivre exclusivement des produits des *Symbiodinium*.

En outre, la présence de *Symbiodinium* facilite l'assimilation et la conservation de l'azote (Hoegh-Guldberg, 1996), une ressource limitante dans les écosystèmes lagunaires (Muller-Parker, 1997). De plus, il semblerait que certains constituants lipidiques produits par les *Symbiodinium*, comme l'acide palmitique (C16:0) et l'acide palmitoléique (C16:1n7), soient transférés directement à l'hôte (Johnston *et al.*, 1995). Ainsi, la présence de ces organismes symbiotiques qui possèdent des voies de biosynthèses des lipides spécifiques, notamment celle des acides gras à longue chaîne, représente un avantage pour l'hôte qui bénéficie ainsi directement d'acides gras qu'il n'est pas capable de synthétiser lui-même.

Le bécitier est néanmoins capable d'extraire directement les substances nutritives dissoutes dans l'eau et de produire les acides aminés dont il a besoin. Il peut également par filtration ingérer de fines particules qui sont triées au niveau des branchies.

II.2.2 La diversité des Symbiodinium associés aux bécitiers

Les symbioses impliquant des dinoflagellés photosynthétiques et des invertébrés marins sont nombreuses (Trench, 1979; Pawlowski *et al.*, 2001; Gordon et Leggat, 2010) et jouent un rôle clé dans le maintien des écosystèmes des récifs coralliens. Le développement de techniques de génétique moléculaire a permis de révéler l'importante diversité des *Symbiodinium* (Rowan et Powers, 1991). L'étude de la diversité des *Symbiodinium* s'est basée sur la comparaison de séquences de différentes parties du génome (Rouzé, 2013) : le gène nucléaire codant la petite sous-unité 18S (Rowan et Powers, 1991; Darius *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2002), la grande sous-unité 28S (Wilcox, 1998; Baker, 1999; Loh *et al.*, 2001; Pawlowski *et al.*, 2001; Pochon *et al.*, 2001; Savage *et al.*, 2002; Van Oppen *et al.*, 2001) ou les espaceurs transcrits internes ITS1 et ITS2 de cet ARN ribosomal (LaJeunesse, 2001; Pochon, 2001; Savage *et al.*, 2002; Arif *et al.*, 2014) ou bien encore, le gène du grand ARN ribosomique chloroplastique 23S (Jeong *et al.*, 2014;

Pochon et Gates, 2010; Pochon *et al.*, 2007; Rowan, 2004) ou le gène de la cytochrome *b* mitochondriale (Jeong *et al.*, 2014).

Ainsi, neuf clades de *Symbiodinium* (notés A à I : Figure 18) ont été identifiés jusqu'à présent par la nomenclature phylogénétique basée sur l'ADNr (Baker, 2003; Correa *et al.*, 2009; Pochon et Gates, 2010; Rowan et Powers, 1991; Stat *et al.*, 2006; Stat *et al.*, 2008). Chaque clade contient plusieurs sous-clades (Arif *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2014; LaJeunesse, 2001; Van Oppen *et al.*, 2005; Rodriguez-Lanetty, 2003). Selon les séquences ITS2, le clade C comprend plus d'une centaine de sous-clades tandis que le clade D n'en comprendrait qu'une dizaine (Lajeunesse, 2005; Pochon *et al.*, 2007, Rouzé, 2013). Le clade A montre le plus fort taux de divergence, le clade D présente un taux de divergence plus faible que le clade A (Anisimova *et al.*, 2001; Pochon *et al.*, 2006; Tchernov *et al.*, 2004), et les clades B et C ont les taux de divergence les plus faibles parmi tous les clades (Ladner *et al.*, 2012; Rouzé, 2013). A ce jour le clade I a été identifié uniquement chez les foraminifères (Pochon *et al.*, 2006) et le clade H, pour qui c'était également le cas, vient d'être observé en symbiose avec *Pocillopora damicornis* (Schmidt-Roach *et al.*, 2012). Le clade E se retrouve essentiellement à l'état libre (Pochon et Gates, 2010; Pochon *et al.*, 2006).

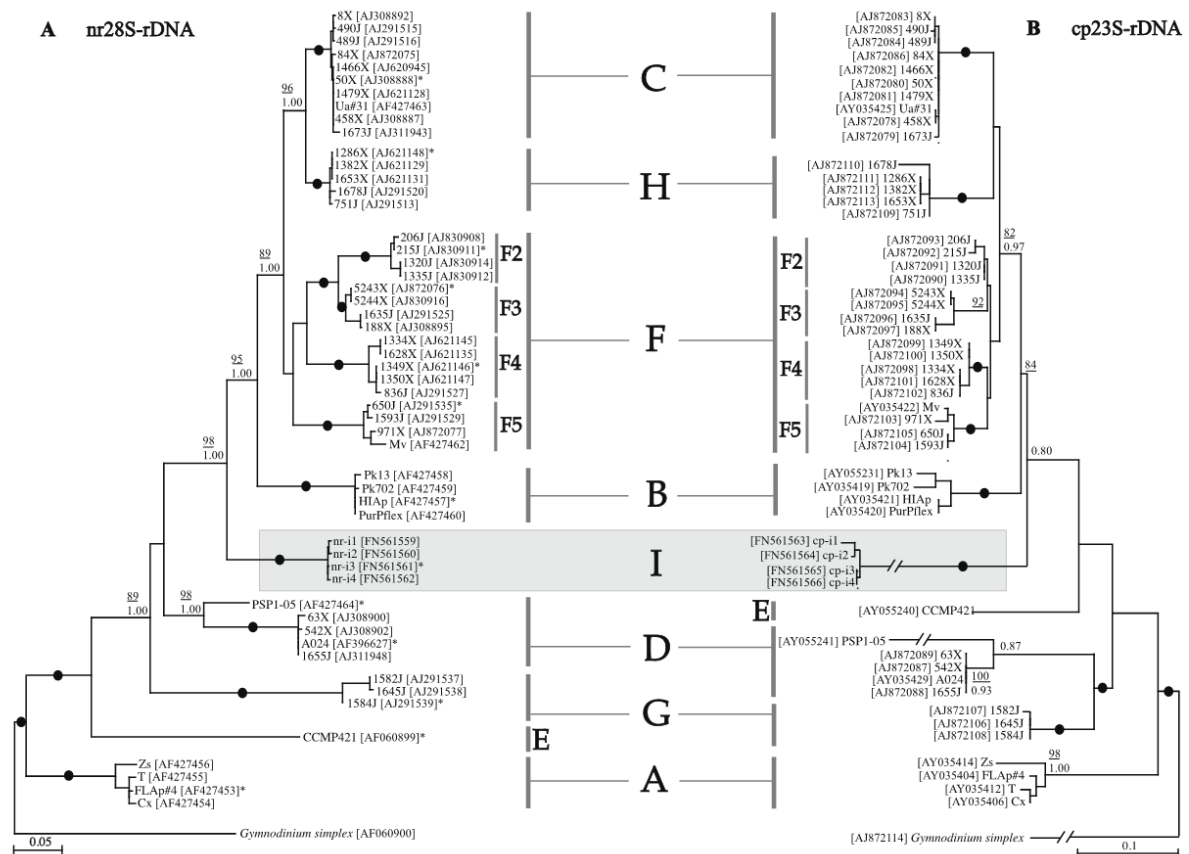


Figure 18. Arbre phylogénétique du genre *Symbiodinium* élaboré par la méthode du maximum de vraisemblance, basé sur l'analyse A) de la région nucléaire codant la grande sous-unité ribosomale (ADNr 28S), et B) de la région codant pour le gène chloroplastique codant la grande sous-unité ribosomale (ADNr 23S). Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les résultats de bootstrap (BP ; soulignés) de l'analyse de la méthode du maximum de vraisemblance ainsi que les probabilités bayésiennes (BiPP). Les points noirs représentent les valeurs de bootstrap de 100% et les probabilités bayésiennes de 1. Les noeuds sans valeurs correspondent à des supports de BP inférieures à 70% et de BiPP inférieures à 0,8. Toutes les séquences sont présentées par leur numéro de référence d'accès *Genbank*. (D'après Pochon et Gates, 2010)

Ces données ont bien souvent été issues d'amplification des séquences à l'aide d'amorces universelles qui ne peuvent néanmoins pas être exhaustives, permettant l'amplification de la région cible, quel que soit le clade de *Symbiodinium* concerné. La caractérisation des clades, par clonage de ces amplifiats et séquençage, est donc loin d'être complète, puisque cette technique ne permet de cloner que les fragments les plus représentés dans l'ampliat, c'est à dire ceux issus de l'amplification de l'ADN des clades majoritaires. L'accessibilité récente et à moindre coût de la métagénomique devrait permettre très prochainement de compléter ces données sur la diversité des clades.

Concernant la répartition géographique des *Symbiodinium*, les clades A, B et F semblent plus communs dans les hautes latitudes, alors que le clade C semble plutôt inféodé aux latitudes tropicales (Baker, 2003; Lajeunesse *et al.*, 2003; Savage *et al.*, 2002). Par rapport à la région indo-Pacifique, la diversité des *Symbiodinium* semble plus faible au niveau de Pacifique, où le clade C paraît ubiquiste alors que le clade D a plus rarement été identifié (Baker, 2003; Lajeunesse, 2001; Lajeunesse *et al.*, 2003; Putnam *et al.*, 2012; Rouzé, 2013).

Lorsque les *Symbiodinium* sont spécifiques de régions ou d'hôtes particuliers, ils sont qualifiés de « spécialistes », alors que, lorsqu'ils sont largement distribués et vivent en symbiose avec une grande variété d'hôtes ils sont dits « généralistes » (Fabina *et al.*, 2012; Putnam *et al.*, 2012; Rowan, 1998; Toller *et al.*, 2001; Lajeunesse, 2002; Rouzé, 2013). De la même manière, les hôtes associés à un seul clade de *Symbiodinium* sont qualifiés de « spécialistes », alors que ceux qui vivent en symbiose avec plusieurs clades sont dits « généralistes » (Baker, 2003; Banin *et al.*, 2003; Fabina *et al.*, 2012; Rowan et Knowlton, 1995; Rowan *et al.*, 1997). Le développement de techniques de biologie moléculaire extrêmement sensibles (*i.e.* PCR quantitative) a permis de mettre en évidence la présence de clades cryptiques de *Symbiodinium* au sein d'un même hôte (Correa *et al.*, 2009; Mieog *et al.*, 2007; Mieog *et al.*, 2009; Silverstein *et al.*, 2012; Ulstrup et Van Oppen, 2003; Yamashita *et al.*, 2011; Rouzé, 2013). Cette observation met en avant le potentiel de flexibilité hôte-*Symbiodinium*, notion nettement vérifiée chez les coraux depuis quelques années (Berkelmans et van Oppen, 2006; Mieog *et al.*, 2007; Ulstrup et Van Oppen, 2003; Rouzé, 2013).

Peu d'études ont été développées à ce jour quant aux caractéristiques des *Symbiodinium*. Néanmoins, on sait que chacun d'eux possède des caractéristiques physiologiques qui leur sont propres et présentent des sensibilités différentes aux conditions environnementales. En effet, dès 1983, une photo-adaptation entre souches de *Symbiodinium* provenant d'hôtes différents (coraux, bédouilles et anémones) a été mise en évidence (Chang *et al.*, 1983), suggérant la présence de génotypes différents. Une étude plus récente sur les clades de *Symbiodinium* A, B et F issus d'hôtes distincts (Hennige *et al.*, 2009) a mis en évidence des différences significatives des capacités photosynthétiques à différentes irradiances entre les sous-clades mais pas entre les clades (Rouzé, 2013). Il a été montré par ailleurs que selon les conditions thermiques, entre 27 et 31°C, les clades A, B et C présentent des modifications de leur taux de croissance distinctes (Kinzie *et al.*, 2001; Rouzé, 2013). Enfin, le clade A présente la particularité de produire des

acides aminés de type Mycosporine (MAAs) en réponse à une exposition aux radiations UV, ce qui n'a pas été observé chez les clades B et C (Banaszak *et al.*, 2000; Rouzé, 2013).

Pour ce qui est des bénitiers, une diversité génétique significative des *Symbiodinium* présents chez les bénitiers a été observée grâce aux marqueurs allozymiques et à l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe dès 1998 (Baillie *et al.*, 2000; Baillie *et al.*, 1998; Belda-Baillie *et al.*, 1999). Le clade A a été identifié en mer rouge chez *T. maxima*, *T. squamosa* et *T. costata*. Le clade C a été identifié en mer rouge chez *T. squamosa* (Richter *et al.*, 2008), à Palau chez *T. gigas* (Carlos *et al.*, 1999) et dans la région Indo-Pacifique chez *T. crocea*, *T. gigas*, *T. derasa*, *H. hippopus*, *H. porcellanus* (Baillie *et al.*, 2000). Parmi les centaines de génotypes de *Symbiodinium* trouvés dans la littérature et dans la banque de données *Genbank*, seuls 11 types distincts ont été retrouvés au sein des bénitiers et sont également présents au sein d'hôtes n'appartenant pas à la famille des Tridacnidae (Carlos *et al.*, 1999; Baillie *et al.*, 2000; Weber, 2009; Pinzón *et al.*, 2011 ; DeBoer *et al.*, 2012) (Tableau 1).

Tableau 1. Tableau des principaux clades et sous-clades de *Symbiodinium* identifiés au sein des bédouilles, avec la référence de l'article et la technique utilisée. **1** : *T. maxima*, **2** : *T. squamosa*, **3** : *T. crocea*, **4** : *T. gigas*, **5** : *T. derasa*, **6** : *T. costata*, **7** : *H. hippopus*, **8** : *H. porcellanus*.

Clade de <i>Symbiodinium</i>	A					C				D			Technique	Référence
	A1	A3	A3-223	A6	A6-57	C1	C3	C3-130	C15-31	D1a	D1b/D5	D1b-103		
Mer rouge et golf de l'Aqaba	1												ADNr ITS1-5,8S-ITS2	Weber 2009
Ouest de l'océan Indien						1							ADNr ITS1-5,8S-ITS2	Weber 2009
Philippines et Palau	1,2,3,4,6,8												ADNr 18S	Carlos et al. 1999
Indo-Pacifique		1,2,3,4,5,7,8											ADNr ITS1-5,8S-ITS2	Baillie et al. 2000
Indo-Pacifique		1											Marqueurs microsatellites	Pinzon et al. 2011
Indonésie		1,2,3	3	1,2,3	3	1,2,3	2	2	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1	DGEE + ADNr ITS2	DeBoer et al. 2012
Fidji et Vanuatu		1				1							ADNr ITS1-5,8S-ITS2	Weber 2009
Polynésie française, îles Cook et Samoa		1											ADNr ITS1-5,8S-ITS2	Weber 2009

Il apparait donc que *T. maxima*, *T. squamosa* et *T. crocea* peuvent ainsi vivre en symbiose avec une large gamme de *Symbiodinium* (parmi les clades A, C et D) indépendamment de leur localisation géographique ; ils seraient donc des hôtes généralistes. Il semblerait que seul le clade A1, généraliste et tolérant, ait été retrouvé au sein des individus de *T. maxima* en Mer Rouge, mettant en évidence l'existence d'un holobionte endémique suggérant une adaptation particulière aux conditions de température et de salinité actuelles de cette région (Weber, 2009). Au-delà du caractère généraliste des bédouilles, ils peuvent héberger plusieurs types de *Symbiodinium* au sein d'un même individu. 9 combinaisons de communautés de clades A, C et D ont été observées pour un même individu (Tableau 2) en proportions variables (Figure 19). *T. squamosa* serait l'espèce présentant le plus fort taux de mixité de clades présents chez un individu.

Tableau 2. Clades de *Symbiodinium* présents chez *Tridacna* spp. Nombre d'hôtes dans lesquels chaque combinaison de clades de *Symbiodinium* a été identifiée. Les colonnes avec plusieurs lettres (AA, CC, etc...) indiquent que le bédouille possède plusieurs sous clades de *Symbiodinium* d'un même clade. (D'après DeBoer *et al.*, 2012)

Host species	<i>Symbiodinium</i> clade combination									Total
	A	AA	C	CA	CAD	CC	CD	D	DA	
<i>T. crocea</i>	23	5	83	35	2		9	2	2	161
<i>T. maxima</i>	7		8	3		1	6	3		28
<i>T. squamosa</i>	2		4	2	2	1	11	5	34	61
Total	32	5	95	40	4	2	26	10	36	250

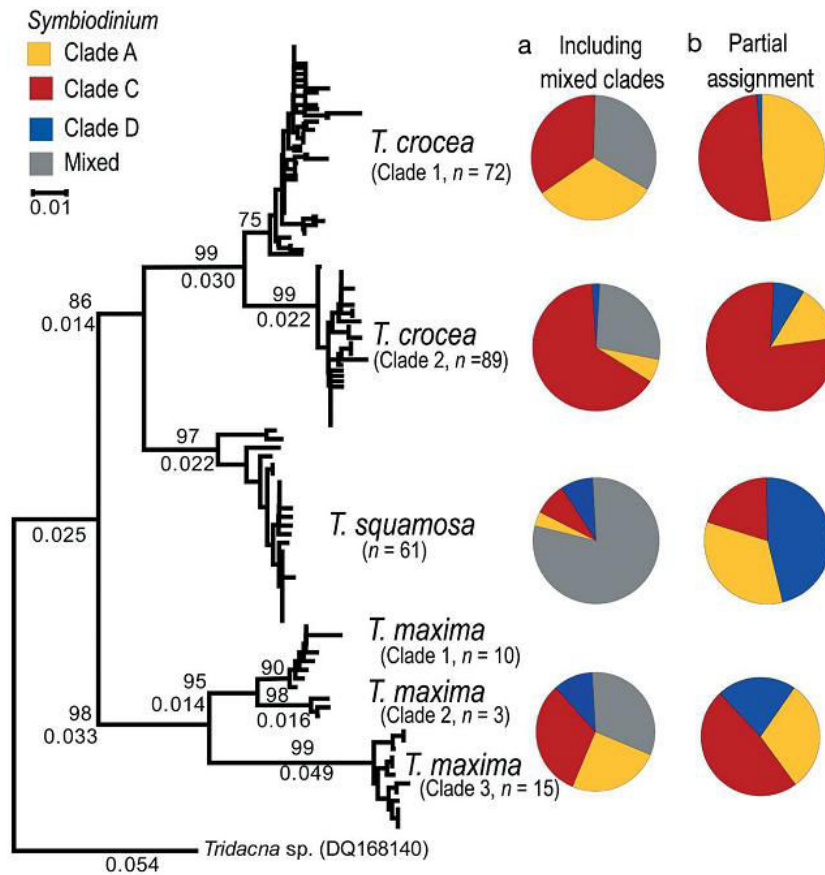


Figure 19. Arbre phylogénétique construit avec la méthode *Neighbor-Joining* établi avec les séquences *COI* de *Tridacna* spp avec les clades majoritaires de chaque espèce. La valeur de bootstrap, établie à partir de 1000 répliquats ainsi que la longueur des branches, est indiquée sous ces dernières. (a) pourcentage d'individus de chaque espèce (ou clade pour *T. crocea*) avec chaque clade de *Symbiodinium* (A, C, D ou mixte). (b) pourcentage d'individus de chaque espèce (ou clade pour *T. crocea*) avec chaque clade de *Symbiodinium* du groupe « mixte » présenté en (a). (D'après DeBoer *et al.*, 2012)

La diversité des *Symbiodinium* présents au sein des bénitiers a donc été étudiée dans de nombreuses régions du monde, chez 8 des 12 espèces de Tridacnidae actuellement décrites. Plusieurs types de clades, A, C et D, ont été identifiés au sein des bénitiers, alors que les clades B, E et F n'ont jamais été trouvés. Leur larve en étant dépourvue, les bénitiers doivent donc prélever dans l'environnement les lignées de *Symbiodinium* généralistes présentes dans la colonne d'eau, et à ce jour, aucune lignée de *Symbiodinium* spécifique aux bénitiers n'a été identifiée.

III. Les approches « omiques » chez les bivalves marins

Un organisme vivant est un système complexe dont le phénotype exprimé est constitué par une part intrinsèque (le fonctionnement intra et inter-cellulaire) et une part extrinsèque (contraintes environnementales). Les disciplines « omiques » ont pour objectif d'appréhender le fonctionnement cellulaire d'un organisme dans sa totalité en prenant en compte l'ensemble des étapes réactionnelles : du gène au produit ou activité finale (Mohamadi, 2014). Ainsi la génomique, la transcriptomique, la protéomique, et plus récemment la métabolomique, ont pour but de relier les observations réalisées respectivement au niveau du génome, du transcriptome, du protéome et du métabolome à des fonctions cellulaires. Les données issues de ces différentes approches sont complémentaires et permettent une description globale des systèmes biologiques étudiés. Ce type d'approche intégrée est surtout préconisé pour mieux rendre compte des influences multifactorielles ou complexes au niveau de l'évolution et de l'adaptation d'un organisme (composition du patrimoine génétique et activités biologiques possibles), et est adaptée au cas de l'étude de la réponse à des perturbations environnementales (Roux *et al.*, 2011). Elle permet de faire le lien entre un stimulus et les voies induites, pouvant ainsi révéler la mise en place de voies particulières (Mohamadi, 2014). Cela peut permettre, dans un contexte où l'on ne sait pas invalider les gènes, d'aller au-delà de la simple description de ces derniers qui sont sur ou sous exprimés, sans savoir s'ils sont réellement impliqués.

III.1 Diversité génomique, protéomique et métabolomique

III.1.1 Génomes et transcriptomes

Peu de génomes ou transcriptomes de bivalves marins sont actuellement disponibles (Li *et al.*, 2013). Cependant, grâce aux progrès des techniques de séquençage haut débit récentes, l'effort porté dans ce domaine sur les bivalves marins s'intensifie et les bases de données génomiques s'y consacrant s'enrichissent, soit spécialisées comme Mytibase (<http://mussel.cribi.unipd.it>) pour *Mytilus galloprovincialis* ou DeepSeaVent (<http://transcriptomics.biocant.pt:8080/deepSeaVent>) pour *Bathymodiolus azoricus* (Li *et al.*, 2013) soit généralistes comme (Giga)ⁿDB (<http://gigadb.org>) ou NCBI-bioproject genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>) avec le génome ou le transcriptome de *Crassostrea gigas*, *Pinctada margaritifera*, *P. maxima* et *P. fucata*. Les premières espèces analysées présentent généralement un intérêt, ressources de valorisation comme la moule, l'huître ou les espèces d'huître perlière dont quatre ont fait l'objet d'analyses transcriptomiques (Huang *et al.*, 2013). Toutefois, des données transcriptomiques de 15 espèces de bivalves, *Argopecten*

irradians, *Chlamys farreri*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Hyriopsis cumingii*, *Ennucula tenuis*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Mytilus californianus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Nucula nitidosa*, *Pinctada martensi*, *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Solemya velum* et *Yoldia limatula*, ont également été obtenues récemment. (Kocot *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011), mais aucune n'appartient à l'ordre des Veneroides. Concernant les Veneroides, seul le transcriptome de *Ruditapes philippinarum* a été réalisé, fournissant une base de données comprenant 32 606 transcrits, dont 30% ont pu être annotés (Milan *et al.*, 2011). Il semblerait qu'aucun transcriptome de Tridacnidae n'ait encore été réalisé à ce jour.

III.1.2 Protéome

Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, une partie d'une cellule (membranes, organites) ou un groupe de cellules (organe, organisme, groupe d'organismes) dans des conditions données et à un moment donné (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Prot%C3%A9ome>). Le protéome est de nature dynamique. A la différence du génome qui est, à quelques exceptions près (cluster des ARNr, séquences répétées, télomères, etc) stable dans les cellules d'un organisme, le protéome varie temporellement et spatialement, selon les réponses de l'organisme à son environnement, à des stimuli internes (hormonaux et chronobiologiques par exemple) ou en réponse à certains polluants (métaux lourds, etc). La taille et la complexité du protéome est plus importante que celle du génome car un gène peut coder plusieurs protéines. Ceci est dû à des modifications de la maturation des ARNm (molécules intermédiaires de la traduction, entre le génome et le protéome), mais aussi à des modifications post-traductionnelles des protéines comme les phosphorylations et les glycosylations. L'étude du protéome, la protéomique, permet une meilleure compréhension du fonctionnement cellulaire à partir de l'expression protéique dans un contexte global.

Dans le domaine de la toxicologie aquatique, Shepard et ses collaborateurs (Shepard et Bradley, 2000 ; Shepard *et al.*, 2000) ont été les premiers à analyser le protéome d'un bivalve, *Mytilus edulis*, et ont ainsi donné un point de départ à l'utilisation de la protéomique chez d'autres espèces aquatiques (Campos *et al.*, 2012). Les bivalves ont ensuite été très étudiés, car les résultats de protéomique chez ce groupe de filtreurs fournissent des bioindicateurs de la toxicologie environnementale. Ainsi plusieurs études, effectuées chez *Mytilus galloprovincialis*, *Perna viridis*, *Ruditapes decussatus* et *Chamaelea gallina* (Campos *et al.*, 2012), ont permis de mettre en évidence de nombreux biomarqueurs de la toxicité aux xénobiotiques chez les

bivalves, tels que la deuxième sous-unité de la cytochrome c oxydase, la catalase, ou encore la superoxyde dismutase.

III.1.3 Métabolome

Le métabolome est constitué de molécules de faible poids moléculaire (< 2000 Da) telles que les acides organiques, les sucres, les acides aminés et aussi certains peptides ou vitamines produites par les cellules (Mohamadi, 2014). Une des caractéristiques du métabolome est qu'il s'inscrit dans un contexte post-génomique, et représente ainsi l'ultime expression d'un organisme (Nicholson *et al.*, 1999). Le métabolome est également sensible à toute modification du système biologique, qu'elle soit le résultat d'un changement interne (une mutation par exemple) ou de stimuli extérieurs (stress, xénobiotiques, etc), c'est-à-dire que les taux de métabolites d'un organisme évoluent en fonction de son état physiologique, pathologique, ou de son stade de développement (Holmes *et al.*, 2008, Mohamadi, 2014). Par conséquent tous les éléments susceptibles de perturber l'homéostasie d'un organisme tels qu'une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou un facteur susceptible de perturber son fonctionnement, peuvent être mis en évidence au niveau du métabolome (Moco *et al.*, 2007). C'est sur ce principe que repose la métabolomique (Kell, 2004). La métabolomique est un outil analytique qui reflète le phénotype d'un système donné à un instant t par la composition de ses molécules à cet instant (Miura *et al.*, 2010; Mohamadi, 2014). Elle permet de caractériser un état physiologique donné, de mettre en évidence les marqueurs de l'expression d'un stress (Weckwerth et Fiehn, 2002), de dresser une signature chimique spécifique de la perturbation étudiée et d'expliquer les mécanismes biologiques associés (Ellis *et al.*, 2007; Van Ravenzwaay *et al.*, 2007; Mohamadi, 2014).

Cette discipline émergente clôt ainsi la cascade des sciences exploratoires dites « omiques ». Outre son approche dynamique, un des avantages de l'étude métabolomique est sa flexibilité, car elle ne nécessite pas la connaissance du génome de l'espèce étudiée (Campos *et al.*, 2012). Un intérêt croissant lui est porté puisque les organismes marins benthiques sont maintenant la première source de découverte de nouvelles molécules d'intérêt (Imhoff *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2010; Montaser et Luesch, 2011; Newman et Hill, 2006). La production de certains lipides peut par ailleurs être une source de molécules à caractère thérapeutique intéressante (Gaquerel *et al.*, 2007). En conséquence, l'intérêt de la communauté scientifique dans l'utilisation de la métabolomique chez les bivalves ne cesse d'augmenter.

III.1.3.1 Les lipides

Les lipides font partie des métabolites primaires, c'est-à-dire des molécules qui participent à la croissance et au maintien des cellules (Le Grand, 2010). Ce sont des métabolites d'origine animale ou végétale regroupant divers composés désignés communément par « matières grasses » ayant les propriétés suivantes : non miscibles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques, formés majoritairement par des longues chaînes carbonées pouvant comporter des atomes d'oxygène, de phosphore, de soufre et d'azote présentant divers groupes fonctionnels (alcool, acides, esters, etc). Suivant leur structure et les fonctions présentes, ils peuvent être classés en lipides simples (comportant un ou deux groupes fonctionnels tels que les acides gras) ou lipides complexes (comportant au moins deux groupes fonctionnels et associés à des molécules autres que les acides gras).

Au niveau biologique, une définition plus stricte a été adoptée, considérant que les lipides sont constitués par les acides gras, leurs dérivés, ainsi que les substances qui leur sont reliées au niveau biosynthétique et fonctionnel (Le Grand, 2010). Cette définition englobe plusieurs types de molécules fréquemment retrouvées dans les extraits lipidiques tels que les acides gras et leurs dérivés, les caroténoïdes, les terpènes, les stéroïdes et acides biliaires très diversifiées au niveau structural et fonctionnel. Ainsi, Les lipides biologiques ont des rôles multifonctionnels en tant qu'éléments structuraux des membranes cellulaires (les phospholipides), réserves énergétiques (mono-di- et triglycérides) et métaboliques intervenant dans la biosynthèse de molécules ayant diverses fonctions telles que précurseurs de messagers intra ou extra-cellulaires, vitamines, etc.

Suivant leur polarité, on peut classer les lipides en deux classes : les lipides neutres (ou apolaires) et les lipides polaires. Les lipides de réserve sont majoritairement constitués de lipides neutres et simples, les lipides membranaires de lipides complexes et polaires (Figure 20).

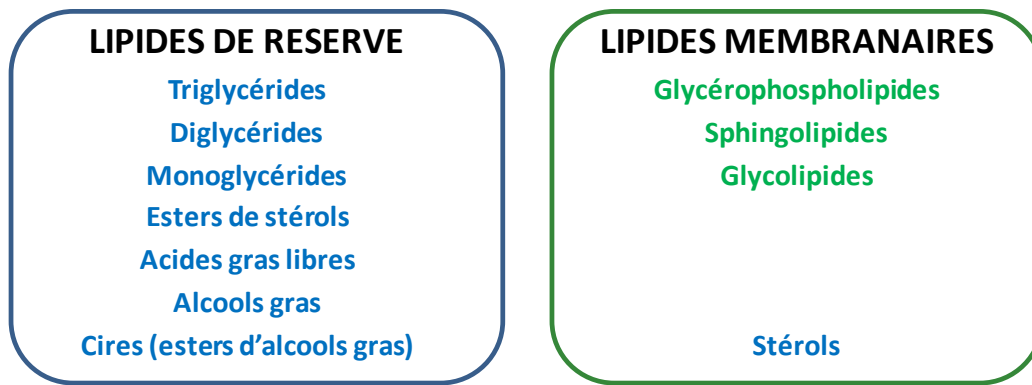


Figure 20. Répartition des principaux types de lipides en deux sous-catégories. Les lipides de réserve, composés de lipides simples et neutres (en bleu), et les lipides membranaires, majoritairement composés de lipides complexes et polaires (en vert). (D'après Legrand, 2010)

Les acides gras (AG) sont les composés structuraux fondamentaux des lipides membranaires (Le Grand, 2010). Ils sont constitués par une chaîne hydrocarbonée linéaire saturée ou insaturée comportant un groupe carboxyle. L'acide gras est identifié par le sigle C:Xn-Y où C indique le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne, X désigne le nombre de doubles liaisons, n le nombre de carbones entre la 1^{ère} double liaison et le groupement carboxyl terminal et Y précise la position de la 1^{ère} double liaison comptée à partir du groupement méthyle terminal (Figure 21). La structure chimique des AG (longueur de chaîne, insaturations) a une grande influence sur les propriétés physiques des lipides (tels que le point de fusion) qui sont en relation directe avec la fluidité des membranes (D.Voet, 2004).

Chez les bivalves, on trouve des AG particuliers : les AG non interrompus de méthylène (NMI) dont les doubles liaisons sont séparés par plus d'un groupement méthylène, et les AG branchés caractérisés par le branchement d'un groupement méthyle sur la chaîne en position *iso* ou *antéiso* (Figure 21).

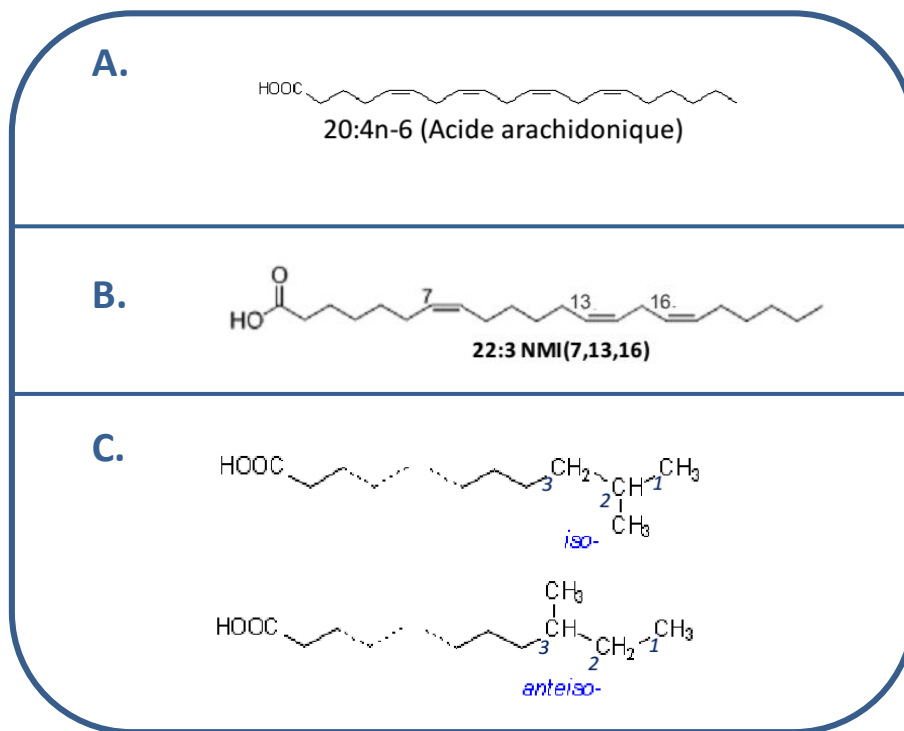


Figure 21. Structure et nomenclature de 3 types d'acide gras. A. Acide gras classique B. Acide gras NMI. Les chiffres entre parenthèses indiquent la position de chacune des doubles liaisons, comptée à partir de la fonction acide. C. Acides gras branchés de forme « iso » et « anteiso ». (Adapté de Le Grand, 2010)

La composition des AG d'un organisme dépend essentiellement de son alimentation, mais également de sa localisation géographique et de la saison (Ventrella *et al.*, 2008). Les lipides marins sont caractérisés par un haut degré d'insaturations des AG qui sont particulièrement importants dans l'alimentation chez l'Homme car ils ne peuvent être synthétisés *de novo* (Sargent, 1978). Ainsi les organismes marins représentent une source majeure de structures uniques telles que les AG méthoxylés et halogénés (Ackman, 1989; Dembitsky *et al.*, 2002; Berge et Barnathan, 2005; Carballeira, 2008). Les profils d'AG des lipides marins montrent des concentrations relativement élevées d'AG en n-3 tels que l'acide linoléique (C18:3n-3), l'acide eicosapentaénoïque ou EPA (C20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque ou DHA (C22:6n-3) (Ackman, 1983; Chu et Greaves, 1991; Sargent J., Henderson *et al.*, 1988). Les mollusques bivalves sont capables de synthétiser *de novo* des AG non méthylés dont les rôles structurels et fonctionnels dans les membranes biologiques ont été prouvés : ils confèrent une résistance importante aux processus oxydatifs et aux lipases microbiennes. Le potentiel biomédical de ces AG particuliers fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études, notamment pour le développement de produits anti-cancéreux (Carballeira, 2008).

Des quantités considérables d'acides gras en C20:5n, C22:5n et C22:6n ont été trouvés parmi les bivalves marins (Gardner et Riley 1972). Parmi les acides gras identifiés chez *Mytilus galloprovincialis*, les acides gras polyinsaturés (PUFA) sont les plus représentés quantitativement. Parmi ce groupe, les acides gras C20:5n-3 et C22:5n-3 sont les plus abondants (Freites *et al.*, 2002). La famille des Mytilidae a été particulièrement étudiée (De Moreno *et al.*, 1980; Isay et Busarova, 1984; Joseph, 1982; Paradis et Ackman, 1977) et les acides gras identifiés étaient essentiellement des C18:3n, C18:4n, C20:5n et C22:6n. L'analyse de la composition lipidique de différents organes des bivalves marins *Megangulus venulosus* et *Megangulus zyoensis* a montré que les acides gras C16:0, C18:0, C20:5n-3 et C22:6n-3 sont les plus représentatifs de l'ensemble des organes, avec les acides gras n-3 polyinsaturés qui sont les plus abondants (Kawashima et Ohnishi 2003). Les acides gras C16:0 et C20:5n-3 sont neutres ou polaires alors que les acides gras C22:6n-3 sont uniquement polaires. Le principal acide gras ramifié, l'acide 4,8,12-triméthyltridécanoïque, a été identifié dans les viscères des deux espèces étudiées. Les acides 2-hydroxypentadécanoïque, 2-hydroxyhexadécanoïque et 2-hydroxyheptadécanoïque ont également été identifiés chez les deux espèces.

La composition en lipides polaires des branchies de deux bivalves marins, *Ruditapes philippinarum* et *Crassostrea gigas*, a montré la présence de nombreux acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés, ainsi que des acides gras non méthylés (Tableau 3).

Tableau 3. Composition en acides gras des branchies de *Ruditapes philippinarum* et *Crassostrea gigas*. Valeurs exprimées en pourcentage du poids des acides gras totaux. (Adapté de Delaporte et al 2005)

Acide gras	<i>R. philippinarum</i> Moyenne +/- SD	<i>C. gigas</i> Moyenne +/- SD
20:1n-11	2.6 ± 0.0	1.8 ± 0.2
18:1n-9	1.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1
20:1n-9	2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1
20:2i	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1
22:2i	3.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1
16:1n-7	2.1 ± 0.2	1.6 ± 0.0
18:1n-7	1.1 ± 0.0	3.8 ± 0.5
20:1n-7	1.7 ± 0.2	6.2 ± 0.1
20:2j	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1
22:2j	7.6 ± 0.0	7.5 ± 0.0
18:2n-6	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1
18:3n-6	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
20:2n-6	1.7 ± 0.1	0.2 ± 0.0
20:3n-6	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
20:4n-6	4.8 ± 0.1	7.2 ± 0.4
22:4n-6	3.2 ± 0.1	1.1 ± 0.0
22:5n-6	2.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1
18:3n-3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0
18:4n-3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
20:4n-3	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0
20:5n-3	6.2 ± 0.3	17.0 ± 0.6
22:5n-3	3.2 ± 0.2	2.8 ± 0.0
22:6n-3	26.3 ± 0.7	20.8 ± 0.6
TO. SAFA	19.8 ± 1.4	17.2 ± 1.5
TO. MUFA	15.6 ± 0.6	19.8 ± 0.5
TO. PUFA	64.6 ± 1.2	63.0 ± 1.1
TO. (n-6)	12.2 ± 0.2	10.0 ± 0.5
TO. (n-3)	40.9 ± 0.9	42.8 ± 0.8
TO. NMIs	11.3 ± 0.2	9.8 ± 0.2
Total FAs (mg/g WW gill)	4.2 ± 0.2	5.0 ± 0.6
% of polar lipids	95.7 ± 0.5	86.1 ± 6.1

L'étude du métabolisme des acides gras chez *Crassostrea gigas* a montré que les huîtres possèdent des acides gras à longue chaîne qui ne sont pas fournis dans l'alimentation, essentiellement des C20 et C22 mono- et poly-insaturés, et particulièrement C20:5-n3. Par contre, elles semblent capables d'ajouter de petits acides gras dans des chaînes plus longues, et de les désaturer (Waldock et Holland, 1984).

Chez *Mytilus galloprovincialis*, le profil d'acides gras libres révèle l'estérification des acides gras en acide okadaïque, avec en majorité de l'acide palmitique. Chez *Cerastoderma edule*, les 7-0-acyl esters dont l'acide palmitique, sont quasiment absents et les esters avec les isomères C16:0 sont dominants, suivis par les esters en C15:1 et C15:0 (Vale, 2010).

Différentes voies de biosynthèse sont mises en jeu en fonction du type d'AG considéré. Concernant les AG polyinsaturés, la biosynthèse comprend de nombreux intermédiaires, essentiellement chez le phytoplancton (Figure 22). En effet, les microalgues marines, nourriture

de base des animaux filtreurs que sont les bivalves, fabriquent les AG C18:2n-6 (acide linoléique) et C18:3n-3 (acide linolénique), mais aussi l'ensemble des AG à chaînes moyennes à très longues (14 à 24 atomes de carbone) des séries n-6 et n-3. En revanche, les mollusques marins incapables de bioconvertir le C18:2n-6 et le C18:3n-3 alimentaires (De Moreno *et al.*, 1980; Waldock et Holland, 1984), présentent des voies de biosynthèses des AG insaturés très limitées, comprenant uniquement 3 composés : C16:0, C18:0 et C18:1n-9.

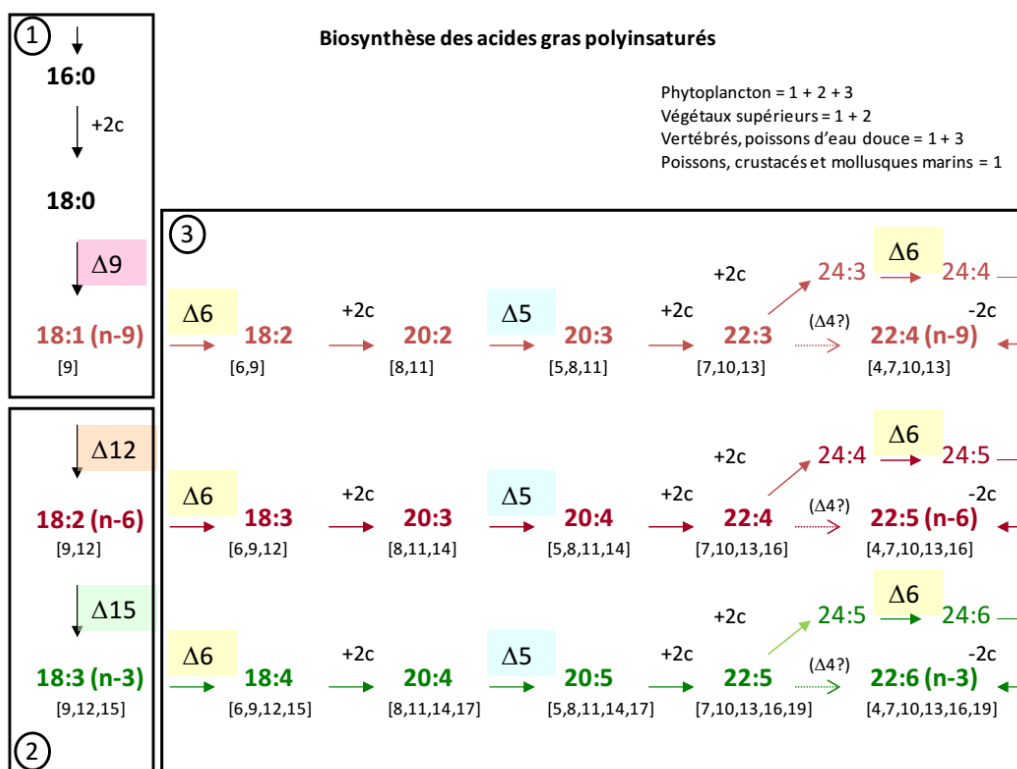


Figure 22. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés. Les chiffres entre [] indiquent la position de chacune des doubles liaisons comptée à partir de la fonction acide. Δ : désaturase. (D'après Le Grand, 2010)

La biosynthèse des AG NMI s'effectue à partir du C16:0 et du C18:0, après plusieurs étapes d'élongation et de désaturation (Figure 23).

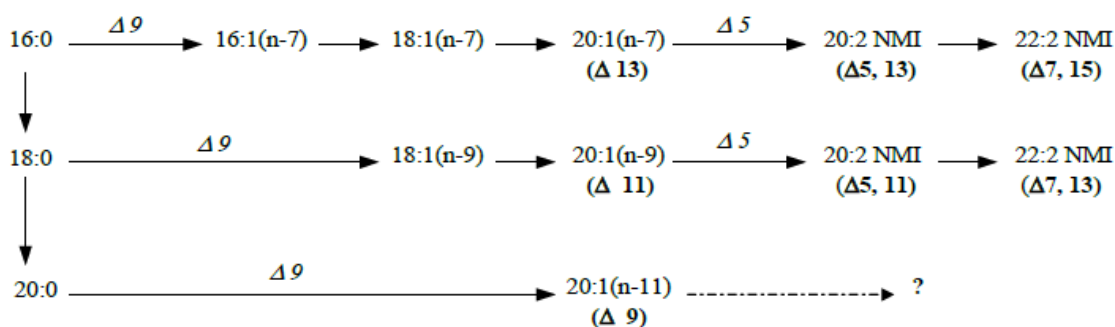


Figure 23. Biosynthèse des acides gras NMI et du 20:1n-11.Δ : désaturase.

(Adapté de Kraffe, 2003)

La biosynthèse des AG ramifiés est réalisée à partir du 3-méthylbutyryl-CoA et du 2-méthylpropanyl-CoA pour les AG de forme « *iso* » de forme paire et impaire, respectivement, et à partir du 2-méthylbutyryl-CoA pour les AG de forme « *anteiso* » (Figure 24).

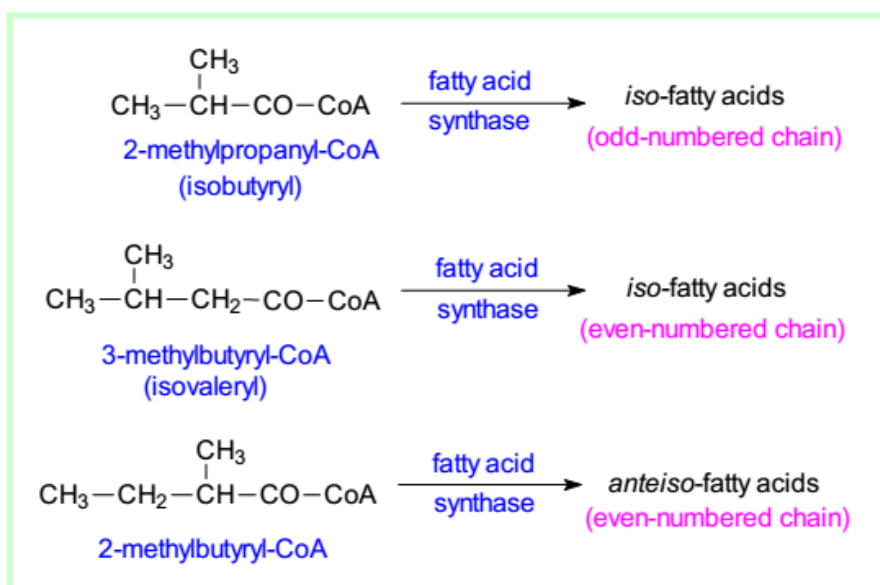


Figure 24. Biosynthèse des acides gras ramifiés. (http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/fa_branç/file.pdf)

A ce jour, il est à noter qu'aucune donnée concernant les lipides et la composition en acides gras du bénitier de l'espèce *T. maxima* n'est disponible dans la littérature, et une étude relative à cet aspect est abordée dans le cadre de cette thèse.

III.1.3.2 Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires, par opposition aux métabolites primaires, ne participent pas à l'assimilation des nutriments et au développement de l'organisme. Ce sont des molécules qui participent à la signalisation, aux défenses (toxines, venins, etc), à l'orchestration des métabolites primaires et dont les voies de synthèse sont généralement activées en réponse à un stimulus externe. Les voies de synthèse des métabolites secondaires peuvent être propres à ces derniers, mais elles dérivent, le plus souvent, des voies de biosynthèse des métabolites primaires. Parmi les métabolites secondaires connus pour jouer un rôle dans la réponse au stress abiotiques se trouvent les caroténoïdes et les *mycosporines like amino acids* (MAAs).

Les caroténoïdes sont essentiellement connus pour leur rôle photoprotecteur, mais ils possèdent aussi d'autres propriétés. Ils sont notamment essentiels pour la reproduction et augmentent l'activité immunitaire. Lorsqu'ils sont contenus dans les téguments, leur couleur (essentiellement orange ou jaune) peut jouer un rôle de camouflage ou de signalisation, indiquant alors la période de reproduction. De plus, certains caroténoïdes, comme les β -carotènes, servent également de précurseurs pour la synthèse de la vitamine A (Maoka, 2011). Enfin, en neutralisant les singulets d'oxygène et en empêchant la peroxydation des lipides, ces molécules présentent une activité anti-oxydante (Maoka, 2011).

Les invertébrés marins contiennent de nombreux caroténoïdes qui sont des pigments organiques présentant des structures extrêmement variées (Britton *et al.*, 2004; Liaaen-Jensen, 1998; Maoka, 2009; Matsuno, 2001). Les principaux caroténoïdes trouvés chez les bivalves sont la fucoxanthine et les métabolites provenant des diatomées (Maoka *et al.*, 2010; Maoka *et al.*, 2008; Maoka *et al.*, 2007). Chez *Pecten maximus*, la péricidine, la pectenolone, la cis-péricidine, l'alloxanthine, le β,β -carotène, l'échinenone, l'astaxanthine et le péricidinol ont été identifiés (Bjerkeng *et al.*, 1993). Les bécitiers ne possèdent pas de fucoxanthine, les principaux caroténoïdes trouvés chez ces organismes sont la péricidine et la pyrroxanthine. Le bécitier *T. squamosa* contient de la péricidine, de la pyrroxanthine, de la diatoxanthine, des β,β -carotènes et de la diadinoxanthine qui semblent provenir des *Symbiodinium* (Figure 25 : Maoka, 2011; Maoka *et al.*, 2011).

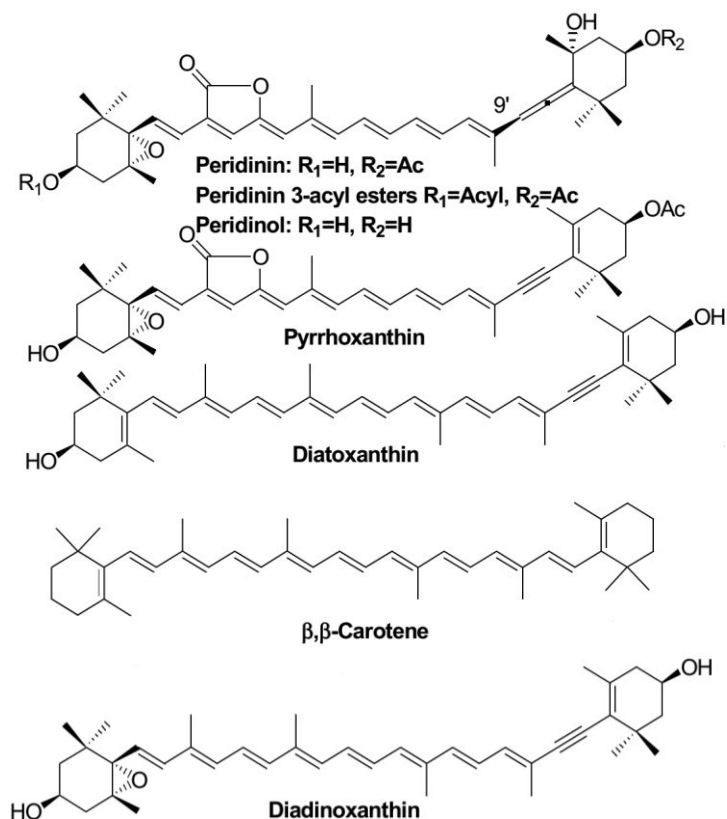


Figure 25. Caroténoïdes identifiés chez le bécitier *T. squamosa*.

(Adapté de Maoka *et al.*, 2011)

En général les animaux ne synthétisent pas les caroténoïdes *de novo*, ces métabolites proviennent de l'alimentation et peuvent être modifiés par diverses réactions métaboliques (Liaaen-Jensen, 1998). Les caroténoïdes trouvés chez les bécitiers correspondent à ceux trouvés chez leurs symbiotes (Skjenstad *et al.*, 1984; Liaaen-Jensen, 1998), ce qui suggère que les bécitiers absorbent directement les caroténoïdes provenant des *Symbiodinium* qu'ils hébergent sans les modifier.

Les MAAs sont des métabolites de petite taille (< 400 Da) possédant un noyau central de type cyclohexanimine différemment substitué, le plus souvent avec un ou plusieurs acides aminés (Mohamadi, 2014). Les MAAs ont été identifiés chez des bivalves symbiotiques et non symbiotiques (Chioccaro *et al.*, 1986a et b; Ishikura *et al.*, 1997). Les Mytilines A et B et la shinorine ont été identifiées chez *Mytilus galloprovincialis* (Chioccaro *et al.*, 1979). La palythine, la shinorine, la porphyra-334 et la mycosporine glycine (Figure 26) ont été identifiées chez les bécitiers de l'espèce *T. crocea*, *T. derasa* et *H. hippopus*, spécifiquement à la surface du manteau et dans le rein (Ishikura *et al.*, 1997; Kicklighter *et al.*, 2011).

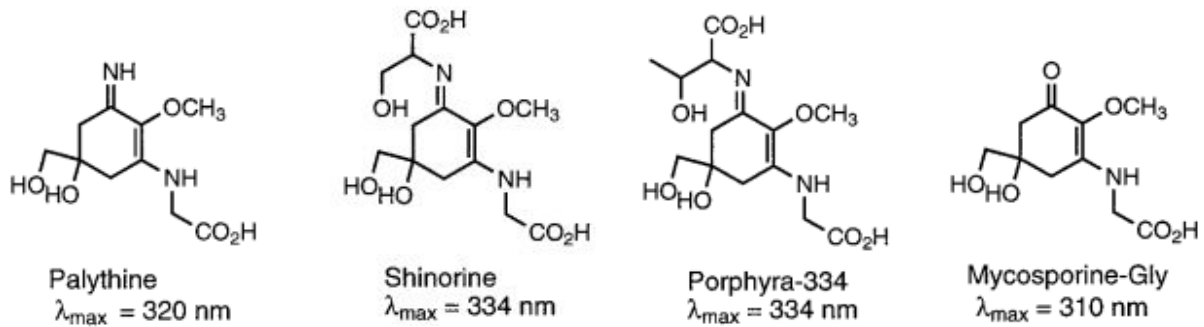


Figure 26. Structure moléculaire des MAAs identifiées chez les bécotiers et leur longueur d'onde d'absorption maximum. (Adapté de Dunlap et Shick, 1998)

Les MAAs sont synthétisés par les organismes symbiotiques. Tout comme les acides aminés aromatiques et leurs dérivés, une des voies de biosynthèse des MAAs est celle du shikimate (Gordon et Leggat, 2010). Chez de nombreux organismes symbiotiques les MAAs identifiées chez l'espèce hôte sont retrouvées dans les *Symbiodinium* qu'ils hébergent (Ishikura *et al.*, 1997). Chez les bécotiers, la palythine, la shinorine, la porphyrine-334 et la mycosporine glycine n'ont pas été retrouvées dans les *Symbiodinium* (Ishikura *et al.*, 1997). Contrairement aux caroténoïdes, les MAAs présents chez les bécotiers semblent donc provenir du plancton ingéré et non des apports des *Symbiodinium*.

Les MAAs ont un spectre UV caractéristique avec un maximum d'absorption compris entre 320 et 360 nm. Cette caractéristique leur confère une activité photoprotectrice. Chez les bécotiers, il est estimé qu'environ 87% des rayons à 310 nm et 90% des rayons à 320 nm sont absorbés avant d'atteindre 0,2 mm de profondeur dans le manteau. Ce mécanisme protège les *Symbiodinium* sous-jacents qui maintiennent ainsi leur activité photosynthétique, contrairement aux *Symbiodinium* libres sous l'effet des mêmes longueurs d'onde (Ishikura *et al.*, 1997). La présence de MAAs chez des bivalves non symbiotiques vivant dans la boue ou le sable, et généralement non exposés aux rayons lumineux, suggère que ces molécules proviennent de l'alimentation et possèdent une autre fonction, encore inconnue, mais essentielle pour ces organismes (Ishikura *et al.*, 1997).

Ainsi, les approches intégrées « omiques » peuvent aboutir à des modélisations de la réponse cellulaire aux changements environnementaux. Chez les mollusques, ce type d'approche n'a été réalisé qu'au cours de deux études qui concernent le bivalve *Crassostrea gigas* (Wei *et al.*, 2014; G. Zhang *et al.*, 2012).

III.2 La réponse à divers types de stress

Les organismes poïkilothermes, dont font partie les bivalves, sont exposés aux fréquents changements des conditions de l'environnement et leur survie dépend de leur capacité à s'acclimater à ces changements. Les bivalves, généralement sessiles, ne peuvent échapper aux stress liés à leur lieu de vie. Les habitats des bivalves marins présentent généralement des conditions variables et instables et la plupart sont soumis aux pressions anthropiques. En effet, la plupart de ces organismes vivent dans la zone intertidale qui peut subir des fluctuations rapides liées à la marée, à la pluie, ou encore aux arrivées massives d'eau douce et de sédiments (Shumway, 1977). En conséquence, les bivalves de ces habitats sont fréquemment exposés à de multiples stress dont la diminution de l'oxygène, de la salinité, des variations importantes de température, ou encore la pollution (Ivanina *et al.*, 2012). De plus, les variations des températures moyennes et extrêmes et de salinité dans les aires marines côtières sont amplifiées par une recrudescence des précipitations et la modification du pH de l'océan liés au changement climatique (Tomanek, 2012). Dans les eaux tropicales, en plus des facteurs environnementaux contraignants qui viennent d'être énoncés, les bivalves marins doivent également faire face à une forte radiation lumineuse (UV = 295-400 nm : Fleischmann 1989).

Il a été démontré que les bivalves présentent des capacités d'acclimatation exceptionnelles face aux variations de leur environnement (Li et Zhao, 2013). Comprendre les mécanismes cellulaires par lesquels ces organismes répondent aux variations environnementales et mettre à jour les facteurs limitant leurs capacités d'acclimatation représente donc un intérêt fondamental sur la compréhension du vivant et des capacités d'adaptation. C'est l'objet de l'étude réalisée dans le cadre de cette thèse sur l'espèce *T. maxima*.

III.2.1 Exemples d'étude intégrative de la réponse au stress

Seulement deux études intégratives semblent avoir été menées à ce jour chez les bivalves, toutes les deux sur l'espèce *Crassostrea gigas* (Wei *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012). La première, réalisée en 2012, a confronté les résultats obtenus par une approche alliant génomique, transcriptomique et protéomique. La seconde, réalisée en 2014, s'est appuyée à la fois sur des données obtenues grâce aux techniques protéomiques et métabolomiques, mais ne s'est pas intéressée à l'expression des gènes. Ainsi, l'étude intégrée des réponses métabolomiques et protéomiques de l'huître *C. gigas* à l'acidification (Wei *et al.*, 2014) a montré une modification du métabolisme énergétique et de la régulation osmotique marquée par des changements au niveau de l'ATP, du glucose, du glycogène, des acides aminés et des osmolytes organiques. Au niveau des organes, la diminution de la quantité d'ATP dans les branchies et l'accumulation

d'ATP, de glucose et de glycogène dans l'hépatopancréas a mis en évidence la différence dans la distribution d'énergie entre ces deux tissus. Les réponses protéomiques ont suggéré que l'acidification océanique n'affectait pas seulement les métabolismes énergétique et primaire, la réponse au stress et l'homéostasie calcique, mais influençait aussi le métabolisme nucléotidique dans les branchies. Enfin, le séquençage et l'assemblage du génome de *C. gigas* ont été réalisés en parallèle de l'étude de l'expression des gènes du développement et de la réponse au stress et de celle des protéines impliquées dans la formation de la coquille (Zhang *et al.*, 2012). Les données génomiques, transcriptomiques et métabolomiques obtenues ont été recoupées afin de caractériser l'adaptation à 9 types de stress incluant la variation de température, de salinité, l'exposition aux métaux et la dessiccation. Les gènes codant pour les HSP, les histones, les protéines inhibitrices de l'apoptose et la production de protéines étaient surexprimés dans la plupart des stress, alors que ceux codant pour la dégradation des protéines étaient sous-exprimés, indiquant ainsi des réponses allant toutes vers le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les gènes impliqués dans la réponse des protéines dénaturées au stress cellulaire dans le réticulum endoplasmique étaient également sous-exprimés, indiquant que le contrôle de la qualité des protéines représente un point critique du maintien de l'homéostasie cellulaire en condition de stress. Ainsi, les résultats ont mis en évidence 4 groupes de gènes impliqués dans la réponse au stress, ceux reliés à la liaison des protéines, à l'apoptose, à l'activité des cytokines et à la réponse inflammatoire. Ils ont également montré que l'expansion des gènes codant pour les protéines de choc thermique, *Hsp70*, et les inhibiteurs de l'apoptose représentent certainement le point central de l'adaptation de l'huître à la vie sessile dans la zone intertidale. Cette étude sur *Crassostrea gigas* a révélé la présence de 88 gènes codant pour la protéine de choc thermique HSP70, alors que l'homme en possède 17 et l'étoile de mer 39. De plus, 48 gènes codant pour les inhibiteurs des protéines de l'apoptose ont été identifiés chez l'huître, alors que seulement 8 sont présents chez l'humain, et 7 chez l'étoile de mer. Il semble donc que l'huître dispose d'un équipement très important pour répondre à divers types de stress, ce qui permettrait d'expliquer la capacité de résistance importante observée chez ces bivalves, qui pourrait être une adaptation à la vie sessile dans la zone intertidale.

III.2.2 Les grandes voies de la réponse aux stress

Les grandes voies de la réponse au stress englobent toutes les voies permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire : défense de l'intégrité membranaire, maintien des structures et des fonctions ainsi que la régulation énergétique. Elles englobent ainsi les protéines chaperones, les protéines anti-oxydantes, les cytokines, mais également les lipides (mobilisation

des lipides de réserve et réarrangement des lipides membranaires), les protéines du cytosquelette, etc. Certaines de ces voies sont développées dans cette partie. Les cas particulier de la réponse au stress thermique et de la réponse des bivalves à divers types de stress sont traités séparément puisqu'ils font l'objet de notre étude.

III.2.2.1 Les protéines chaperones

Une des réponses moléculaires qui contribue le plus à la plasticité chez les bivalves met en jeu les protéines de choc thermique (Fabbri *et al.*,2008). Ces protéines sont une classe de protéines chaperones, initialement découvertes en raison de leur inductibilité par la chaleur, mais en réalité, elles sont induites par une grande variété de stress. Les protéines de choc thermique jouent un rôle clé dans le processus de protection des cellules en rendant leur conformation aux protéines dénaturées, et en aidant à leur élimination lorsque les dommages sont irréversibles. L'augmentation de leur expression est un des premiers composants de la réponse cellulaire au stress et un indicateur clé des stress environnementaux (Lockwood *et al.*,2010). La protéine de choc thermique Hsp70, par exemple, protéine chaperonne ubiquitaire, est présente tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Elle est par conséquent très étudiée dans le cadre de la réponse au stress. Chez l'huître *Crassostrea hongkongensis*, une exposition au cuivre et au vert de malachite conduit à une expression de l'ARNm de l'Hsp 70 clairement dépendante du temps d'exposition (Zhang et Zhang, 2012). Ces résultats indiquent que l'Hsp70 est une protéine inductible qui joue un rôle important dans la réponse à l'exposition à ces polluants, et qu'elle pourrait être utilisée comme biomarqueur moléculaire potentiel de ce type de stress.

III.2.2.2 Les protéines de stress oxydant

La concentration d'espèces actives d'oxygène (EAO) telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes peut croître significativement en période de stress, sous l'effet de la chaleur, de l'acidification du milieu, ou de l'exposition aux ultraviolets par exemple. Cette augmentation peut endommager les structures cellulaires, c'est ce qu'on appelle le stress oxydant. A faible concentration, ces EAO peuvent causer des modifications post-traductionnelles des protéines qui jouent un rôle de signal, ce qui altère leur fonction (McDonagh *et al.*,2006; McDonagh *et al.*,2005). A des concentrations plus élevées, les EAO peuvent entraîner la dénaturation et la dégradation des protéines. Les cellules disposent d'une batterie de protéines qui permettent de lutter contre les effets néfastes des EAO. La réponse protéomique, mise en route chez *Mytilus edulis* suite à l'exposition à des polluants comme les phtalates ou le bisphénol

A, consiste à une augmentation des protéines de stress oxydant telles que la catalase et la superoxide dismutase, qui détoxifient les EAO, ou encore la glutathion S-transférase qui protège contre les EAO (Dalle-Donne *et al.*, 2009). La réponse de *Crassostrea virginica* à l'acidification se manifeste par une augmentation de protéines du stress oxydant dans le manteau, dont la superoxide dismutase, une nucleoredoxine et plusieurs peroxiredoxines. Cette variation quantitative semble provenir d'une modification de l'abondance d'isoformes provenant de modifications post-traductionnelles plutôt que de la synthèse *de novo* (Tomanek *et al.*, 2011 et 2012).

III.2.2.3 La modification du cytosquelette

Le cytosquelette est constitué par l'ensemble organisé de polymères biologiques de protéines qui confèrent à la cellule l'essentiel de ses propriétés mécaniques et structurales. Les variations du cytosquelette sous l'effet du stress sont donc étudiées grâce à la protéomique. Par exemple, l'impact de l'acidification du milieu sur le cytosquelette a été étudié chez deux espèces d'huîtres. Chez *Crassostrea virginica*, la diminution du pH engendre une augmentation de plusieurs isoformes d'actine dans le manteau (Tomanek *et al.*, 2011 et 2012) et chez *Crassostrea gigas*, elle entraîne une diminution de la quantité de lamine et de profiline dans l'hépatopancréas (Wei *et al.*, 2014). Ces protéines sont respectivement une protéine de structure et une protéine qui module la polymérisation de l'actine ; la diminution de leur quantité entraîne donc une modification de la structure du cytosquelette. Ces résultats suggèrent que les protéines du cytosquelette constituent une cible majeure du stress lié à l'acidification. Ainsi, la diminution du pH pourrait entraîner la production d'EAO induisant des modifications des éléments du cytosquelette. Ces changements remettraient en cause l'homéostasie protéique, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la quantité de petites Hsp (Hsp27) afin de stabiliser le cytosquelette (Tomanek, 2012).

III.2.3 Le cas particulier du stress thermique

La température est l'un des plus importants déterminants de la survie, de la croissance et de la reproduction des organismes (Helmuth *et al.*, 2006; Menge *et al.*, 2008). L'analyse de l'expression de plusieurs gènes, utilisés couramment en bio-surveillance (les protéines de choc thermique, la métallothionéine, la glutathion S-transférase, la ferritine, le cytochrome P450 et une kinase) durant le cycle annuel de la moule *Mytilus galloprovincialis*, a permis d'identifier le stress thermique comme l'un des deux principaux modulateurs abiotiques (avec le stress

oxydant (Jarque *et al.*, 2014). Comprendre les mécanismes qui sous-tendent la réponse des organismes au stress thermique devient impératif dans le contexte actuel de réchauffement climatique (Somero, 2010).

Les changements les plus importants dans l'expression génique en réponse au stress thermique sont observés parmi les gènes qui codent pour les protéines de choc thermique, essentiellement les HSP70 (Chapman *et al.* 2011; Lang *et al.* 2009; Lockwood *et al.*, 2010). Chez la moule *Mytilus chilensis*, l'analyse des profils d'expression génique de sept gènes candidats impliqués dans la réponse au stress environnemental (HSP70, HSP90), le métabolisme du fer (ferritine), les pathogènes (Mytilin B, Défensine) et le stress oxydant (SOD-CuZn, catalase) dans différentes conditions environnementales (température de surface, concentration en chlorophylle et sédiments en suspension), a montré que les individus exposés à des températures plus élevées présentent une surexpression des gènes non seulement HSP90, HSP70 mais aussi de la ferritine (Núñez-Acuña *et al.*, 2012). Une surexpression des gènes codant des protéines de choc thermique HSP69 a également été observée chez *Crassostrea virginica* suite à un stress thermique, alors que l'expression d'autres protéines de choc thermique (HSC72-77, HSP60 et HSP90) n'a pas été induite par la chaleur (Ivanina *et al.*, 2009). La quantité de métallothionéines (MTs), des protéines présentant une haute affinité pour les ions métalliques et qui contribuent à la détoxification des cellules, a également augmenté. La température induisant l'augmentation des MTs était plus élevée que celle des HSP69, confirmant ainsi que les protéines de choc thermique constituent un des premiers composants de la réponse cellulaire au stress (Lockwood *et al.*, 2010), réponse optimisée ensuite par d'autres voies comme celle des MT. L'expression d'HSP70 de l'huître creuse *Crassostrea hongkongensis* a considérablement augmenté de 3 à 6 h après un choc thermique (augmentation de 13°C) dans le manteau, les branchies, la glande digestive et le cœur et les muscles, puis a chuté et est retourné au niveau du contrôle à 24 h (Zhang et Zhang, 2012). L'augmentation de la quantité d'HSP en réponse à un stress thermique correspond donc à une réponse transcriptionnelle généralisée à l'ensemble de l'organisme. Cette réponse, rapide et ponctuelle, présente donc les caractéristiques d'une réponse précoce à un stress, confirmant que l'augmentation de l'expression des gènes de ces HSP peut constituer une des premières voies de défense de l'organisme face au stress thermique.

Afin de conserver un état stable intracellulaire, de nombreuses autres voies cellulaires sont également régulées lors d'un stress thermique. Il s'agit, entre autres, de la voie de synthèse des acides gras pour maintenir la fluidité membranaire à son optimum en modifiant la composition des phospholipides en acide gras et ainsi préserver la fonctionnalité enzymatique des nombreuses protéines transmembranaires, les voies permettant de consolider l'architecture cellulaire, d'augmenter le recyclage des protéines dont la durée de vie se trouve réduite dans ces conditions, du cycle cellulaire afin de réduire les dépenses énergétiques occasionnées par des voies non primordiales au maintien de la survie cellulaire. Ainsi, par protéomique, une augmentation de la quantité d'isoformes du protéasome a été observée suite à un stress thermique chez *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus trochus* (Dahlhoff, 2004; Kültz, 2005). Une surexpression des gènes impliqués dans la protéolyse a également été observée chez *Mytilus trochus* lors du stress (Lockwood *et al.*, 2010). Dans le cas présent, la dénaturation des protéines serait non seulement due à l'augmentation de la chaleur mais aussi à leur oxydation suite à la production d'EAOs engendrée par le stress. L'expression de plusieurs protéines G, impliquées dans les voies de modifications du cytosquelette, a également été modifiée. De plus, un changement de l'abondance des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et l'élimination des EAOs a été observé. Comme dans le cas de la réaction à l'acidification, certaines modifications protéomiques ne correspondent pas forcément à une synthèse *de novo* de protéines mais plutôt à une modification de l'abondance des isoformes liée à des modifications post-traductionnelles (Tomanek, 2012).

Au niveau du cycle cellulaire, les gènes codant pour le collagène et les suppresseurs de *cytokine signaling-2* sont surexprimés chez *Crassostrea gigas* lors du stress thermique (Lang *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2013). Ces molécules jouent respectivement des rôles clé dans la croissance et la reproduction. Le gène de la peroxynectine, molécule d'encapsulation qui possède des fonctions adhésives et défensives, est surexprimée lors d'expositions à des températures élevées, augmentant ainsi la résistance aux bactéries (Chapman *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2009). Concernant la régulation lipidique, la quantité d'acides gras hautement insaturés, de longue chaîne carbonée en conséquence, augmente avec la température chez *Argopecten purpuratus* (Farías, 2003). De plus, l'augmentation de température augmente le rapport acide éicosapentaénoïque ou EPA (20:5n-3)/acide arachidonique ou ARA (20:4n-6) de la phosphatidylcholine et diminue le rapport acides gras monoinsaturés/acides gras saturés de la phosphatidyléthanolamine. Le rapport n-6/n-3 des acides gras polyinsaturés des lipides totaux est resté constant aux différentes températures. L'huître *Crassostrea virginica* ajuste son rapport phospholipides/stéroïls ainsi que l'index d'insaturation des lipides polaires lors d'une

acclimatation thermique à long terme (Pernet *et al.*, 2007). La quantité d'acide gras 20:4n-6 dans les branchies de l'huître augmente avec la température, suggérant une augmentation de la disponibilité de ces acides gras pour la biosynthèse d'écossanoïdes durant la réponse au stress.

Ainsi, les différentes approches « omiques » ont permis de dévoiler les principales réactions cellulaires régulées dans le cadre d'un stress. Occasionnant différents dommages, comme la perturbation des activités enzymatiques, source de production accentuée d'EAO, l'augmentation de l'instabilité structurelle des protéines ou l'augmentation de la fluidité membranaire, les voies de réponse, induites ou réprimées, sont par conséquent multiples. Un bilan récapitulatif peut ainsi être dressé (Figure 27).

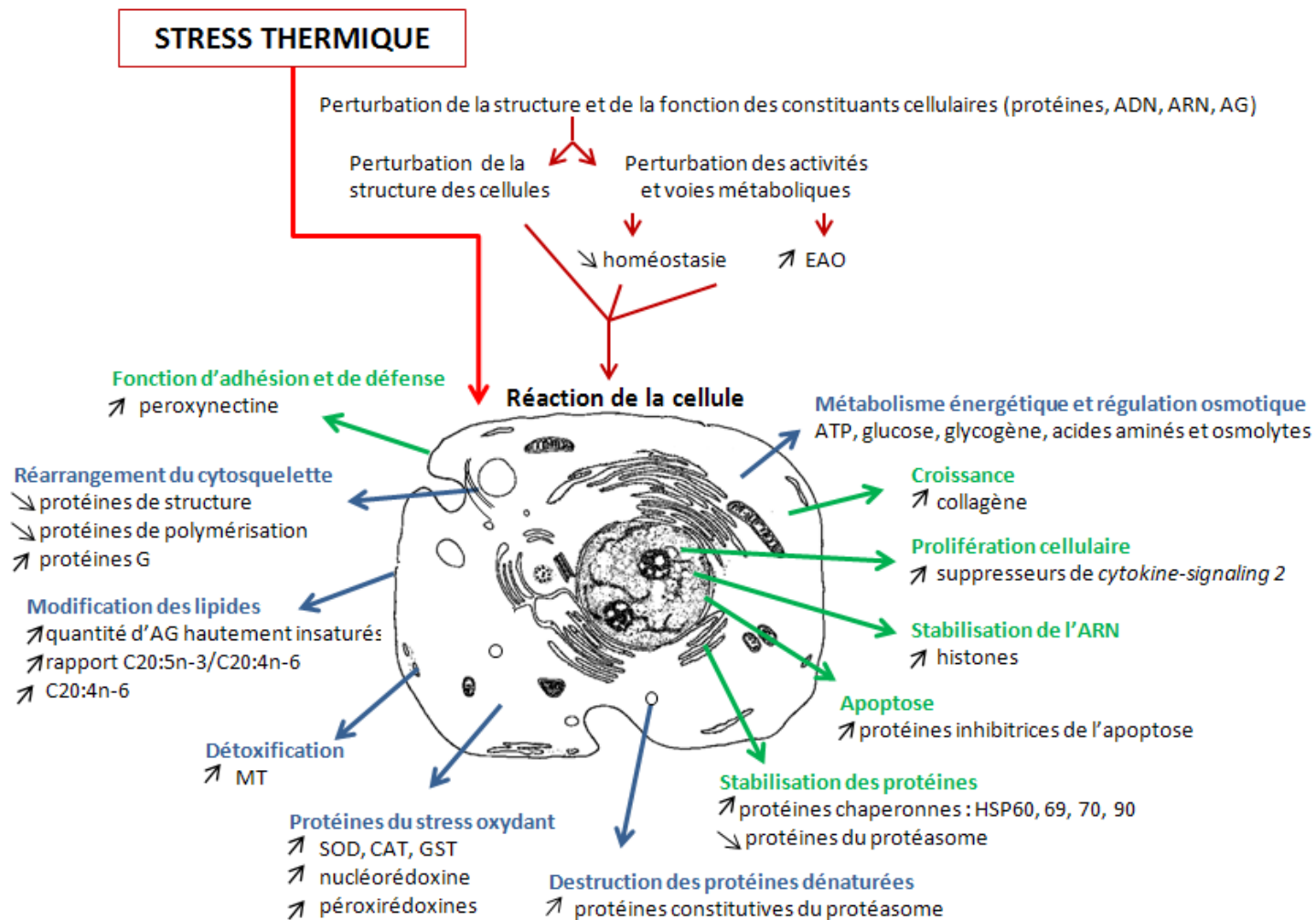


Figure 27. Schéma général de la réponse au stress chez les bivalves. En vert la réponse transcriptomique, en bleu la réponse métabolique.

Il est important de noter que l'expression de nombreux gènes, de fonction inconnue ou partiellement connue voire même connue, varie au cours du stress (gènes sur ou sous exprimés) mais il est difficile d'en interpréter la raison biologique et on ne connaît pas leur rôle dans la réponse aux divers types de stress. La comparaison de multiples approches intégratives devraient permettre de répondre à ces questions.

III.2.4 Le cas particulier des bécotiers

III.2.4.1 Particularités physiologiques et adaptation à différentes conditions environnementales

Bien que les bécotiers soient connus pour être plutôt résistants aux stress environnementaux, plusieurs épisodes de blanchissement et/ou de mortalité massive ont été observés. L'évènement sans précédent de blanchissement massif des coraux qui a touché tous les océans en 1998, suite à l'important épisode d'*El Niño* qui a été directement suivi d'un épisode de *La Niña* tout aussi marqué, a également touché les bécotiers. Un blanchissement massif des bécotiers a été observé aux Maldives (Elder, 1998), en Australie (Hieronymus *et al.*, 2002) et à Takapoto (Tuamotu) en Polynésie française (Addessi, 2001). Aux Maldives, la température de l'eau sur les 15 premiers mètres de profondeur avait atteint 32°C, les vents faibles limitaient les échanges avec la surface, et la houle était également très faible (Elder, 1998). En Australie la température était alors passée de 22 à 32°C en quelques semaines, avec des pluies diluviennes, suivies d'un ensoleillement important (Buck, 2002). En Polynésie française la température de l'eau avait alors dépassé les 30°C pendant 5 mois (de décembre 1997 à avril 1998), avec un pic à 31,8°C au mois de mars (Addessi, 2001). Un épisode de mortalité massive de bécotiers a également été observé en Polynésie française en 2013, et a été attribué aux fortes variations de la température de surface observées en 2009 (Andréfouët *et al.*, 2013). La température semble donc jouer un rôle prédominant dans le déclenchement du blanchissement et de la mortalité des bécotiers, même si d'autres facteurs environnementaux jouent également un rôle dans ces évènements. Les évènements de mortalité massive des organismes lagunaires d'atolls fermés de l'océan Pacifique, observés ces dernières décennies, sont reliés à des conditions climatiques inhabituellement calmes qui ont duré plusieurs semaines. A partir de 11 évènements de mortalité massive qui ont eu lieu entre 1993 et 2012 dans 8 atolls situés au centre du Pacifique sud, les seuils environnementaux (température de surface de l'eau, hauteur de la houle et puissance du vent) nécessaires pour entraîner de tels évènements ont été identifiés et une carte de la répartition spatiale des risques potentiels a été établie. Cette carte met en évidence la vulnérabilité de la partie nord de l'archipel des Tuamotu,

en Polynésie française, qui apparaît comme la zone à plus haut risque (Andréfouët *et al.*, 2014). Des événements dystrophiques peuvent également amener à des mortalités massives des organismes lagunaires, comme à l'atoll d'Hikueru (Tuamotu, Polynésie française) en 1994 (Harris, 1995; Adjeroud *et al.*, 2001).

Dans le cadre d'études ciblées de l'influence de paramètres environnementaux sur la physiologie des bédouilles, l'effet d'une irradiance croissante et d'un stress thermique a été étudiée chez *Tridacna gigas* (Buck, 2002). L'objectif de ces expériences était de déterminer si de fortes intensités lumineuses pouvaient induire des changements en chlorophylle ou altérer la taille et les populations des cellules de *Symbiodinium* dans les tissus. Après 50 jours d'exposition à des intensités lumineuses élevées, les tissus du manteau ont montré un nombre décroissant de *Symbiodinium* par unité de surface. De plus, la taille moyenne des cellules de *Symbiodinium* s'est réduite. Par la suite, les contenus en chlorophylle, chl *a* et chl *c1*, diminuèrent également. Cette étude montre que l'augmentation de l'intensité lumineuse et de la température sont les causes principales du blanchissement chez les bédouilles. Elle confirme les quatre aspects majeurs impliqués dans le blanchissement : (1) perte de l'algue symbiotique, (2) diminution du rapport chl *a/c1* dans l'algue symbiotique restante, (3) rétention de petits *Symbiodinium* dans les tissus et (4) dégagement d'ammonium (NH_4^+) dans la colonne d'eau, tandis que l'absorption d'ammonium est largement bloquée. La combinaison d'une forte intensité lumineuse et d'une augmentation de la température de 10°C a certainement entraîné le blanchissement massif des bédouilles (Buck, 2002).

La réponse physiologique de *T. squamosa* au stress thermique et au stress lié à la présence de cuivre, évaluée par le rapport entre la production brute d'oxygène par la photosynthèse et sa consommation par la respiration, a montré dans les deux cas une diminution significative de ce rapport (Elfwing et Plantman, 2001). Chez les bédouilles exposés au cuivre, cette diminution est causée par la réduction de la photosynthèse, alors que les bédouilles exposés à une augmentation de température ont maintenu un haut niveau de photosynthèse mais ont augmenté de façon significative leur respiration. Les réponses des indices biologiques et des biomarqueurs du stress oxydant ont été étudiées chez les bédouilles de l'espèce *T. maxima* recueillis auprès de deux sites de l'île de Moorea en Polynésie française, différents par leur niveau de contamination. Les niveaux de catalase et d'acide thiobarbiturique étaient significativement plus élevés dans l'hépatopancréas des bivalves recueillis sur le site impacté par rapport au site de référence. Ces résultats indiquent que les bédouilles du site impacté ont été exposés à des contaminants menant

à un stress oxydant et démontrent, pour la première fois, l'utilité de *T. maxima* comme espèce sentinelle pour la biosurveillance des environnements récifaux. La croissance et le comportement d'*Hippopus hippopus* ont été étudiés par sclérochronologie et valvométrie non invasive à haute fréquence. Les valves sont ouvertes en journée et partiellement fermées la nuit durant toute l'année, et la croissance de la coquille est significativement corrélée à l'augmentation de la température, jusqu'à 27°C. Le stress lié à l'augmentation de température peut être relié au stress oxydant physiologique engendré par les *Symbiodinium* présents dans le manteau. Dans le contexte actuel d'augmentation globale de la température des océans ces données indiquent qu'*Hippopus hippopus* est capable de vivre au-delà de ses limites de température de confort (Schwartzmann *et al.*, 2011).

Il est à noter qu'aucune étude métabolomique sur la réponse au stress des bécards ne semble avoir été menée à ce jour. Ce sera l'objet d'une partie de cette thèse, qui constitue ainsi une étude pionnière dans ce domaine.

III.2.4.2 Le rôle des *Symbiodinium* dans la réponse au stress

Les relations symbiotiques entre invertébrés marins et *Symbiodinium* sont connues pour être très sensibles aux changements environnementaux comme le stress hyperthermique. L'évènement de blanchissement de 1998 a réduit de 30 fois la quantité de *Symbiodinium* présent en symbiose avec les individus de *T. gigas* (Leggat *et al.*, 2003). Le blanchissement est connu pour diminuer de façon significative la capacité de reproduction des invertébrés marins symbiotiques résultant dans la réduction de la croissance, de la fécondité et de la survie. Ceci résulte d'une diminution significative du carbone inorganique et du pH de l'hémolymphe ainsi que de la concentration en glucose, le principal photosynthétat exporté depuis les *Symbiodinium*. Une diminution des niveaux d'expression de l'anhydrase carbonique, une enzyme impliquée dans le transport du carbone inorganique aux *Symbiodinium*, a été observée. Même si les niveaux de glutamine synthase du bécard sont restés inchangés, la capacité des bécards à assimiler l'ammonium a disparu chez les individus blanchis, suggérant que les photosynthétats provenant des *Symbiodinium* sont nécessaires à l'assimilation de l'ammonium par le bécard. Lors d'une expérience de blanchissement artificiel, les niveaux de carbone inorganique, de pH et de glucose de l'hémolymphe étaient corrélés au nombre de *Symbiodinium* à la fois durant le blanchissement et le recouvrement. Le recouvrement des populations de *Symbiodinium* a été augmenté 4 fois en ajoutant des nutriments organiques et inorganiques (Leggat *et al.*, 2003). Ces résultats montrent les changements physiologiques profonds qui ont lieu au sein des bécards

pendant et après les évènements de diminution du nombre de *Symbiodinium*. De plus, la diminution des communautés de *Symbiodinium* chez les bécitiers est bien plus importante que chez les coraux blanchis (respectivement divisé par 30 et par 5) (Hoegh-Guldberg et Smith 1989; Jones, 1997). Malgré cette réduction significative des populations symbiotiques et les changements conséquents que cela induit dans leur budget carbone et azote, les bécitiers sont néanmoins capables de se remettre des évènements de blanchissement bien mieux que les coraux. Durant le recouvrement des bécitiers après un évènement de blanchissement induit artificiellement, seuls 3 des 24 bécitiers sont morts, et le taux de survie des bécitiers blanchis naturellement lors de l'évènement de 1998 était de plus de 95%. Ceci contraste avec les rapports qui indiquent que la mortalité de certaines espèces de coraux peut atteindre 99% (Mumby *et al.*, 2001).

Le premier volet de cette thèse porte donc sur l'étude de la diversité génétique des bécitiers de l'espèce *T. maxima* (et des *Symbiodinium* associés) en Polynésie française, réalisée à partir de marqueurs nucléaires et mitochondriaux. Le second volet s'attache à analyser la réponse cellulaire des bécitiers au stress thermique, par le biais d'une approche comparative.

PARTIE II

Matériels et méthodes

I. Stratégie et technique d'échantillonnage

I.1 Choix des sites

I.1.1 Pour l'étude de la diversité génétique

En Polynésie française, l'effort d'échantillonnage s'est porté sur les quatre archipels qui possèdent des bénitiers : la Société, les Tuamotu, les Gambier et les Australes (Annexe 2). En tout 392 prélèvements ont été effectués, sur une étendue de 4 millions de km², avec des sites distants de 2 500 km pour les plus éloignés (Maria et Mangareva). L'ensemble de ces échantillons a été prélevé entre 0 et 1 mètre de profondeur, excepté les 5 échantillons de l'île Maria de l'archipel des Australes, prélevés entre 9 et 17 mètres de profondeur. Les sites d'échantillonnage ont été choisis afin de présenter les caractéristiques les plus diverses possibles, établies selon différents critères : localisation géographique, géomorphologie de l'île (cf I.2.2.2), pression anthropique et densité de bénitiers (Figure 28). Ainsi, 15 îles de Polynésie française ont été échantillonnées. Pour certaines d'entre elles, comme Tahiti par exemple, plusieurs sites ont été choisis en raison de leur taille et de la diversité des critères préalablement définis. 24 échantillons ont été prélevés hors de Polynésie française, 11 à Fidji, et 13 à Tonga. Notre échantillonnage comprend donc au total 402 échantillons de manteau de bénitiers, répertoriés dans l'Annexe 1.

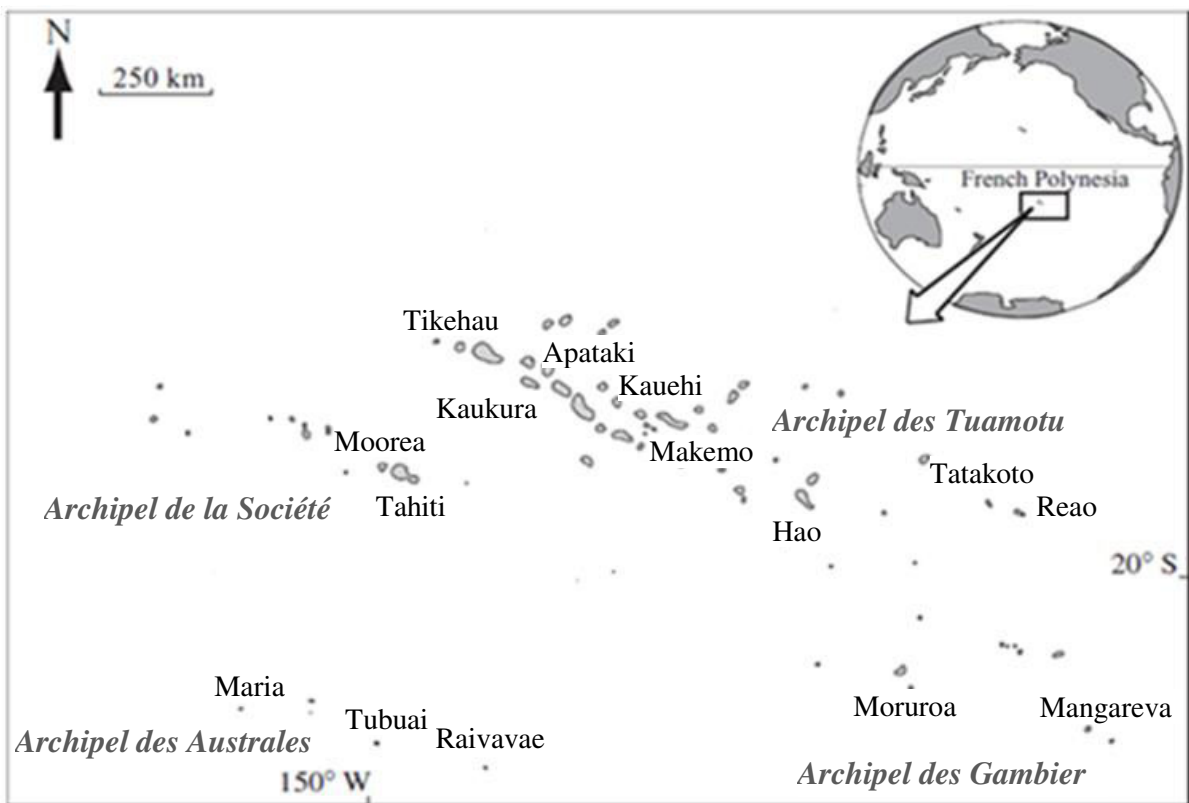


Figure 28. Carte des îles échantillonnées

1.1.1 Pour l'étude de la réponse au stress thermique

Les 168 bénitiers utilisés dans l'étude expérimentale ont été prélevés dans l'environnement. Ils étaient tous de même taille (5 à 7 centimètres – autorisation par arrêté n° 1582 du 23/02/2012 au JOPF) et ont tous été prélevés sur un même site à Paea (PK20, Tahiti : 17° 42' 13,64" Sud – 149° 35' 8,99" Ouest), afin de réaliser l'expérience de réchauffement sur des individus provenant d'une même cohorte.

I.2 Techniques de prélèvement et de stockage

1.2.1 Pour la diversité génétique

De petits morceaux de manteau (environ 1 cm²) ont été prélevés sur chaque bénitier par biopsie, ou en sacrifiant l'animal lorsque cela était nécessaire. Les échantillons prélevés sur le terrain, ont été placés dans un tube de 2 mL avec de l'éthanol à 70% et conservés à -20°C.

1.2.2 Pour les approches « omiques »

Chaque bénitier, prélevé au cours de l'expérience de réchauffement, a été disséqué et le manteau a été séparé en 3 morceaux distincts, chacun étant destiné à l'une des 3 approches développées. Le premier morceau a été placé dans un tube d'1,5 ml et surgelé dans de l'azote liquide, avant d'être stocké à -80°C pour l'approche génomique. Le second morceau de manteau, d'environ 0,1 cm² et utilisé pour l'approche transcriptomique, a été placé dans un tube à vis de 2 ml contenant 500 µL de RNA later. L'échantillon a été placé 24 heures à 4°C avant d'être stocké à -80°C. Pour la métabolomique, le dernier fragment du manteau a été placé dans des pochons en tulle et immédiatement surgelé dans de l'azote liquide avant d'être stocké à -80°C pendant 24 heures, puis lyophilisé (Lyophilisateur « Alpha 1-4 LD plus » de chez Christ) et conservé dans des sacs hermétiques « Tribord » à l'abri de la lumière et de l'humidité. Etant donné que les prélèvements effectués nécessitaient de sacrifier le bénitier, le reste de l'organisme, constitué des viscères, a également été lyophilisé et conservé pour d'éventuelles analyses.

II Expérience de stress thermique

L'expérience de stress thermique a été réalisée avec 4 aquariums, placés en plein air au CRIOBE à Moorea et constamment alimentés en eau, en circuit ouvert. Ces aquariums expérimentaux étaient de même structure et composition (90*53*27 cm). 2 expériences indépendantes ont été menées, l'une à partir du 4 octobre 2012 et la seconde à partir du 23

octobre. Avant chaque expérience, un lot de bécitiers a été réceptionné et placé au moins 15 jours dans un bassin alimenté en permanence par de l'eau de mer afin d'être acclimaté aux conditions de laboratoire, avant l'expérience. Le volume du bassin était de 942 litres et le débit d'eau de 300 litres par heure. Le bassin ainsi que les bécitiers et leur support ont été nettoyés toutes les semaines. Au cours de l'expérience, seuls les aquariums ont été débarrassés des sédiments accumulés sur le fond, au 3^{ème} et 5^{ème} jour.

Le dispositif de réchauffement de l'eau de mer a été mis en place sur 2 des 4 aquariums, en respectant le même volume d'apport d'eau de renouvellement minimum, établi spécialement pour les expériences sur les bivalves (Bayne *et al.*, 1985) et entretenu dans les 4 aquariums, soit un débit de 24 litres/heure pour un volume total de 100 litres. Il était constitué d'un bac de chauffe alimenté constamment par la même source d'eau de mer puisée dans le lagon que celle alimentant les autres aquariums, contenant une résistance thermo-chauffante et un thermostat IC 901 de chez Eliwell France (Figure 29). Les tuyaux reliant le bac de chauffe aux 2 aquariums expérimentaux étaient protégés par une gaine isolante afin de limiter les pertes de chaleur.

Chaque aquarium était équipé d'une pompe de brassage EHEIM Compact 600 / 150 à 600 L/h, d'un thermomètre digital afin de surveiller la température de l'eau en visuel et d'une sonde (Hobo) mesurant en permanence la température et la luminosité placée sur le fond. Tous les aquariums, chauffés ou non, étaient isolés thermiquement par une couverture de survie. Ce dispositif a permis de conserver la variation de température d'1°C observée entre le jour et la nuit dans le lagon.



Figure 29. Photo d'une partie du dispositif en place lors des expériences de réchauffement. Les flèches indiquent les différents composants du dispositif, à savoir : le bac de chauffe (en bleu), les quatre aquariums entourés de couvertures de survie, un afficheur de la température du bac de chauffe (boîtier vert), les tuyaux entourés d'une gaine isolante noire, les thermomètres digitaux blancs accrochés au-dessus des aquariums, la sonde de relevés des aquariums et la pompe de brassage.

En raison du dispositif, la quantité de lumière à la surface des différents aquariums était hétérogène, en fonction de leur emplacement, et systématiquement inférieure à celle du lagon. Afin de palier à la fois au manque de lumière et à cette hétérogénéité au niveau des bacs, des rampes de néon ont été placés au dessus des aquariums. Les lampes étaient allumées au lever du jour et éteintes au coucher du soleil pendant toute la durée de l'expérience. Ainsi la luminosité à la surface des aquariums variait entre 5 500 et 18 000 lux en fonction de l'heure de la journée et des conditions climatiques, d'un même ordre de grandeur qu'au niveau du lagon.

Des mesures des paramètres physiques, dioxygène dissous (mg/ml), conductivité (mS), salinité et saturation en air (%) ont été réalisées à 11 heures tous les jours par la sonde YSI 85. De l'eau était également prélevée à ce moment là, afin de réaliser une mesure du pH dans chacun des aquariums, avec le pHmètre *Cyberscan 6000 series meters* de chez Eutech instruments. Les 1^{er} et 5^{ème} jours de l'expérience, des échantillons d'eau supplémentaires ont été prélevés dans les 4 aquariums. Ils ont été envoyés au laboratoire des moyens analytiques de l'IRD de Nouméa pour analyser les sels nutritifs (Si(OH)_4 , PO_4 , NO_x et NO_2). Les conditions climatiques ainsi que diverses observations à propos des aquariums, telles que la sédimentation, la turbidité, ou encore la présence d'algues ou d'autres organismes ont été notées. L'observation quotidienne

des bénitiers (couleur, ouverture, et réactivité) ainsi que la prise de photos sont venues compléter l'ensemble des informations relevées tout au long de l'expérience.

III. Analyse cytologique

Des fragments de manteaux de deux bénitiers par points de la cinétique et pour chacune des conditions ont été fixés, colorés au DAPI (4',6 diamidino-2' phenylindole dihydrochloride, agent intercalant de l'ADN) puis observés en contraste de phase en fluorescence à l'aide d'un microscope Zeiss (Axio Imager M2). Cette expérience a été réalisée par V Berteaux-Lecellier. La méthode utilisée a été adaptée de Berteaux-Lecellier et al. (Berteaux-Lecellier et al., 1995). Brièvement, les tissus prélevés ont immédiatement été fixés dans une solution de paraformaldehyde à 7,4%. Ils ont ensuite été rincés dans du PBS X1 (PBS X10 : Na₂HPO₄ : 0,8 M ; NaH₂PO₄, 2 H₂O : 0,2 M ; NaN₃ : 0,5 %) puis écrasés à l'aide d'une aiguille entre lame et lamelles polylysées. Une fois écrasé, le matériel a été rincé au PBS + 0,05% puis rincé à nouveau dans une solution de PBS + Triton + DAPI. Après un dernier rinçage à l'eau distillée, les échantillons ont été montés entre lame et lamelles dans une goutte d'antifad (vectashield) puis conservés à -20°C.

IV. Analyse Génomique

IV.1 Extraction d'ADN total

Le même protocole (modifié du protocole Promega Wizard Genomic DNA purification kit) a été utilisé pour extraire l'ADN de chacun des 392 échantillons de bénitiers. Le terme d'ADN total est employé car à la fin de la manipulation, l'échantillon contient l'ADN du bénitier, *Tridacna maxima*, mais également celui des *Symbiodinium*, des bactéries et autres organismes éventuellement présents dans ou sur les tissus recueillis. Le protocole comprend deux étapes, la lyse cellulaire et la précipitation de l'ADN, suivies d'une étape de vérification de la qualité de l'extraction.

Un petit morceau de manteau a été broyé dans 600 µl de « nuclei lysis solution » et une pincée de sable avant d'être placé 3 heures à 56°C. 200 µl de « Proteine precipitation solution » ont ensuite été rajoutés avant de secouer vigoureusement 20 s et de laisser 4 mn dans la glace. Les échantillons ont alors été centrifugés 4 mn à 12 000 g. Le surnageant a été récupéré avec une pipette et placé dans un tube de 1,5 ml contenant 600 µl d'isopropanol. La pelote qui se forme alors indique la présence d'ADN. Le tube a été remué doucement et centrifugé 1 mn à 12

000 g puis le surnageant a été éliminé. 600 µl d'éthanol à 70% ont alors été ajoutés au culot en remuant doucement le tube, puis l'ensemble a été centrifugé 1 mn avant d'éliminer le surnageant. Le culot a été séché environ une demi-heure en recouvrant les tubes d'un papier, puis 50 µl d'ADN rehydratation solution ont été ajoutés. Après 15 mn l'extrait d'ADN génomique total a été homogénéisé par agitation puis centrifugé, incubé 1h à température ambiante avant d'être stocké à -20°C. La qualité et la quantité des ADN obtenus ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8%.

IV.2 Marqueurs génétiques et amorces

La diversité génétique, de *T. maxima* et des *Symbiodinium*, a été étudiée en utilisant des marqueurs génétiques de référence, connus pour être discriminants au moins au niveau du genre, soit un marqueur nucléaire, la région 18S du gène de l'ADNr 45S, et deux marqueurs mitochondriaux, les gènes de l'ADNr 16S et de la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase (*COI*) pour *T. maxima*, et la région 28S du gène nucléaire ADNr 45S pour les *Symbiodinium*.

Ces régions génomiques ont été amplifiées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 4). Les amorces dessinées par Yu (Yu *et al.*, 2000) et Schneider (Schneider *et al.*, 1999) ont été utilisées respectivement pour obtenir des séquences des régions codant pour l'ADNr 18S et l'ADNr 16S. Pour le gène *COI*, l'amorce sens (*COI F* : 5'-cggtaaaacgacggccagtgggtgataattcgaacagaa-3') a été modifiée à partir de l'amorce dessinée par Kochzius et Nuryanto pour *T. crocea* (Kochzius et Nuryanto, 2008) et l'amorce anti-sens (*COI R* : 5'-ggagcggataacaatttcacacaggaacgaacgctgtaatacc-3') a été déterminée à partir de régions hautement conservées trouvées parmi les séquences du gène *COI* de *T. maxima* présentes dans la base de données NCBI. Concernant *Symbiodinium*, différentes amorces ont été utilisées permettant non seulement d'amplifier la région 28S d'intérêt mais aussi d'amplifier des domaines spécifiques de 6 clades de A à F (Yamashita *et al.*, 2011). Pour 19 extraits d'ADN provenant des archipels de la Société, des Tuamotu et des Gambier, une amplification par PCR de la région 28S du gène nucléaire de l'ADNr 45S a été effectuée avec l'un des 2 couples d'amorces universelles de *Symbiodinium*, soit le couple d'amorces déterminé par Loh et Richter (Loh *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2008), dénommé ici Sy_28S F et R, (Figure 30) produisant un fragment d'environ 485 pb, soit avec le couple d'amorces Cri2, déterminé par Wilcox et collaborateurs (Wilcox *et al.*, 1998), donnant alors un fragment de 830 pb.

Tableau 4. Caractéristiques des couples d’amorces utilisés. Séquence des brins sens et non-sens des amorces utilisées pour l’étude de *Tridacna maxima* et de *Symbiodinium* spp, taille du fragment obtenu après amplification et température d’hybridation pour chaque couple d’amorces.

Nomenclature	Séquence amorce F (5'-3')	Séquence amorce R (5'-3')	Taille du fragment	Tm
Tr_18S	ACTATGCCAACCGACTCC (20)	TCCTCCGCTTATTGATATGC (20)	800 pb	50°C
Tr_16S	CGCCTGTTTATCAAAAACAT (20)	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT (22)	462 pb	55°C
Tr_COI	CGGTAAAACGACGGCCAGTG GGTGATAATTCTGAACAGAA (39)	GGAGCGGATAACAATTTACACA GGAACGAACGCTGTAATACC (43)	500 pb	1 : 40°C 2 : 50°C
Cri2	CGCTGAAATTAAGCATATAAG TAAG (25)	AACGATTTGCACGTCAGTATC 521)	830 pb	50°C
Sy_28S	CCTCAGTAATGGCGAATGAAC A (22)	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA (20)	485 pb	50°C
Sy_ Clade A	GATTGTGGCCTTTAGACATAC TACC (25)	CTCTGAGAGCAAGTACCGTGC (21)	126 pb	50°C
Sy_ Clade B	CACATGTCGTGCTGAGATTGC (21)	CTCGCATGCTGAGAAACACGT (21)	108 pb	50°C
Sy_ Clade C	TTGCTGAGATTGCTGTAGGCT (21)	TCCTCAAACAGGTGTGGC (18)	124 pb	50°C
Sy_ Clade D	AATGCTTGTGAGCCCTGGTC (20)	AAGGCAATCCTCATGCGTATG (21)	114 pb	50°C
Sy_ Clade E	CGAGTTTTCACTAGCCTTGTG TG (23)	AGCGTTGCAGCTGACGAG (18)	99 pb	50°C
Sy_ Clade F	ACAGATCTTGCTGAGATTGCT GTG (24)	GAAGGCCGTCCTCAAACAGAC (21)	143 pb	50°C

IV.3 Amplification standard et séquençage

Les amplifications PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 μ l en suivant les prescriptions du fournisseur (Promega GoTaq) (Tableau 5), avec différents profils thermiques adaptés aux amorces utilisées, selon la littérature correspondante (Schneider *et al.*, 1999; DeBoer *et al.*, 2008; Kochzius *et al.*, 2008; Loh *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2011) (Tableau 5). Pour le couple d'amorces Tr_COI, le profil thermique utilisé était spécifique car constitué de 2 températures d'hybridation différentes, et pour les couples d'amorces clades spécifiques de *Symbiodinium*, pour lesquelles les amplifications se déroulaient sur des amplicons (et non de l'ADN génomique), le temps alloué aux cycles de dénaturation, hybridation et polymérisation a été réduit (Tableau 6). Après vérification par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%, avec un contrôle positif constitué d'une amplification d'ADN génomique de *T. maxima* ou de *Symbiodinium* et un contrôle négatif dans lequel l'ADN a été remplacé par de l'eau stérile, les produits d'amplification ont ensuite été purifiés en utilisant le kit Promega « Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System » avant séquençage. 124 séquences *16S*, 335 séquences *COI* et 72 séquences *18S* ont ainsi été obtenues.

Tableau 5. Contenu d'un mélange de réaction PCR pour un tube. A : pour les amplifications avec les couples d'amorces Tr_COI, Tr_16S, Tr_18S et Sy_28S ; B : pour les amplifications avec les couples d'amorces clade-spécifiques.

A.		B.	
Solution	Volume (μ l)	Solution	Volume (μ l)
Tampon 5X	10	Tampon 5X	10
MgCl ₂ 25 mM	4	MgCl ₂ 25 mM	4
dNTP	1	dNTP	1
Amorce sens	1	Amorce sens	1
Amorce non-sens	1	Amorce non-sens	1
GoTaq	0,25	GoTaq	0,25
ADN (10 ng/ μ l)	5	ADN (1 ng/ μ l)	0,5
H ₂ O	QSQ 50 μ l	H ₂ O	QSQ 50 μ l

Tableau 6. Profils thermiques des PCR pour différents couples d'amorces. A : pour les couples d'amorces Tr_16S, Tr_18S et Sy_28S ; B : pour le couple d'amorces Tr_COI ; C : pour les couples d'amorces clade-spécifiques.

A.	Etape	Temps	Température (°C)	Nb de cycles
	Dénaturation	2 minutes	94	1
Amplification	Dénaturation	45 secondes	94	35
	Hybridation	45 secondes	Tm	
	Polymérisation	45 secondes	72	
	Terminaison	5 minutes	72	1

B.	Etape	Temps	Température (°C)	Nb de cycles
	Dénaturation	2 minutes	94	1
Amplification	Dénaturation	45 secondes	94	7
	Hybridation	45 secondes	Tm1	
	Polymérisation	45 secondes	72	
Amplification	Dénaturation	45 secondes	94	30
	Hybridation	45 secondes	Tm2	
	Polymérisation	45 secondes	72	
	Terminaison	5 minutes	72	1

C.	Etape	Temps	Température (°C)	Nb de cycles
	Dénaturation	2 minutes	94	1
Amplification	Dénaturation	5 secondes	94	20
	Hybridation	10 secondes	60	
	Polymérisation	15 secondes	72	
	Terminaison	5 minutes	72	1

IV.4 Amplifications nichées

Pour l'identification des clades de *Symbiodinium*, les 6 couples d'amorces, localisés dans la région 28S amplifiée avec les couples d'amorces universelles, ont été utilisés (Figure 30). Ils permettent d'obtenir des amplifiats d'une centaine de pb dans des régions conservées pour un clade donné. L'efficacité et la spécificité de ces amorces ont été testées à partir d'ADN génomiques de clade isolé, commandés au laboratoire de Marie-Alice Coffroth (Marie-Alice Coffroth, http://www.nsm.buffalo.edu/Bio/burr/BURR_Cultures.html) (Figure 30).

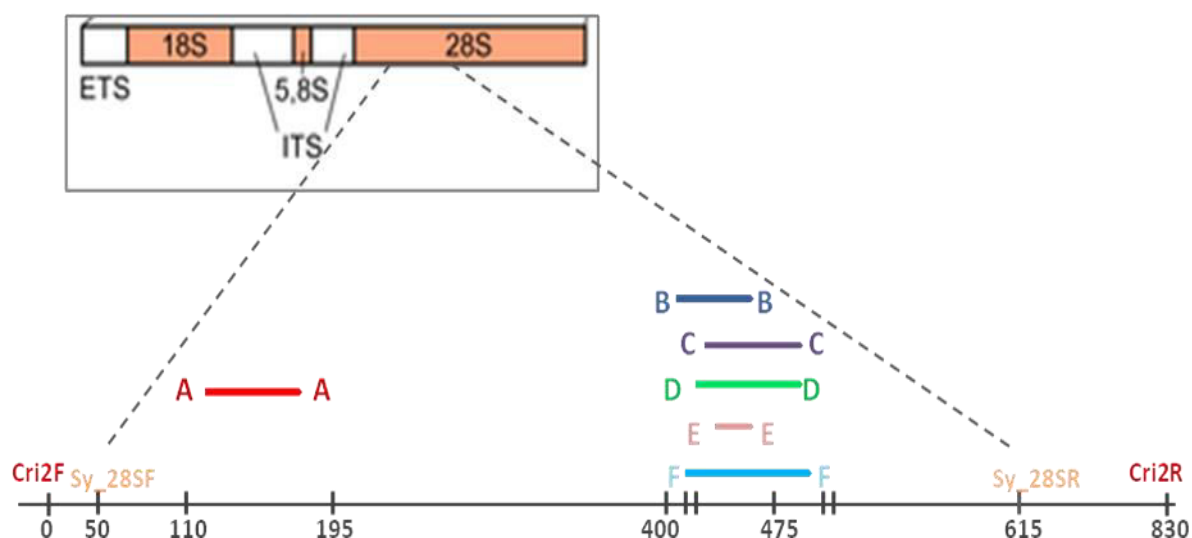


Figure 30. Carte du gène 45S avec un agrandissement de la région 28S. Les amplifiats attendus à partir des amorces spécifiques des clades A à F sont indiqués par la lettre du clade correspondant et une couleur distincte. Les amorces « Cri2 » et « Sy28S » sont seulement placées sur la carte. La région 28S commence 215 bp avant le site de l'amorce Cri2F et contient plus de 4 000 paires de bases.

Une seconde technique de PCR, pour identifier les clades, a consisté à réaliser une première amplification de l'ADN génomique avec l'un des couples d'amorces universelles de *Symbiodinium*, puis de réaliser une seconde amplification de cet amplifiat avec les amorces clade spécifique de A à F. Cette seconde amplification permettait alors de déterminer, par simple observation d'un gel d'électrophorèse (présence/absence d'une amplification), les clades présents au sein de chaque bénitier.

Des techniques récentes (LaJeunesse, 2001) permettent d'identifier avec précision le sous-clade majoritaire présent au sein de l'organisme hôte, mais aucune technique ne permettait jusqu'alors d'identifier plusieurs sous-clades présents dans un même organisme. En collaboration avec Héloïse Rouzé, nous avons développé une technique de PCR nichée permettant d'identifier plusieurs sous-clades lorsque plusieurs clades coexistent chez un même individu. Des PCR ont ainsi été réalisées tout d'abord sur de l'ADN génomique avec des amorces universelles (Cri2 ou Sy_28S), puis sur l'amplicon obtenu avec une amorce Sy_Clade dans un sens et une amorce universelle complémentaire (Cri2 ou Sy_28S) dans l'autre sens. Cette technique opératoire permet l'obtention de produits d'amplification spécifique d'un clade, de plus grande taille que ceux directement obtenus à l'aide des couples d'amorces clade spécifique et peuvent donc être directement séquencés (Figure 31). En fonction du couple choisi, il est ainsi possible d'obtenir 2 amplifiats chevauchants. Une fois concaténée, les séquences d'environ 600 pb,

permettent d'identifier précisément les différents sous-clades de *Symbiodinium* présents au sein de chaque bénitier. 21 échantillons d'ADN génomique provenant de bénitiers prélevés dans l'archipel de la Société (n = 10) et dans l'archipel des Australes (n = 11) ont été ainsi amplifiés et les amplifiats ont été séquencés.

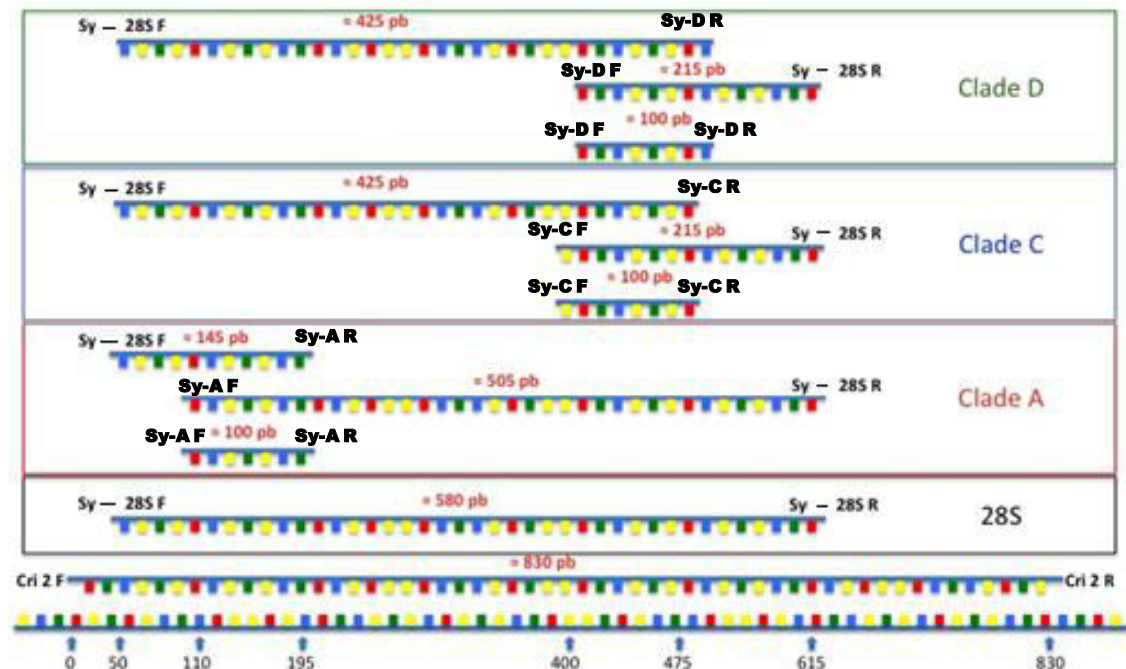


Figure 31. Carte de la région 28S et des amorces utilisées pour identifier les sous-clades de *Symbiodinium* par la technique d'amplification nichée. (D'après Alexandre Mercière, 2013)

IV.5 Analyse des données

Les analyses phylogénétiques ont tout d'abord été réalisées avec le logiciel Mega6.06, en utilisant la commande « *Find Best DNA/Protein Model* » afin de déterminer la méthode de classification la plus adaptée à nos données. Les séquences ont été alignées en utilisant l'option « *ClustalW* » (Thompson *et al.*, 1994) en prenant les paramètres par défaut et nettoyées manuellement afin de minimiser les mésappariements. Dans tous les cas, la méthode statistique conseillée était « *Maximum Likelihood* » avec un test de la phylogénie par la méthode des bootstrap, pour laquelle on a réalisé 500 réplicats. Le calcul des distances a été réalisé avec le modèle « *Tamura-3-Parameter* » et les paramètres « *Uniform rates* » et « *Complete deletion* ». Cette analyse a également été réalisée selon un modèle Bayésien à l'aide du logiciel MrBayes. La méthodologie employée est présentée dans l'article joint en annexe. L'arbre phylogénétique réalisé avec les échantillons du Pacifique a été construit avec la méthode de Maximum Parcimony.

Les mesures de diversité moléculaire pour toutes les populations ont été réalisées avec le logiciel Arlequin version 3.5.1.2 (Excoffier et Lischer, 2010). Le détail du protocole suivi est également décrit dans l'article joint en annexe.

V. Analyses transcriptomiques

V.1 Extraction d'ARN total

L'ARN total de 29 échantillons pour la réalisation du transcriptome *de novo* de *T. maxima* et de 168 échantillons pour l'étude de l'expression différentielle a été extrait. Le protocole est inspiré de la fiche « Trizol Reagent » Cat. No. 15596-018, et comprend 4 étapes : homogénéisation, séparation, précipitation et lavage, suivies de la mise en suspension pour vérification de la qualité des échantillons avant de les sécher. Afin de garantir une qualité optimale des ARN extraits, l'ensemble du matériel utilisé au cours de l'extraction a été stérilisé à l'autoclave pendant 40 minutes et toutes les surfaces ont été traitées au RNase Zap juste avant manipulation.

Chaque échantillon a été rincé avec 500 µl de PBS, dilacéré au scalpel dans une boîte de pétri sur glace et transvasé immédiatement dans un tube de 2ml contenant 500 µl de Trizol (Invitrogen). Ensuite, 3 phases de congélation-décongélation ont été réalisées avant de laisser agiter toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons homogénéisés ont été incubés 5 mn à 15-30 °C, secoués vigoureusement 30 secondes puis centrifugés à 12 000 g pendant 10 mn entre 2 et 8 °C. Le surnageant a ensuite été transféré en totalité dans un tube propre. La séparation des acides nucléiques et des protéines a été réalisée en ajoutant 100 µl de chloroforme et en secouant vigoureusement les tubes à la main pendant 15 secondes avant de les laisser incuber pendant 2-3 mn à 15-30 °C et de les centrifuger à 12 000 g pendant 15 mn, entre 2 et 8 °C. Le surnageant a ensuite été précautionneusement transféré dans un tube contenant 250 µl d'isopropanol et 250 µl d'eau pour précipiter l'ARN, et l'ensemble a été incubé 10 minutes entre 15 et 30°C. Les échantillons ont été centrifugés à 12 000g pendant 15 mn, entre 2 et 8 °C. Le précipité d'ARN formait alors un gel au fond et sur le côté du tube. Le surnageant a ensuite été retiré par inversion et le culot d'ARN a été lavé avec 200 µl d'éthanol 80% avant centrifugation à 7 500 g pendant 5 mn, entre 2 et 8 °C. Le surnageant a été vidé et la pelote d'ARN a été séchée 5 minutes « tête en bas » puis repris dans 50 µl d'eau RNase free en mélangeant plusieurs fois à l'aide de la pipette. La qualité et la quantité des ARN obtenus ont été évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du TBE 0,5X à 50 mV. Les ARN ont ensuite été séchés 1h30 sous vide à température ambiante et conservés à -80°C.

V.2 Séquençage, assemblage et annotation

Le séquençage des ARNs a été réalisé par les sociétés Genoscreen ou MacroGen. Le séquençage des échantillons a été réalisé selon un protocole Shotgun 2X100bp (454) sur un HiSeq2000 chez les 2 prestataires. La qualité des séquences a été vérifiée par les prestataires avant leur réception. L'assemblage et l'annotation du transcriptome *de novo* ont été réalisés au laboratoire par G. Lecellier. Brièvement, après vérification et élimination des séquences de faibles qualités (logiciels FastQ / Trimm), l'assemblage a été réalisé avec la suite velvet/Oases et Trinity. L'assemblage avec Trinity a présenté la meilleure couverture fragments bruts/contigs et a été retenu pour la suite. Les contigs présentant une forte homologie (>95% d'identité) avec les ceux des transcriptomes de *Symbiodinium* de la base de données genbank (identifiant genbank : GAKY, GAFO, GAFP), ont été retirés. Les phases ouvertes de lecture ont été ensuite recherchées (Transdecoder) et seuls les contigs présentant une phase de plus de 30 codons, ont été conservés. Les différents transcrits ont alors été comparés (Blast/HMMER) avec les bases de données protéiques spécialement adaptées pour les annotations (Gene Ontology / KEGG2). Les 38 échantillons d'ARN de l'expérience de réchauffement ont été séquencés par la société Genoscreen selon le même protocole que précédemment. La profondeur de lecture représentait 2 à 5 Gb de séquences par échantillon.

V.3 Analyse des données transcriptomiques

L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée au laboratoire, à partir du transcriptome nouvellement obtenu. La couverture des fragments de 100 bp sur le transcriptome a été réalisée avec le logiciel Bowtie2. L'estimation normalisée des niveaux d'expression en fonction de cette couverture (HMM-FKPM) à été réalisée à l'aide du logiciel RSEM. Enfin, l'analyse différentielle a été effectuée à l'aide des applications EdgeR et DeSeq2 sous R. Afin de pouvoir réaliser des analyses et des représentations à façon, de nombreuses routines ont été réalisées manuellement sous R ou Scilab.

VI. Analyses métabolomiques

Les analyses métabolomiques ont été réalisées au laboratoire de chimie du CRIOBE (le LCBE) situé sur le site de l'université de Perpignan Via Domitia (UPVD). Le métabolome étant composé de métabolites aux propriétés physico-chimiques très différentes, notamment en termes de polarité, cela a nécessité l'emploi de différentes techniques d'extraction et de préparation.

VI.1 Tests anti-oxydants

Le pouvoir antioxydant des échantillons a été estimé par C. Bertrand au LCBE avec le test au radical libre DPPH. Une cinétique a été établie pour différentes concentrations (échantillon brut, échantillon dilué 10 fois et 100 fois) afin de déterminer le temps optimal pour effectuer les mesures au spectrophotomètre. Ces mesures ont été réalisées en triplicat.

VI.2 Dosage des lipides totaux

Le dosage des lipides totaux des échantillons a été réalisé par C. Bertrand au LCBE en utilisant une méthode sulfophosphanillique adaptée de Drevon et Schmit (Drevon et Schmit, 1964) et maîtrisé par la société AkiNaO.

VI.3 Extractions des métabolites secondaires totaux et des lipides

Les manipulations ont consisté à extraire les métabolites présents au sein des 168 échantillons de bénitier lyophilisés, selon un protocole d'extraction biphasique optimisé par Fahoullia Mohamadi lors de son doctorat réalisé au LCBE. Le but est d'extraire la portion la plus large possible du métabolome des bénitiers de façon simple et reproductible.

Le protocole d'extraction des métabolites s'est déroulé sur deux jours. Tout le matériel utilisé était en verre afin d'éviter une contamination liée à l'utilisation de plastique. La première étape, la préparation des échantillons pour l'extraction, consiste à lacérer chaque l'échantillon lyophilisé dans un mortier avant de l'écraser avec un pilon, puis transférer la poudre obtenue dans un bécher propre et taré, et peser. Préparer extemporanément les étalons internes, 500 ml de 5 α -androstan-3 β -ol (Santa Cruz Biotechnology) et 500 ml d'acide 5 β -cholannique (Sigma-Aldrich) à 20 μ g/ml dilué dans de l'éther. Prélever 250 μ l de chacun des produits et le placer dans le bécher contenant l'échantillon. Homogénéiser et fermer la hotte afin de laisser l'éther s'évaporer toute la nuit. L'androstanol sert d'étalon pour la quantification des stérols, le cholanic acid pour celle des acides gras. Une séparation solide-liquide biphasique est ensuite réalisée avec un mélange binaire de solvants non miscibles, le dichlorométhane et l'eau, et un solvant pont, le méthanol. Cette séparation est qualifiée de « all-in-one » (extrait total). Pour cela, l'échantillon était transvasé dans un tube à essai propre, et la manipulation suivante était répétée trois fois : ajouter 2 ml de méthanol et 0.5 ml d'eau, placer dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes, ajouter 2 ml de dichlorométhane et 2,5 ml d'eau et placer à nouveau 10 minutes aux ultrasons, puis transvaser la partie liquide dans un tube à centrifugation en Nalgen à l'aide d'une pipette en verre. Centrifuger ensuite 10 minutes à 2 500 g afin que les phases

polaire et apolaire se séparent. Prélever la phase apolaire à l'aide d'une pipette Pasteur et la placer dans un tube à essai, puis mettre 1 ml de cette phase dans un tube à hémolyse pour l'analyse des lipides. Sécher ces extraits organiques sous flux d'azote. Prélever la phase polaire à l'aide d'une pipette Pasteur et la placer dans un tube à vis en verre, congeler à -20°C avant de lyophiliser. Les différents extraits ont ensuite été recouverts de papier aluminium afin de les protéger de la lumière, et conservés à -20°C.

VI.4 Techniques chromatographiques

VI.4.1 Préparation des échantillons

VI.4.1.1 Stérols, acides et alcools gras

Le protocole de préparation des stérols, acides et alcools gras de la phase apolaire, est une adaptation de Xu *et al.* 2010, qui se déroule en deux étapes ; la première permet de transestérifier (méthylation) les acides gras pour obtenir des esters méthyliques d'acides gras. Elle consiste à : solubiliser la phase apolaire sèche avec un peu de solvant (dichlorométhane plus méthanol) puis de la transvaser dans un vial avec un septum. Ajouter ensuite 1,5 ml de méthanol, 0,3 ml d'acide chlorhydrique méthanolique à 8% (MeOH : H₂O 85/15, v/v) et 0,2 ml de toluène qui rend l'ensemble miscible, et laisser 15 minutes aux ultrasons avant de placer les tubes 16 heures au bain-marie à 45°C. Extraire à deux reprises l'échantillon avec 2 ml de solution d'hexane et de dichlorométhane (4/1, v/v) puis transvaser le surnageant dans un vial 5 ml avec un septum taré. Sécher la phase organique obtenue sous flux d'azote, puis peser. L'extrait sec comprend alors les stérols natifs et les esters méthyliques d'acides gras (fames), il est conservé en chambre froide ou passé directement à l'étape de dérivation. La seconde étape consiste à réaliser une dérivation des stérols par une réaction de silylation, ce qui les rend moins polaires et plus volatils. Pour réaliser cette seconde étape, il faut ajouter précautionneusement aux préparations 100 µl de pyridine et 100 µl de N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) et les placer à nouveau 16 heures au bain-marie à 45°C. Dans le cas où l'extrait organique transméthylé et silylé était limpide, il a été placé directement dans un vial contenant un réducteur, si il était trouble il a été centrifugé afin de ne récupérer que le surnageant. Après cette réaction, les échantillons ne sont pas stables, il faut donc les traiter rapidement.

VI.4.1.2 Fraction apolaire totale

Pour les analyses en CLHP-SM de la fraction apolaire, les échantillons secs, ont été pesés et préparés à 1 mg/ml par ajout de la quantité de méthanol nécessaire.

VI.4.2 Obtention des profils métabolomiques

Les métabolites extraits des bénitiers étaient préalablement répartis en deux phases, les polaires et les apolaires. Ces deux phases ont été analysées par chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (CLHP-SM). Pour la phase apolaire, une préparation spécifique permet également d'en extraire les stérols et les acides/alcools gras. Ces échantillons ainsi préparés ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).

VI.4.2.1 L'analyse en CG-SM

La chromatographie gazeuse est une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe et de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés volatils ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition, comme les stérols et les acides gras dans cette étude.

La séparation a été réalisée sur une colonne Supelco SPB 50 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Le volume injecté était de 1 µl avec un split de 50 :1. Le débit du gaz vecteur (hélium) était de 1 ml/min. La méthode choisie a été adaptée de celle mise au point sur les coraux par Fahoullia Mohamadi (Mohamadi, 2014). La température du four après injection était maintenue à 150°C pendant 3,5 minutes, puis augmentée de 20°C par minute jusqu'à atteindre 200°C, température maintenue pendant 10 minutes, puis augmentée de 3°C par minute jusqu'à atteindre 280°C, température maintenue pendant 30 minutes avant diminution de 25°C par minutes jusqu'au retour à la température de départ, 150°C. Les molécules étaient ionisées avec une énergie de 70 eV. La température de la source était de 250°C et celle de l'interface de 290°C. La détection en masse était réalisée sur une fenêtre m/z de 40 à 600 uma. Un vial contenant uniquement du solvant, le dichlorométhane, était injecté avant chaque série, puis à nouveau tous les 8 échantillons. Les 168 échantillons ont été passés dans un ordre aléatoire.

VI.4.2.2 L'analyse en CLHP-SM

Les 168 échantillons de la phase apolaire ont été analysés en CLHP-SM, les 168 échantillons de la phase polaire ont été conservés pour une utilisation ultérieure. Comme pour la CG-SM, tout le matériel utilisé était aussi de la marque *Thermo scientific*. Les analyses ont requis l'utilisation d'un détecteur à barrette de diodes PDA detector et d'une pompe Accela 600. La phase apolaire a été chromatographiée sur une colonne Kinetex Phenylhexyl 1.7u en utilisant deux solvants : le solvant A composé d'H₂O CLHP + 1% d'acide formique, le solvant B d'acétonitrile + 1 % d'acide formique. Le volume d'injection était de 2 µl et le débit de 200

µl/min. La méthode d'élution graduée utilisée, nommée "Phenylhexyl5", a été adaptée de la méthode développée par Fahoullia Mohamadi (Mohamadi, 2014), pour les coraux (Tableau 7). Les 168 échantillons ont été chromatographiés dans un ordre aléatoire.

L'analyse chromatographique a été réalisée avec le logiciel Xcalibur, en utilisant le système Accela pour déterminer les paramètres suivants : température des vials 12°C, température du four 30°C et réglage du détecteur UV sur la plage de longueur d'onde allant de 200 à 800 nanomètres. Les caractéristiques du spectromètre de masse sont notées dans le Tableau 8.

Tableau 7. Conditions analytiques en CLHP-SM

Extrait	Eluants	Colonne	Volume d'injection (ml)	Débit (µl/min)	Gradient d'élution
Organique	A : H2O + 1% AF B : CH3CN + 1% AF	Phenomenex Kinetex Phenylhexyl 1.7u	2	200	Temps % (A/B) 0 – 17 mn 55/45 25 mn 0/100 27 mn 55/45 30 mn 55/45 32 mn 100/0

Tableau 8. Conditions analytiques en CLHP-SM : spectromètre de masse

Conditions	C ₁ : ionisation ESI+	C ₂ ionisation ESI + / ESI -
Température d'évaporation	320 °C	350°C
Tension de la source ESI	3,5 kV	4 kV / -3 kV
Tension du capillaire de transfert	4,5 V	25 V /-40 V
Tension du tube lens	78 V	90 /-125 V
Débit du gaz ionisant (<i>sheath gas</i>)	40	40
Débit du gaz de balayage (<i>sweep gas</i>)	3	2
Débit du gaz auxiliaire (<i>Auxiliary gas</i>)	10	15
Plage de masse	200-1000 Da	200-2000 Da

VI.5 Analyses des données chromatographiques

Pour chacun des chromatogrammes, la détection, définition, quantification et annotation des pics a été réalisée par C. Bertrand au LCBE. Les matrices ont ensuite été analysées au laboratoire à l'aide de l'application MixOmics sous R, permettant d'effectuer des analyses discriminantes telles que la PLS-DA (« *Partial List Square Discriminant Analysis* ») ou ADMC pour « Analyse Discriminante Des Moindre Carrés ». Les données ont été standardisées pour chaque échantillon (valeur unitaire de 10^6 unité d'absorbance) et normalisées ($\ln(n+1)$) avant de réaliser les analyses comparatives.

PARTIE III

Diversité génétique de *Tridacna maxima* et communautés de symbiontes associées en Polynésie française

La diversité génétique de *T. maxima*, ainsi que les communautés de *Symbiodinium* vivant en symbiose avec cette espèce de bénitier, sont caractérisées pour la première fois en Polynésie française grâce à cette étude, par le biais de deux techniques : le barcoding et l'analyse des gènes exprimés chez ces deux organismes. Les résultats relatifs à la diversité génétique de *T. maxima* font l'objet d'un article soumis (Annexe 1).

I. Approche par barcoding

I.1 *Tridacna maxima*

I.1.1 *Choix des 3 marqueurs génétiques étudiés : COI, 16S et 18S*

Le gène codant le cytochrome c oxydase I (*COI*) est couramment utilisé en barcoding en raison de sa capacité à caractériser les espèces animales. Il code la dernière enzyme de la chaîne respiratoire de transport d'électrons, constituée d'un grand complexe protéique transmembranaire présent dans la membrane mitochondriale. En raison de son taux de divergence important, il représente un marqueur génomique intéressant pour la discrimination intraspécifique. Entre autres, l'utilisation de ce marqueur a permis de mettre en évidence une différenciation génétique significative entre populations de *T. maxima* de la région de l'Indo-Pacifique ouest (Kochzius et Nuryanto, 2009).

Le gène mitochondrial ubiquitaire ADNr *16S*, codant l'ARN 16S de la petite sous-unité ribosomique mitochondriale, est généralement utilisé dans les études interspécifiques, comme par exemple chez les Tridacnides (Schneider *et al.*, 1999), où il a permis de discriminer et d'établir les liens de parenté de 8 espèces différentes. Néanmoins, il a été choisi dans notre étude car une diversité intraspécifique a été mise en évidence grâce à ce marqueur chez des individus de *Tridacna maxima* provenant de différentes régions de la Mer Rouge (Richter *et al.*, 2008) et il a également permis de discriminer 3 clades chez *Tridacna crocea* dans le Triangle de Corail (DeBoer *et al.*, 2008).

Les marqueurs moléculaires mitochondriaux présentent l'avantage d'éviter les problèmes liés aux multiples copies de gènes (*i.e* évolution concertée, Plohl *et al.*, 2008), ils se sont avérés très utiles à différents niveaux phylogénétiques et, même si ce n'est pas toujours vrai pour les bivalves (Breton *et al.*, 2007; Passamonti et Ghiselli, 2009), leur héritage est généralement strictement maternel (Birky, 2001; Gillham, 1994), ce qui réduit le temps nécessaire pour qu'une lignée révèle des modèles phylogéographiques (Avice, 2000).

Contrairement aux deux précédents, l'ADNr 18S est nucléaire. L'ARNr 18S est l'ARN de la petite sous-unité du ribosome, également conservé dans l'ensemble des organismes vivants ; sa séquence est très utilisée pour réaliser des études de phylogénie. L'ARN de la petite sous-unité est le contrôleur de la fidélité de la traduction, il subit donc une forte pression de sélection et présente généralement un faible taux de divergence. De nombreuses études phylogénétiques sur les Tridacnidae, dont trois incluant *Tridacna maxima* (Maruyama *et al.*, 1998 ; Williams *et al.*, 2004 ; Taylor *et al.*, 2007), ont utilisé l'ARNr 18S. Ce marqueur génétique a été choisi tout d'abord car il est nucléaire, ubiquitaire, mais également pour voir si il était possible de discriminer nos échantillons avec un marqueur génétique peu variable à l'échelle intra-spécifique.

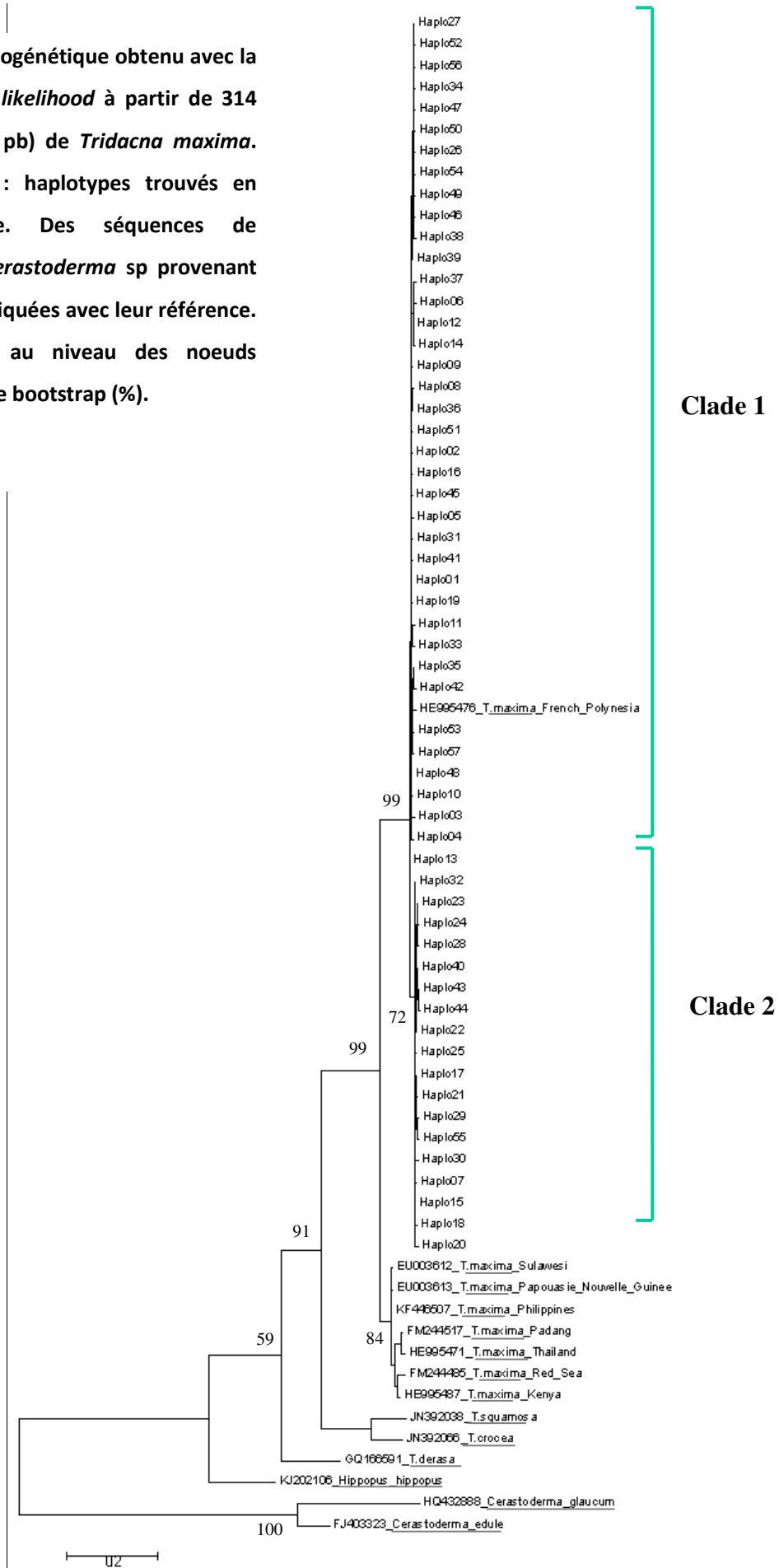
1.1.2 Diversité des 3 marqueurs génétiques et phylogénie

Après alignement et nettoyage des séquences obtenues à partir des amplifications faites pour chacun des trois marqueurs, les tailles des séquences étaient pour *COI*, *16S* et *18S* respectivement de 461 pb, 392 pb et 604 pb.

Les 314 séquences *COI* analysées n'ont révélé aucun double pic ni codon stop, suggérant l'absence d'hétéroplasmie ou de copies nucléaires d'ADN mitochondrial. La conversion en séquence d'acides aminés a amené à une succession de 153 acides aminés. 9 substitutions non synonymes ont été observées (acides aminés 9, 10, 43, 95, 96, 101, 109, 126 et 133) mais ces modifications n'altèrent pas les caractéristiques des domaines protéiques. 57 haplotypes ont été identifiés, ce qui représente 18% de diversité. Pour les marqueurs *16S* et *18S*, ce résultat est bien inférieur, avec 5 haplotypes obtenus à partir des 102 séquences du gène *16S*, soit 5% de diversité et 5 haplotypes obtenus à partir des 68 séquences *18S*, soit 7% de diversité. Sur les trois marqueurs choisis, *COI* semble donc être le seul qui permette de discriminer les échantillons de *T. maxima* provenant de populations différentes en Polynésie française.

L'analyse phylogénétique des 57 haplotypes obtenus avec les séquences des amplifications d'une partie du gène *COI* révèle la présence de deux lignées distinctes, comprenant respectivement 39 et 18 haplotypes. Cette divergence est soutenue par une forte valeur de bootstrap (99% : Figure 32). De plus, nos séquences de Polynésie française constituent une grande lignée monophylétique distincte de celles constituées par les échantillons de *T. maxima* de l'Indo-Pacifique et de la mer rouge. Dans ce cas également la divergence est soutenue par une forte valeur de bootstrap (99% : Figure 32).

Figure 32. Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode *Maximum likelihood* à partir de 314 séquences *COI* (461 pb) de *Tridacna maxima*. Haplo01 à Haplo57 : haplotypes trouvés en Polynésie française. Des séquences de *Tridacnidae* et de *Cerastoderma* sp provenant de *GenBank* sont indiquées avec leur référence. Les chiffres situés au niveau des noeuds indiquent la valeur de bootstrap (%).



Parmi les 57 haplotypes identifiés, certains ne se retrouvent que sur un seul site géographique. Ces haplotypes, observés une seule fois parmi les 314 échantillons analysés avec le marqueur *COI*, ont été trouvés essentiellement sur Tahiti, site sur lequel l'effort d'échantillonnage a été le plus important. 6 haplotypes, obtenus à parmi les échantillons de Raivavae, n'ont pas été retrouvés sur les autres îles, de même que 3 haplotypes trouvés à Reao, 2 à Makemo, et 1 à Apataki, Kauehi, Makemo, Tatakoto, Maria, Tubuai et Mangareva (Tableau 9).

Tableau 9. Localisation géographique des haplotypes uniques

île	Nb haplotypes observés une seule fois/Nb échantillons
Tahiti	20/201
Raivavae	6/27
Reao	3/9
Makemo	2/11
Apataki	1/4
Kauehi	1/5
Makemo	1/10
Tatakoto	1/10
Maria	1/4
Tubuai	1/4
Mangareva	1/7

L'analyse phylogénétique des séquences de l'ADNr *16S* provenant de 10 sites (Tahiti, Moorea, Tikehau, Kaukura, Kauehi, Makemo, Mangareva, Raivavae, Tubuai et Maria) révèle que les 5 haplotypes sont très proches, qu'ils appartiennent bien à l'espèce *T. maxima*, et qu'ils se distinguent des haplotypes de cette même espèce provenant d'autres régions du monde (Figure 33). En Polynésie française l'haplotype 16SPF01 est le plus répandu avec 97 séquences provenant de l'ensemble des 11 sites échantillonnés, l'haplotype 16SPF02 n'a été observé que chez un échantillon de Tahiti (Mahina PV7), 16SPF03 chez un échantillon de Makemo (K5), 16SPF04 chez 2 échantillons de Raivavae (MM4 et RR4) et 16SPF05 chez un échantillon de Moorea (H1). Si on prend 16SPF01 comme référence, les 4 autres haplotypes ne divergent que par un seul nucléotide et la modification est à chaque fois une transition, en position 233 pour 16SPF02, 304 pour 16SPF03, 386 pour 16SPF04 et 388 pour 16SPF05.

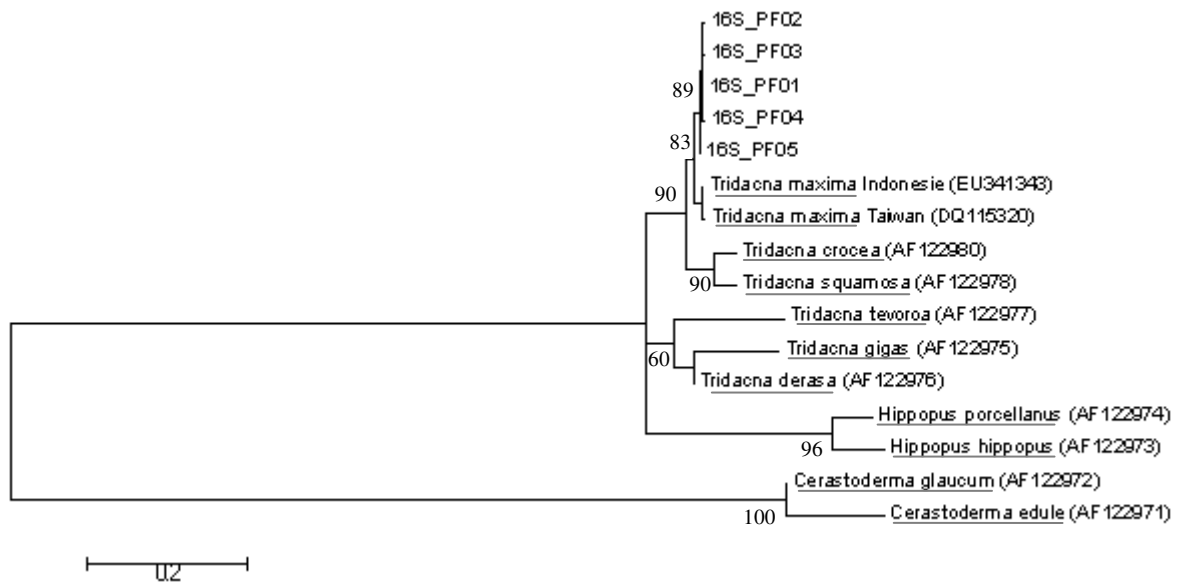


Figure 33. Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode *Maximum likelihood* à partir de 102 séquences 16S (392 pb) de *Tridacna maxima*. 16SPF01 à 16SPF05 : haplotypes trouvés en Polynésie française. Des séquences de Tridacnides et de *Cerastoderma* sp tirées de *GenBank* sont indiquées avec leur référence. Les chiffres situés au niveau des noeuds indiquent la valeur de bootstrap.

L'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr 18S révèle, comme pour l'ADNr 16S et le gène *COI*, qu'ils appartiennent bien à l'espèce *T. maxima*, et qu'ils se distinguent des haplotypes de cette même espèce provenant d'autres régions du monde (Figure 34). En Polynésie française l'hapotype 18SPF02 est le plus répandu, il est présent chez 64 individus provenant des 9 sites étudiés, Tahiti, Moorea, Tikehau, Makemo, Mururoa, Mangareva, Tubuai et Raivavae. Les 4 autres haplotypes n'ont été trouvés qu'une seule fois : 18SPF01 et 18SPF03 à Mangareva, 18SPF04 à Raivavae, 18SPF05 à Tubuai. Si on prend 18SPF02 comme référence, 18SPF01 diffère par une transversion et une transition, respectivement en position 48 et 451, 18SPF03 par une transversion en position 48, 18SPF04 par une transition en position 276, 18SPF05 par une transversion et une transition, respectivement en positions 48 et 51. Dans l'arbre phylogénétique 18SPF01 et 18SPF05 se détachent puisqu'ils présentent deux substitutions. 18SPF01 et 18SPF03 sont proches puisqu'ils présentent la même transversion (en position 48).

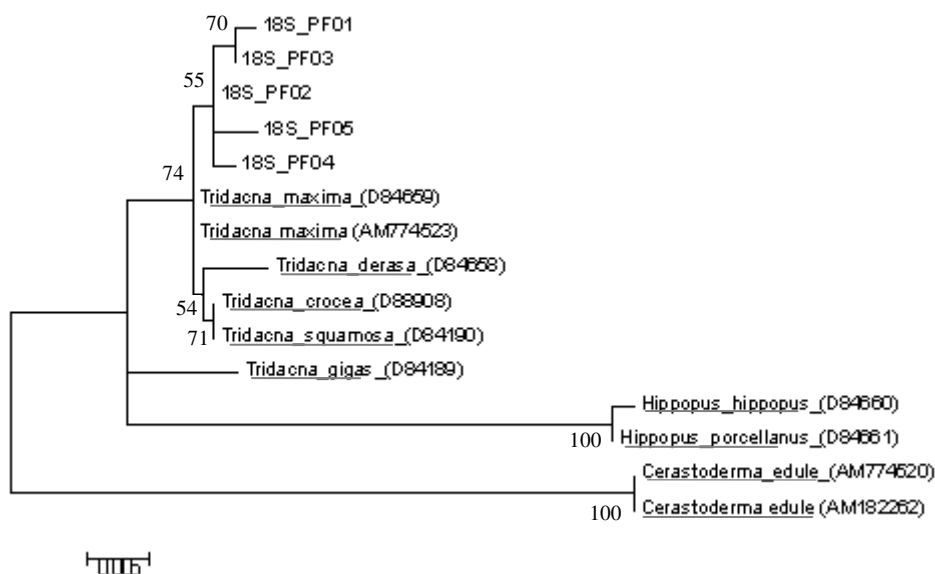


Figure 34. Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode *Maximum likelihood* à partir de 68 séquences *18S* (604 pb) de *Tridacna maxima*. 18SPF01 à 18SPF05 : haplotypes trouvés en Polynésie française. Des séquences de Tridacnidés et de *Cerastoderma* sp issues de *GenBank* sont indiquées avec leur référence. Les chiffres situés au niveau des noeuds indiquent la valeur de bootstrap.

Le bilan de l'ensemble des données obtenues avec les marqueurs génétiques *COI*, *16S* et *18S* est regroupé dans le Tableau 10. La taille de la séquence étudiée représente le nombre de sites informatifs. Un singleton représente un haplotype qui est le seul à avoir une mutation sur un site précis. Un site parcimonieux est un site sur lequel plusieurs haplotypes présentent une substitution. Si cette substitution est semblable chez tous les haplotypes alors le nombre de substitutions dans les sites parcimonieux est identique au nombre de sites parcimonieux, dans le cas où les haplotypes présentent des substitutions différentes sur les sites parcimonieux, alors le nombre de substitutions dans les sites parcimonieux est supérieur au nombre de sites parcimonieux.

Tableau 10. Bilan des substitutions observées pour les séquences *COI*, *16S* et *18S*.

Séquences	Taille de la séquence étudiée	Nb haplotypes	Nb sites divergents	Nb singletons	Nb sites parcimonieux	Nb substitutions dans sites parcimonieux	Nb substitutions total
<i>COI</i>	461	57	52	29	23	26	55
<i>16S</i>	392	5	4	4	0	0	4
<i>18S</i>	604	5	5	4	1	1	5

Comme attendu, les trois phylogénies réalisées respectivement avec les données sur *COI*, *16S* et *18S* ressemblent fortement aux trois phylogénies publiées par Huelsken (Huelsken, 2013). Toutefois, on note l'apparition d'une nouvelle grande lignée monophylétique pour le taxon de *T. maxima*, correspondant à nos échantillons de Polynésie française (Figure 35). La lignée de *T. maxima* spécifique de la Polynésie française diffère des autres espèces avec une divergence des séquences *COI* moyenne (distances 2 à 2 non corrigées) de 13,7% avec *T. crocea*, 16,8% avec *T. derasa*, 16,2% avec *Tridacna sp* (la nouvelle espèce de Tridacnidae décrite par Huelsken), 14,3% avec *T. squamosa* et 9,0% avec *T. maxima* hors Polynésie française, comparé à 10,4% entre *T. squamosa* et *T. crocea*. Les deux clades distincts de la lignée spécifique de la Polynésie française sont séparés par une distance moyenne de 3,3%. Ainsi, les résultats obtenus avec les 3 marqueurs génétiques utilisés sont cohérents puisqu'ils mettent tous en évidence une particularité géographique parlante des échantillons de Polynésie française, ainsi que la présence de deux clades distincts. L'un des deux présente une diversité plus importante pour les trois marqueurs génétiques. Ce résultat suggère que la population correspondante connaîtrait une phase d'expansion plus importante que l'autre pour une même vitesse de divergence.

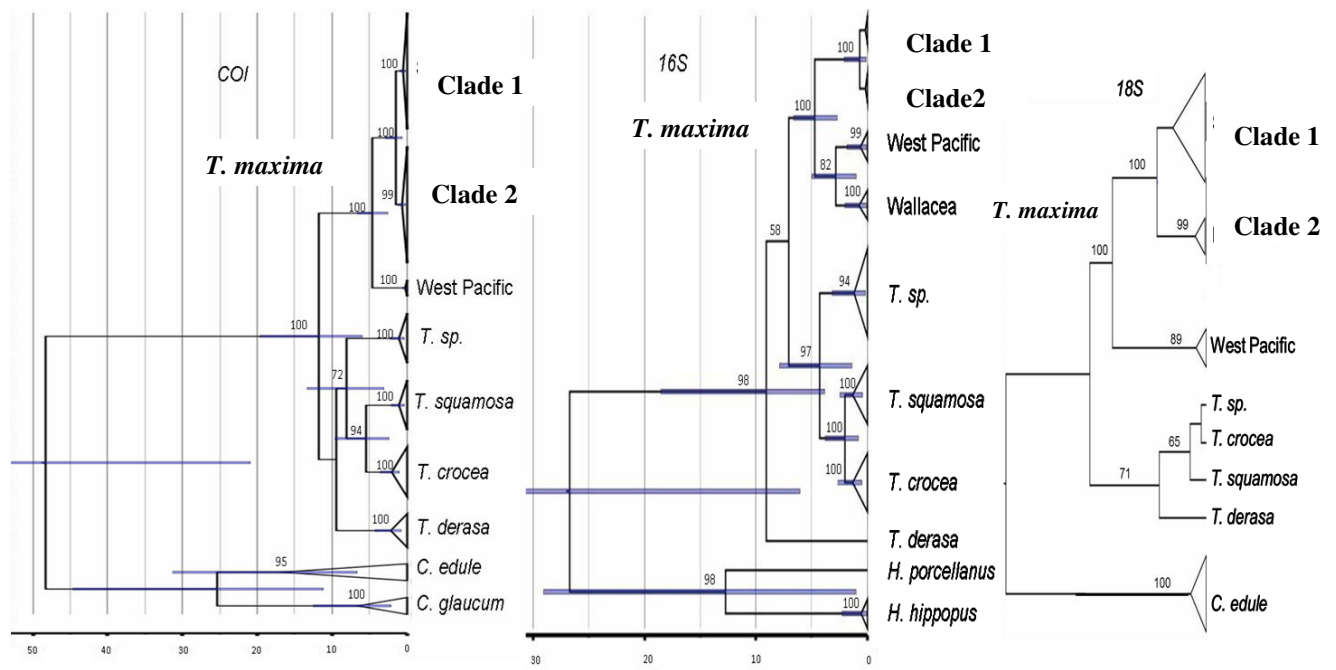


Figure 35. Relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Tridacna* basées sur des arbres phylogénétiques Bayésiens réalisés à partir de séquences d'ADNmt *COI* et *16S* et nucléaires *18S*. La topologie de l'arbre de crédibilité maximale et calibré dans le temps a été élaboré selon un modèle "naissance-mort". Les probabilités postérieures sont indiquées sur les branches. L'intervalle de confiance à 95% du poids des noeuds est représenté par un rectangle bleu pour les noeuds significatifs.

Les arbres phylogénétiques calibrés dans le temps, réalisés pour *COI* et *16S* (Figure 35), ont montré des estimations de l'âge des nœuds en accord avec les données fossiles (Harzhauser et al., 2008; J. a Schneider & Foighil, 1999). Pour *T. squamosa*, l'âge de la divergence est daté à 1,06 millions d'années (Ma) avec l'arbre réalisé avec le marqueur génétique *COI*, et 1,28 Ma avec le marqueur *16S*. Pour *T. crocea*, les estimations sont 1,99 Ma et 1,3 Ma, respectivement. Concernant la lignée de *T. maxima* spécifique à la Polynésie française, la divergence entre les deux clades est estimée à -1,5 Ma (entre -0,66 et -2,77, avec un intervalle de confiance de 95%, pour *COI*) sachant que la première datation fossile de *T. maxima* est estimée à -5,3 Ma.

L'héritage uniparental (strictement maternel) de l'ADN mitochondrial a été remis en question chez de nombreux bivalves (Breton *et al.*, 2007; Passamonti et Ghiselli, 2009). Aucune étude n'ayant porté sur les Tridacnidae, nous avons choisi de considérer aussi bien les marqueurs mitochondriaux que nucléaires afin de déterminer si les deux lignées trouvées en Polynésie française pouvaient se croiser. Parmi les 5 haplotypes trouvés respectivement avec les séquences d'ADNr *16S* et *18S*, un haplotype majoritaire se détache à chaque fois : 16SPF01 pour *16S*, 18SPF02 pour *18S*. Cet haplotype correspondrait à l'haplotype de l'ancêtre commun. Les individus partageant cet haplotype ancestral proviennent aussi bien de la lignée *mapiko nord* que de la lignée *mapiko sud*, lignées définies grâce aux séquences de l'ADN de *COI*. Les autres haplotypes, extrêmement rares ($n = 1$ ou $n = 2$ individus), sont systématiquement spécifiques d'une des deux lignées. Pour l'ADNr *18S* toute la diversité haplotypique apparaît dans la lignée sud, alors que pour l'ADNr *16S* si la majorité de la diversité haplotypique apparaît également dans la lignée sud, on en trouve également dans la lignée nord. Les haplotypes du gène *16S* de la lignée *mapiko sud* correspondent aux haplotypes *18S* de cette même lignée. Les 2 haplotypes du gène *16S* apparus au nord sont associés à l'haplotype ancestral *18S*, commun aux deux lignées. L'impossibilité de détecter des ségrégations ou recombinaisons génétiques entre les deux clades dans cette configuration ne permet donc pas d'indiquer si les deux lignées de *T. maxima* présentes en Polynésie française sont capables de se croiser.

1.1.3 Diversité génétique et connectivité

En raison du faible nombre d'haplotypes 16S et 18S, seule la région *COI* a été analysée afin de calculer la diversité génétique, de réaliser des tests de neutralité et d'estimer la distribution des populations de bécotiers pour chaque site étudié (Tableau 11).

1.1.3.1 La diversité génétique

Les diversités haplotypiques (h) et nucléotidiques (π) les plus faibles ont été observées à Hao ($h = 0,20$ et $\pi = 0,04$) et à Tahiti Sud ($h = 0,46$ et $\pi = 0,43$), quand les valeurs de h et de π étaient aux alentours de 0,8 et 0,65 respectivement pour les autres populations (Tableau 11). Les tests de neutralité réalisés pour chacun des sites étudiés ne rejettent pas l'hypothèse nulle d'une évolution neutre, excepté à Raivavae, Makemo et Tahiti Sud (valeurs négatives significatives du test de Tajima, respectivement de -2.12, -1.72 et -1.70) et pour Tahiti Ouest (valeur du test F_u 's F_s de -13.96). Ces résultats suggèrent une expansion de la taille de ces populations ou une sélection au sein de ces populations. L'hypothèse d'expansion de la population est supportée par des valeurs d'indice de la distribution des mésappariements *SSD* et *HRI* non significatives seulement à Makemo, alors que pour les populations de Raivavae, Tahiti Sud et Tahiti Ouest, une déviation significative aux distributions *SSD* et *HRI* attendues rejette l'hypothèse nulle d'expansion démographique. Cependant, la distribution des mésappariements est multimodale, suggérant que ces populations sont néanmoins stables depuis longtemps. Au final, le modèle de neutralité n'est pas rejeté.

Tableau 11. Tableau des résultats statistiques et des tests de neutralité des différents sites étudiés en Polynésie française.

*0,05≥P≥0,01; **0,01>P≥0,001; ***P<0,001; NS, non significatif.

Site	Régions géographiques	Diversité Génétique				Tests de neutralité		Distribution des mésappariements	
		n	N _{hp}	h	Π (pourcentage)	Tajima's D	Fu's F _s	SSD	HRI
Maria	Australes	5	3	0.70 +/- 0.22	0.43 +/- 0.34	-1.12 ^{NS}	0.64 ^{NS}	0.09 ^{NS}	0.29 ^{NS}
Tubuai		5	4	0.90 +/- 0.16	0.65 +/- 0.48	-0.75 ^{NS}	-0.33 ^{NS}	0.17 ^{NS}	0.67*
Raivavae		27	11	0.70 +/- 0.10	0.61 +/- 0.37	-2.12**	-2.92 ^{NS}	0.55***	0,06 ^{NS}
Mangareva	Gambier	8	3	0.61 +/- 0.16	0.71 +/- 0.46	0.26 ^{NS}	2.75 ^{NS}	0.16 ^{NS}	0.29 ^{NS}
Reao	Tuamotu est	10	6	0.84 +/- 0.10	0.88 +/- 0.54	0.21 ^{NS}	-0.10 ^{NS}	0.10 ^{NS}	0.15 ^{NS}
Tatakoto	Tuamotu nord	10	5	0.82 +/- 0.10	0.50 +/- 0.34	-1.53 ^{NS}	-0.27 ^{NS}	0.05 ^{NS}	0.19 ^{NS}
Hao		10	2	0.20 +/- 0.15	0.04 +/- 0.07	-1.11 ^{NS}	-0.34 ^{NS}	0.33 ^{NS}	0.4 ^{NS}
Makemo		11	4	0.67 +/- 0.12	0.49 +/- 0.33	-1.72*	1.05 ^{NS}	0.023 ^{NS}	0.07 ^{NS}
Kauehi		5	3	0.80 +/- 0.16	0.52 +/- 0.39	0 ^{NS}	0.95 ^{NS}	0.11 ^{NS}	0.36 ^{NS}
Tikehau		6	3	0.80 +/- 0.12	0.93 +/- 0.62	1.28 ^{NS}	2.58 ^{NS}	0.14 ^{NS}	0.22 ^{NS}
Kaukura		4	3	0.83 +/- 0.22	0.87 +/- 0.65	-0.82 ^{NS}	1.16 ^{NS}	0.16 ^{NS}	0.31 ^{NS}
Apataki		5	5	1.00 +/- 0.13	1,01 +/- 0.74	1.19 ^{NS}	-1.17 ^{NS}	0.12 ^{NS}	0.20 ^{NS}
Moorea	Société	7	3	0.67 +/- 0.16	1,18 +/- 0.74	1.77 ^{NS}	3.76 ^{NS}	0.21*	0.49*
Tahiti ouest	Société	181	31	0.77 +/- 0.03	0.69 +/- 0.40	-1.18 ^{NS}	-3.96***	0.70 ^{NS}	0.18*
Tahiti sud		8	3	0.46 +/- 0.20	0.43 +/- 0.31	-1.70*	1.57 ^{NS}	0.31***	0.23 ^{NS}
Tahiti nord		12	5	0.58 +/- 0.16	0.63 +/- 0.40	-0.84 ^{NS}	0.69 ^{NS}	0.12 ^{NS}	0.34 ^{NS}

1.1.3.2 Structure spatiale de la variation génétique

Afin de déterminer la répartition des variations génétiques entre les régions, les différences de *Fst* ont été analysées. Le premier axe d'une échelle multi-dimensionnelle réalisée à partir de ces différences a discriminé les îles des Tuamotu des autres îles (Tableau 12).

Parmi ces groupes, l'île de Moorea se détache puisqu'elle présente une très faible différence de *Fst* avec les îles situées au nord des Tuamotu. Au contraire, le site Tahiti ouest est significativement isolé des autres sites. Dans l'archipel des Tuamotu, deux groupes distincts ont été observés : Tuamotu nord et Tuamotu est (Figure 36). L'analyse AMOVA a mis en évidence une structure génétique significative entre les différents archipels ($F_{CT} = 0.3404$, $p\text{-value} = 0.005$: Tableau 13). Cette structure significative est encore plus prononcée quand les populations des Tuamotu sont séparées en 2 (nord et est) ou 3 groupes : nord-ouest, centre et est, et les autres populations ensemble ($F_{CT} = 0,47293$ et $0,47327$ respectivement, $p\text{-value}$ (probabilité d'obtenir la même valeur du test si l'hypothèse nulle est vraie) = 0).

Tableau 12. Différences 2 à 2 des Fst entre les populations et p-value associée.

En haut : non significatif (-), 0.01<p<0.05 (+), 0.001<p<0.01 (++) , p<0.001 (+++). En bas: différences 2 à 2 des Fst entre les populations

	Maria	Tubuai	Raivavae	Mangareva	Tahiti-est	Tahiti-sud	Tahiti-ouest	Moorea	Tikehau	Apataki	Kaukura	Reao	Tatakoto	Hao	Makemo	Kauehi
Maria		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	++
Tubuai	-0,02459		-	-	-	-	++	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
Raivavae	-0,03015	-0,06325		-	-	-	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mangareva	0,01718	-0,01944	0,02721		-	-	+++	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	++
Tahiti-est	-0,03672	-0,03489	0,00269	-0,07716		-	+++	-	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Tahiti-sud	-0,03896	-0,02564	-0,03747	-0,07692	-0,08182		++	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Tahiti-ouest	0,20452	0,21303	0,22638	0,19779	0,20132	0,18391		+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Moorea	0,1609	0,07599	0,20405	-0,02949	0,07665	0,10624	0,3119		-	-	-	++	+++	+++	+++	-
Tikehau	0,42659	0,32004	0,42895	0,17998	0,30233	0,37294	0,4523	-0,00114		-	-	+	++	+++	-	-
Apataki	0,34932	0,2637	0,39495	0,13601	0,25575	0,31152	0,29753	-0,0095	-0,06782		-	-	-	++	+	+
Kaukura	0,52096	0,41463	0,49837	0,25294	0,37846	0,47208	0,46597	0,01154	-0,18343	-0,17889		-	-	+++	-	-
Reao	0,55824	0,50337	0,57516	0,41724	0,49139	0,53333	0,40442	0,28528	0,22584	0,0064	0,12171		-	-	+++	++
Tatakoto	0,73946	0,68714	0,68927	0,59246	0,64483	0,70767	0,5576	0,42765	0,31453	0,14894	0,18772	0,00347		-	+++	+++
Hao	0,91851	0,87759	0,78706	0,79053	0,79829	0,88047	0,63506	0,65037	0,61251	0,47596	0,61132	0,17949	0,03419		+++	+++
Makemo	0,70384	0,63675	0,6454	0,51839	0,58727	0,66071	0,61328	0,31139	0,02112	0,18752	-0,04487	0,35961	0,33938	0,60833		-
Kauehi	0,75	0,67233	0,68849	0,57105	0,63607	0,71814	0,66088	0,34768	0,11168	0,23077	0,07376	0,37987	0,38262	0,71852	0,01916	

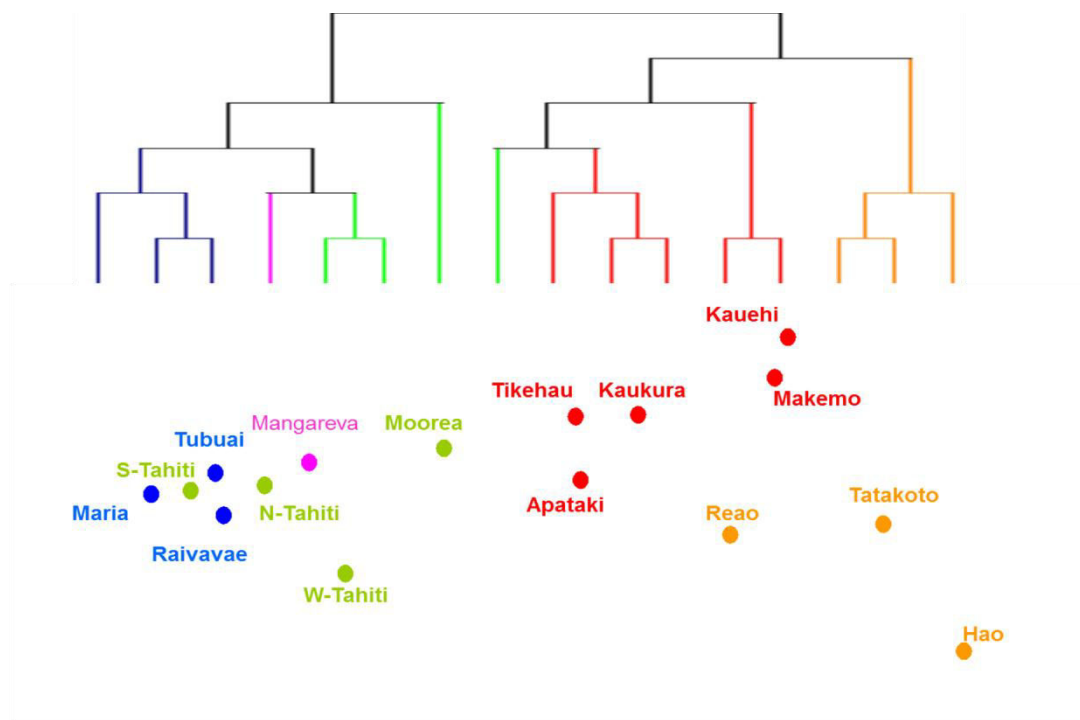


Figure 36. Echelle multi-dimensionnelle associée au regroupement hiérarchique des différences 2 à 2 des *Fst* entre les populations. La topologie de l'arbre est une classification hiérarchique ascendante des différences de *Fst* entre les populations des différents sites. Les axes 1 et 2 du MDS représentent respectivement 68,7% et 24,1% de la variance totale. Les groupes géographiques sont symbolisés par des couleurs (branches de l'arbre et points pour la MDS) : rouge pour les Tuamotu de l'ouest, orange pour les Tuamotu de l'est, rose pour les Gambier, vert pour la Société et bleu pour les Australes. Les îles ou les sites d'échantillonnage sont indiqués sous les points. L'île de Tahiti comprend 3 sites d'échantillonnage : Tahiti-ouest (W-Tahiti), Tahiti-sud (S-Tahiti) et Tahiti-nord (N-Tahiti).

Tableau 13. Test AMOVA avec valeurs de *Fst* et *Fct*

p<0.001 (***) p<0.005 (**), p<0.05 (*)

	Au sein des populations				Entre les populations	Fst	Fct	Fct p-value	
	Au sein des groupes		Entre les groupes						
	Var	%Var	Var	%Var					
Sans barrière			1,06638	40,64	1,55735	59,36	0,40644		
Tuamotu vs Society vs Australes vs Gambier	0,98568	34,04	0,37924	13,1	1,53051	52,86	0,4714	0,34043	**
Tuamotu-est vs Tuamotu-nord vs Society vs Australes vs Gambier	1,14196	39,43	0,22403	7,73	1,53051	52,84	0,4716	0,39426	***
Tuamotu-est vs Tuamotu-nord vs Society vs Polynésie-sud	1,17381	40,29	0,20905	7,18	1,53051	52,53	0,47466	0,4029	***
Tuamotu-est vs Tuamotu-nord vs Tahiti vs Moorea vs Australes vs Gambier	1,15741	40,63	0,16079	5,64	1,53051	53,73	0,46274	0,40629	***
Tuamotu-est vs Tuamotu-nord vs Polynésie-sud	1,65013	47,29	0,30849	8,84	1,53051	43,87	0,56135	0,47293	***
Tuamotu-est vs Tuamotu-nord vs Tuamotu-sud vs Tuamotu-centre	1,64408	47,33	0,29928	8,62	1,53051	44,06	0,55942	0,47327	***

1.1.4 Structure génétique des populations dans les 4 archipels et flux génétiques

La proportion des deux clades présents sur chaque site ainsi que les principaux flux génétiques entre les 5 groupes prédéfinis a été étudiée (Figure 37). Une opposition entre les proportions de chacune des deux lignées de part et d'autre de l'axe nord-ouest/sud-est a été observée. Au nord de cet axe, la fréquence d'un clade prévaut largement sur l'autre clade, jusqu'à atteindre 100% dans certains sites. Ces proportions se sont avérées opposées au sud de cet axe. Cette discrimination géographique nous a amené à nommer ces deux clades *mapiko nord* et *mapiko sud*.

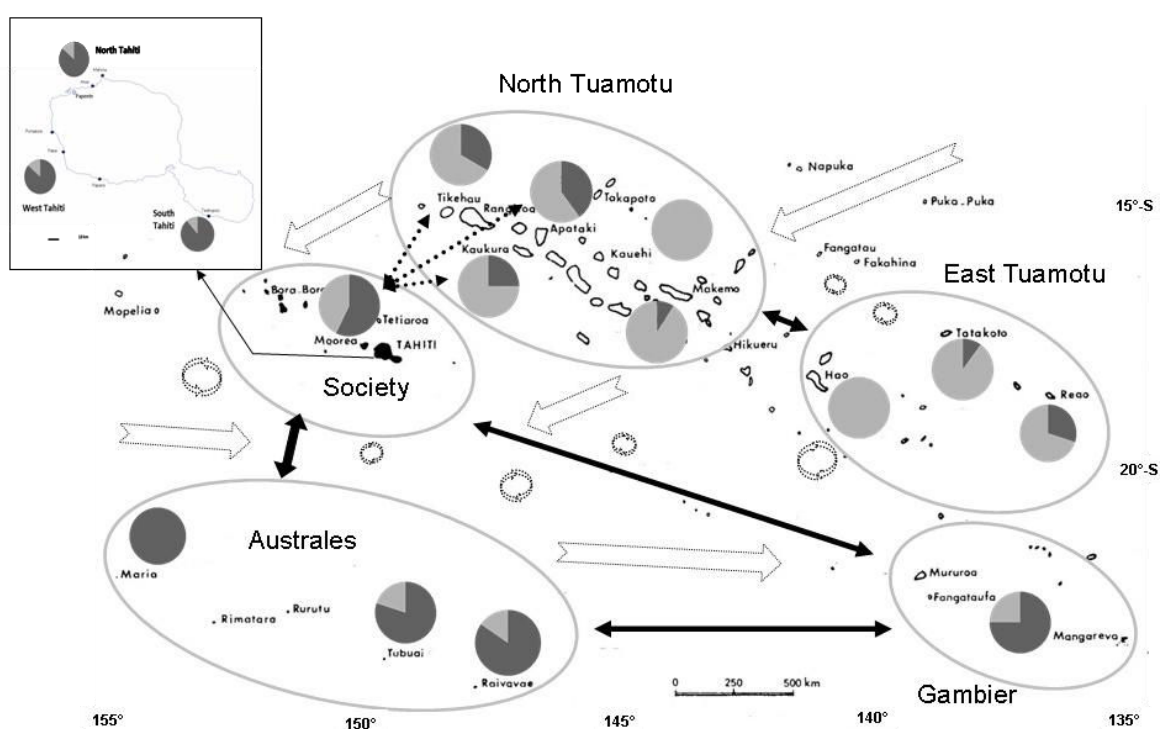


Figure 37. Carte de la répartition des deux clades dans les 4 archipels de Polynésie française incluant l'estimation du nombre de migrants (flèches pleines), représentatif de la connectivité entre les populations, et les courants marins de surface (flèches vides).

L'estimation des valeurs de migrants (N_m) configure 5 groupes géographiques, identiques à ceux formés à partir des valeurs de F_{st} , mettant en valeur un réseau de connectivité robuste marqué par la présence de valeurs de migrants importantes, voire infinies ($N_m = \text{inf}$: Tableau 14). Ainsi, une forte connectivité entre les îles de chaque groupe, Tuamotu est, Tuamotu nord, Société et Australes, a été mise en évidence. L'île de Moorea présente une connectivité importante avec les îles du groupe Tuamotu nord ($N_m = \text{infinie}$ avec Tikehau et Apataki, et importante ($N_m = 42.82353$) avec Kaukura). Les îles de l'est des Tuamotu ne semblent

connectées qu'avec les îles du nord des Tuamotu ($N_m = 77,63158$ entre Tatakoto et Apataki). En revanche, les trois autres groupes, Société, Australes et Gambier, sont interconnectés (N_m infinis ou importants, par exemple $N_m = 17,87854$ entre Mangareva et Raivavae). L'étude des haplotypes partagés a consolidé ces différents groupes géographiques. Deux des 57 haplotypes sont largement distribués partout en Polynésie française. Le premier est absent uniquement d'un groupe, celui de l'est des Tuamotu (Hao, Tatakoto, Reao), et le second de deux groupes : ceux des Tuamotu est et des Australes. Il est intéressant de noter que le premier haplotype, également partagé par les Australes, est présent seulement dans les trois îles situées les plus au nord des Tuamotu (Tikehau, Apataki et Kaukura) alors que le second haplotype, absent aux Australes, est partagé par toutes les îles du groupe Tuamotu nord. Parmi le groupe des Australes, 11 haplotypes sur 14 sont présents uniquement au sein de ce groupe, 3 sont partagés avec le groupe de la Société, dont 1 qui correspond à l'haplotype le plus largement partagé, et donc également présent dans le groupe des Gambier.

Tableau 14. Valeurs des migrants effectifs. Inf : infini. En gras les valeurs importantes du nombre de migrants.

	Island	Maria	Tubuai	Raivavae	Mangareva	Tahiti-est	Tahiti-sud	Tahiti-ouest	Moorea	Tikehau	Apataki	Kaukura	Reao	Tatakoto	Hao	Makemo	Kauehi
Island																	
Maria																	
Tubuai		inf															
Raivavae		inf	inf														
Mangareva		28,60465	inf	17,87854													
Tahiti-est		inf	inf	185,47826	inf												
Tahiti-sud		inf	inf	inf	inf	inf											
Tahiti-ouest	1,94472	1,84711	1,70867	2,0279	1,98359	2,21879											
Moorea	2,60756	6,08018	1,95033	inf	6,02284	4,20645	1,10307										
Tikehau	0,6721	1,06232	0,66562	2,27813	1,15385	0,84071	0,60545	inf									
Apataki	0,93137	1,3961	0,76598	3,17622	1,45506	1,10504	1,18052	inf	inf								
Kaukura	0,45977	0,70588	0,50328	1,47676	0,82115	0,55914	0,57303	42,82353	inf	inf							
Reao	0,39567	0,4933	0,36932	0,69835	0,51751	0,43751	0,73633	1,25266	1,714	77,63158	3,60802						
Tatakoto	0,17617	0,22765	0,22541	0,34394	0,2754	0,20654	0,39671	0,66918	1,08966	2,85714	2,16359	143,5					
Hao	0,04436	0,06974	0,13527	0,13249	0,12634	0,06788	0,28733	0,2688	0,31632	0,5505	0,3179	2,28571	14,125				
Makemo	0,21039	0,28524	0,27471	0,46452	0,35139	0,25676	0,31529	1,10572	23,17362	2,16635	inf	0,89039	0,97328	0,32192			
Kauehi	0,16667	0,24368	0,22623	0,37557	0,28608	0,19624	0,25657	0,93811	3,97714	1,66667	6,27907	0,81625	0,80679	0,19588	25,58947		

La connectivité entre les groupes des Australes et des Gambier peut être expliquée par les courants de surface actuels, alors que la direction de la connectivité observée entre les autres groupes semble perpendiculaire aux courants dans ces régions (Figure 37).

1.1.5 Phylogénie à l'échelle du Pacifique et datation de la divergence

Afin de déterminer les liens phylogéographiques intraspécifiques pour *T. maxima*, les séquences *COI* obtenues avec nos échantillons ont été alignées avec des séquences *COI* de *T. maxima* extraites de *GenBank* et provenant de différents endroits d'Indo-Pacifique et de mer rouge. L'ensemble des données a permis, par la méthode de *Maximum Parcimonie*, d'élaborer un arbre phylogénétique illustrant la distance évolutive entre les clades de *T. maxima* provenant de régions différentes (Figure 38).

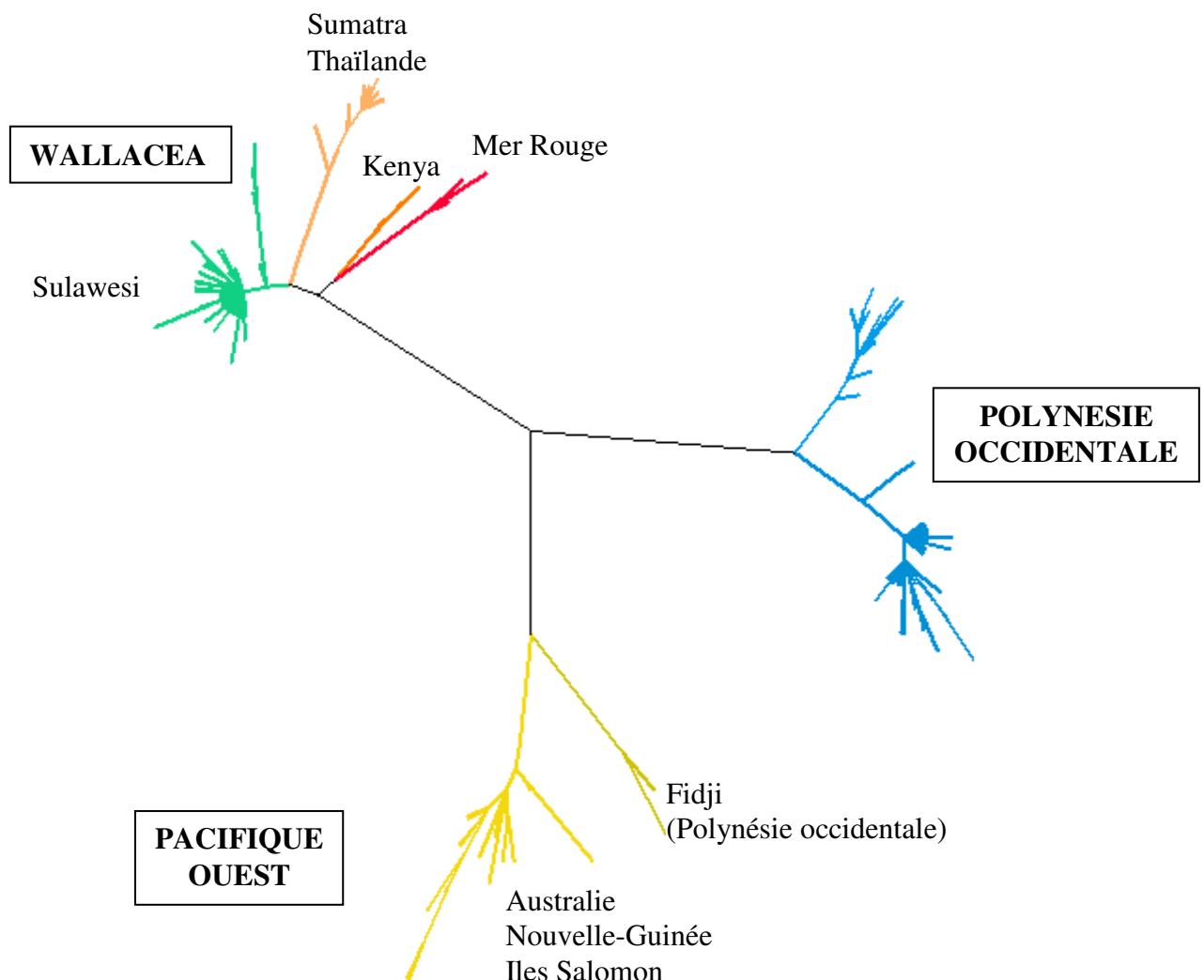


Figure 38. Arbre phylogénétique réalisé avec la méthode de *Maximum Parcimonie* avec nos séquences *COI* de Polynésie française et de Tonga (en bleu) et des séquences de référence issues de *GenBank*.

Les 57 haplotypes trouvés en Polynésie française forment avec les 3 haplotypes identifiés à Tonga une lignée distincte des lignées déjà identifiées dans la région Indo-Pacifique et en Mer Rouge (Huelsenken *et al.*, 2013; Nuryanto et Kochzius, 2009). Les 4 haplotypes trouvés à Fidji forment un clade proche du clade représenté par l’Australie, la Nouvelle Guinée et les Iles Salomon. Ainsi 3 groupes se distinguent. Le premier, Wallacea, est formé des populations de bénitiers de Sulawesi, de Sumatra et de Thaïlande, du Kenya et de la mer rouge, le second, Pacifique ouest, des populations de bénitiers d’Australie, de Nouvelle Guinée et des Iles Salomon, et le dernier, Polynésie occidentale, de Polynésie française et de Tonga.

Le modèle obtenu montre que le groupe Pacifique est, représente une troisième expansion entre les groupes Wallacea et Pacifique Ouest décrits par Huelsenken (Huelsenken *et al.*, 2013), avec les bénitiers de Fidji qui se situent dans le groupe Pacifique Ouest. La distance évolutive qui sépare chacun de ces trois groupes est sensiblement égale. Nos échantillons de Polynésie française forment donc, avec ceux des Tonga, une lignée à part, éloignée par une grande distance évolutive des échantillons provenant d’autres régions du monde (Figure 38). Cette lignée est composée de deux clades qui ont divergé il y a $1,5 \pm 0,5$ Ma (Figure 39) Le clade *mapiko nord* comprend 18 haplotypes de Polynésie française et 1 haplotype des Tonga est classé parmi ce clade. Le clade *mapiko sud* comprend 39 haplotypes de Polynésie française et deux haplotypes des Tonga sont classés parmi ce clade.

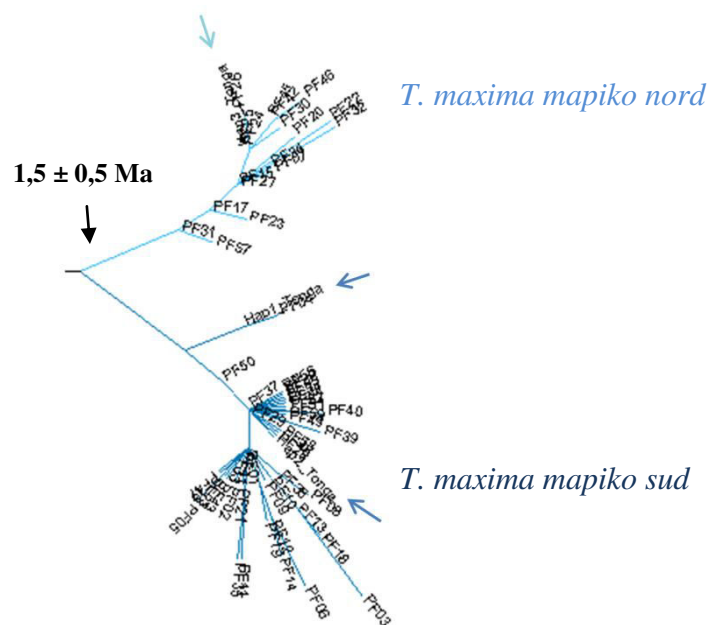
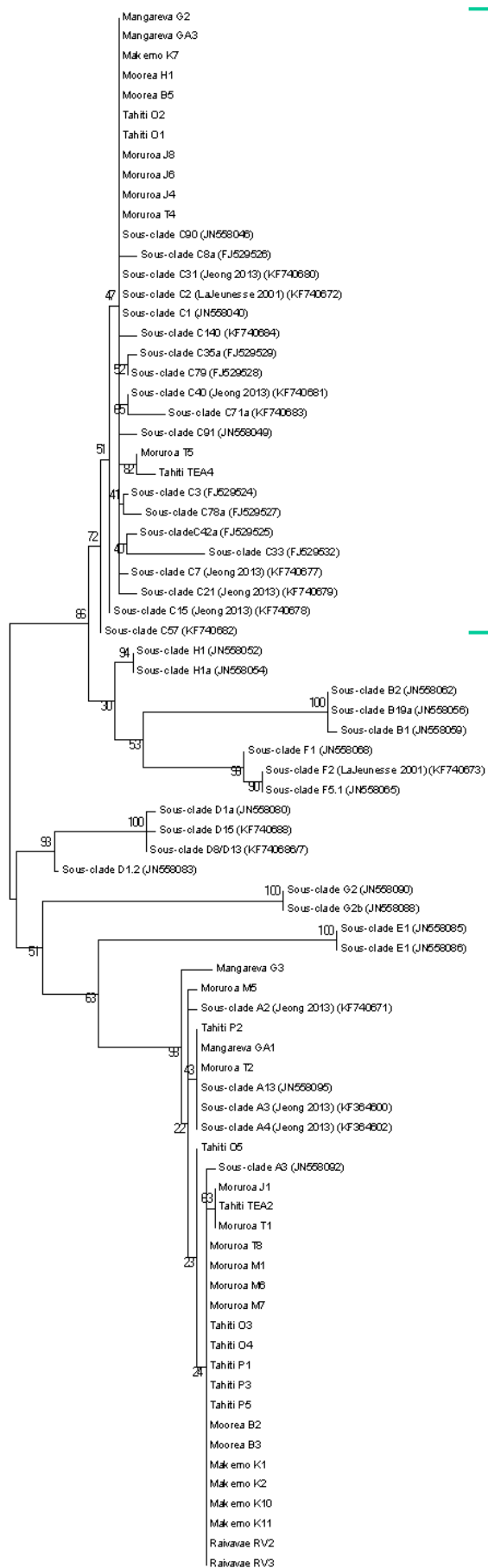


Figure 39. Zoom sur la branche comprenant les échantillons de Polynésie française et de Tonga, mettant en évidence les deux sous-clades présents en Polynésie française, *T. maxima mapiko sud* et *T. maxima mapiko nord*, et les échantillons provenant des Tonga (flèches) qui se retrouvent au sein des deux lignées de Polynésie française.

I.2 *Symbiodinium* spp

I.2.1 Identification des clades grâce au marqueur génétique nucléaire 28S

Des séquences de l'ADNr 28S ont déjà permis de discriminer les différents clades de *Symbiodinium* présents au sein de diverses espèces de coraux (Loh *et al.*, 2001) et des bénitiers (Richter *et al.*, 2008). Pour 39 des extraits d'ADN provenant des archipels de la Société, des Tuamotu et des Gambier, une amplification par PCR d'une région de l'ADNr 28S a été effectuée avec des amorces universelles des 28S de différents clades de *Symbiodinium* (Figure 31). L'amplification et le séquençage direct, avec ces mêmes amorces, des amplicons obtenus, a permis de mettre en évidence le clade majoritaire présent dans chacun des 39 échantillons issus des 4 archipels étudiés. Après alignement et nettoyage, les séquences de 402 pb obtenues ont permis d'identifier 2 clades différents parmi nos échantillons de bénitiers. Le clade A a été identifié dans 26 échantillons et le clade C dans 13 échantillons (Figure 40), ce qui indique que 67% des individus possède le clade A comme clade majoritaire, et 33% possède le clade C. Parmi ce dernier il est difficile d'identifier le sous-clade à partir de nos séquences, en revanche pour le clade A, il semble que le sous-clade A3 soit présent chez 22 échantillons (indifférenciable des sous-clades A4 et A13 pour 3 échantillons, P2, GA1 et T2), et qu'un autre sous-clade soit présent dans l'échantillon G3 (Figure 40).

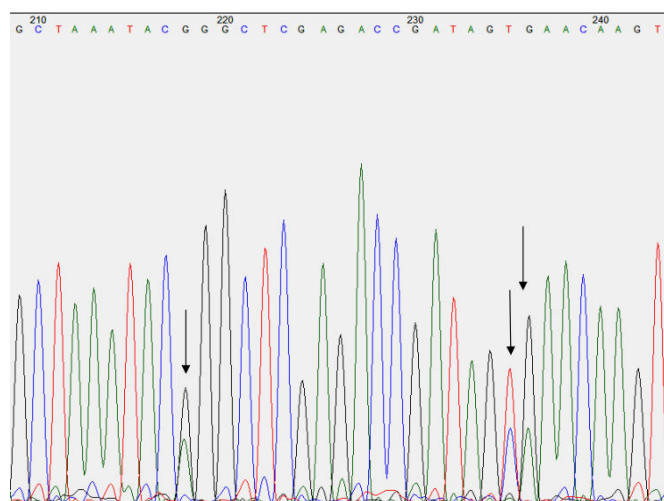


Clade C

Clade A

Figure 40. Arbre phylogénétique des séquences 28S (402 pb) de *Symbiodinium* selon la méthode « Maximum Likelihood ». S. : *Symbiodinium*, G. : *Gymnodinium*. La référence des séquences issues de *GenBank* est notée entre parenthèses.

L'analyse détaillée des profils des séquences a révélé chez 34 individus (87%) la présence de pics secondaires (Figure 41), plus petits que les pics principaux qui ont permis d'établir la séquence des échantillons. Ces pics secondaires, localisés dans des régions permettant de discriminer certains clades, témoignent de la présence de clade(s) minoritaire(s) au sein des bénitiers analysés. Dans le cas où le clade majoritaire, identifié par la séquence d'ADNr 28S, était le clade A, la séquence obtenue en tenant compte uniquement des pics minoritaires (Figure 41) correspondait au clade C, et inversement.



Portion de séquence du clade majoritaire : GCTAAATACGGGCTCGAGACCGATAGTGAACAAGT, dont la séquence complète correspond au clade C sous clade non identifiable. Portion de séquence du clade minoritaire : GCTAAATACAGGCTCGAGACCGATAGCAAACAAGT, dont la séquence complète correspond au clade A sous clades A3 ou A4 ou A13 (indifférentiables)

Figure 41. Résultat de l'électrophorèse et séquence 28S partielle (nucléotides 209 à 243) des clades majoritaires et minoritaires de *Symbiodinium* de l'échantillon prélevé à Teahupoo, Tahiti (TEA4). Les nucléotides 218, 235 et 236 (flèches) sont différents dans la séquence du clade minoritaire. La comparaison des séquences majoritaires et minoritaires avec les séquences présentes dans la base de données *GenBank* indique que le clade majoritaire correspond au clade C, et le clade minoritaire au clade A.

L'analyse des profils de migration des séquences d'ADNr 28S obtenues a mis en évidence la présence d'un clade minoritaire chez 87% des individus. Selon leur représentativité dans l'amplicon, la séquence directe de l'amplicon 28S ne permet pas de les déceler et de trancher avec certitude sur la population de clades présents dans l'échantillon.

1.2.2 La PCR nichée ou l'identification des clades sans passer par le séquençage

Afin de déceler les clades minoritaires présents dans les échantillons, nous avons appliqué le principe de PCR nichée (voir Matériels et méthodes). Des amorces 28S spécifiques de chacun des clades de *Symbiodinium* ont été utilisées avec comme matrice, l'amplikon obtenu avec les amorces universelles. Ainsi, un clade sous représenté, mais dont un fragment du gène 28S a néanmoins été amplifié avec les amorces universelles, est amplifié spécifiquement avec les amorces spécifiques de ce clade (Figure 42). La présence d'un clade particulier est ensuite déterminée par simple migration de l'amplifiat et observation des bandes sur gel d'agarose (bande d'environ 100 bp localisée grâce à un marqueur de taille 100 bp). Un prérequis à l'identification des clades présents dans nos échantillons, a été de tester la spécificité de chaque couple d'amorces sur de l'ADN du clade correspondant ainsi que sur les autres clades. Ceci a été réalisé à partir de cultures cellulaires de clades de *Symbiodinium* isolés, des clades A à F (Exemple pour le clade A : Tableau 15 ; Figure 42). Un second test a permis de déterminer la sensibilité des amorces, c'est à dire la capacité maximale d'amplification pour chaque paire d'amorce spécifique. Pour cela, chaque paire d'amorce a été utilisée pour amplifier l'ADN génomique de *Symbiodinium* du clade correspondant, à différentes concentrations (Tableau 15 ; Figure 42).

Tableau 15. Tests de spécificité et de sensibilité du couple d'amorces spécifiques du clade A sur l'ADN de clade A.

ADN clade A	Amorces
100 pg	A, B, C, D, E, F
10 pg	A
1 pg	A
0,1 pg	A
0,01 pg	A

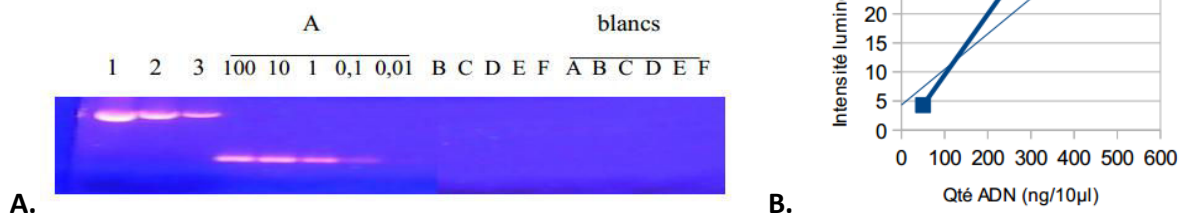


Figure 42. Résultats des tests de spécificité et de sensibilité du couple d'amorces spécifiques du clade A sur l'ADN de clade A. A. Gel d'électrophorèse de produits PCR pour un test de spécificité des amorces. 1, 2, 3 : calibrateurs, de 500, 250 et 50 ng respectivement correspondant à des amplifications de 600 pb et servant d'échelle de référence. 100 - 0,01 : quantité en pg d'ADN d'un clade, A dans cet exemple, amplifiés à l'aide des amorces spécifiques A. Absence d'amplification à partir de 100 pg (Tableau 3) d'ADN du clade A par les amorces spécifiques des clades B, C, D, E et F, comme indiqué. Blancs A-F : absence d'amplification en absence d'ADN. B. Courbe étalon : intensité lumineuse des bandes correspondant au calibrateur en fonction de la quantité d'ADN en ng/10µl. L'équation de la droite et le coefficient de détermination sont indiqués.

Une amplification spécifique de chacun des clades n'a été observée qu'avec le couple d'amorces approprié. Ce résultat confirme la spécificité des amorces utilisées. Cette approche a permis, pour l'ensemble des clades, d'obtenir une amplification spécifique jusqu'à une concentration en ADN de départ égale à 0,1 pg. Les amorces ont donc été capables de détecter de façon spécifique l'ADN présent même à très faible concentration, ce qui indique qu'il est possible de visualiser les clades présents en faible quantité dans nos échantillons.

Cette analyse qualitative a été réalisée sur 42 échantillons provenant des archipels de la Société (Tahiti) et des Tuamotu (Mururoa). Elle a permis de révéler, chez un échantillon, en plus des clades A et C, la présence du clade D, mais les clades B, E et F semblent absents de l'ensemble des 42 échantillons analysés. L'ensemble des 42 échantillons possède le clade A, 35 échantillons (83,5 %), contiennent aussi le clade C, et 1 échantillon (2,5%), contient aussi le clade D (Tableau 16). La bande observée au niveau du clade D dans l'échantillon O3 était de très faible intensité, indiquant une faible quantité d'ADN de ce clade, bien inférieure à la quantité d'ADN des clades A et C.

Tableau 16. Clades de *Symbiodinium* identifiés au sein des bénitiers par la PCR nichée

Ile	Echantillon	Clade A	Clade C	Clade D	Combinaison
Tahiti	Punaauia O1	X	X		A C
Tahiti	Punaauia O2	X	X		A C
Tahiti	Punaauia O3	X	X	X	A C D
Tahiti	Punaauia O4	X	X		A C
Tahiti	Papara P1	X	X		A C
Tahiti	Papara P2	X	X		A C
Tahiti	Papara P3	X	X		A C
Tahiti	Papara P4	X	X		A C
Tahiti	Papara P5	X	X		A C
Tahiti	Papara P6	X	X		A C
Tahiti	Teahupoo	X	X		A C
Tahiti	Teahupoo	X	X		A C
Tahiti	Teahupoo	X	X		A C
Tahiti	Teahupoo	X	X		A C
Tahiti	Teahupoo	X	X		A C
Tahiti	Arue A1	X			A
Moorea	Beachcomber	X	X		A C
Moorea	Beachcomber	X			A
Moorea	Beachcomber	X	X		A C
Moorea	Beachcomber	X	X		A C
Mururoa	Jeanne J1	X			A
Mururoa	Jeanne J3	X			A
Mururoa	Jeanne J4	X	X		A C
Mururoa	Jeanne J5	X	X		A C
Mururoa	Jeanne J6	X	X		A C
Mururoa	Jeanne J7	X	X		A C
Mururoa	Jeanne J8	X	X		A C
Mururoa	Mouche M1	X	X		A C
Mururoa	Mouche M3	X	X		A C
Mururoa	Mouche M4	X	X		A C
Mururoa	Mouche M5	X	X		A C
Mururoa	Mouche M6	X			A
Mururoa	Mouche M7	X			A
Mururoa	Telsite T1	X	X		A C
Mururoa	Telsite T2	X	X		A C
Mururoa	Telsite T3	X	X		A C
Mururoa	Telsite T4	X	X		A C
Mururoa	Telsite T5	X	X		A C
Mururoa	Telsite T6	X	X		A C
Mururoa	Telsite T7	X	X		A C
Mururoa	Telsite T8	X			A
Total		42	35	1	

Trois combinaisons de clades ont été obtenues : A dans 14% des cas, AC dans 83,5% des cas et ACD dans 2,5% des cas.

1.2.3 Identification des sous-clades par séquençage

Avec la diversification récente des techniques de biologie moléculaire, des techniques telles que la métagénomique 454 sont aujourd'hui à disposition pour répondre aux problématiques scientifiques telles que l'identification des différents sous-clades de *Symbiodinium* présents au sein d'un organisme. Cette technique, qui consisterait dans notre cas à séquencer, avec une profondeur définie, le mélange de fragments constituant l'amplicon 28S obtenu avec les primers universels, reste encore très coûteuse et ne garantit pas non plus de façon certaine la détection des clades minoritaires. Tout dépend du nombre de séquences lues par amplicon, et donc du coût.

Nous avons donc mis au point, en collaboration avec H. Rouzé (Doctorante UPF/CRIOBE, actuellement en post-doc à l'IRD Nouméa) une technique simple et peu coûteuse permettant d'identifier de façon fiable et rapide les clades minoritaires présents au sein de nos échantillons. Cette technique consiste à réaliser une PCR nichée en amplifiant l'ADN génomique avec les amorces universelles 28S dans un premier temps, puis en amplifiant les amplicons 28S avec une amorce 28S universelle sens et une amorce 28S spécifique anti-sens, et inversement (*cf* IV.4). Le choix des amorces de cette deuxième amplification a été orienté pour obtenir les produits d'amplification les plus grands permettant d'être directement séquencés. La concaténation des deux séquences obtenues pour chaque bénitier (une avec l'amorce universelle sens et l'amorce spécifique anti-sens, l'autre avec l'amorce spécifique sens et l'amorce universelle anti-sens) a permis d'obtenir une séquence d'environ 600 pb contenant la région variable qui permet, après séquençage, de discriminer les différents clades et sous-clades de *Symbiodinium* présents au sein de chaque bénitier.

30 échantillons ont été amplifiés avec 4 couples d'amorces différents (2 pour le clade A, 2 pour le clade C) et séquencés. Tous les échantillons amplifiés avec les deux couples d'amorces pour le clade A ont abouti à une amplification et un séquençage pour au moins un des deux couples d'amorces, et pour 13 d'entre eux les deux amplifiats ont pu être séquencés et concaténés afin d'obtenir une séquence de 600 pb. 25 échantillons amplifiés avec les deux couples d'amorces pour le clade C ont abouti à une amplification pour au moins un des deux couples d'amorces, et pour 10 d'entre eux les deux amplifiats ont pu être séquencés et concaténés afin d'obtenir une séquence de 600 pb. La comparaison des séquences obtenues pour chaque amplification montre

que 100% des bénitiers analysés possèdent le clade A, 83% possèdent également le clade C, ce qui confirme les résultats obtenus avec la PCR nichée (cf II.2).

Les séquences obtenues ont permis de déterminer à l'échelle du sous-clade la population de *Symbiodinium* présents dans les échantillons. Ainsi, le sous-clade A3 semble le seul présent au sein des bénitiers de Polynésie française, le sous-clade C57 est présent chez 70 % des individus possédant le clade C, les autres individus possédant un sous-clade parmi les 4 suivants, C91, C90, C2 et C1. De plus, la séquence obtenue pour l'échantillon pour lesquels la présence de clade D était suspectée *via* l'approche PCR nichée (O3) s'est avérée bien correspondre au clade D. La comparaison de sa séquence avec celles présentes dans la banque de données *GenBank* indique qu'elle est proche d'une séquence de *Symbiodinium* vivant en symbiose avec un corail échantillonné au sud de la mer de Chine (Huang *et al.*, 2011) et dont le type n'a pas été déterminé. Ce sous-clade de *Symbiodinium* semble légèrement différent de D1, D1a, D8/D13 et D15. Ce sous-clade D n'a pour le moment pas été décrit comme présent chez les coraux de Polynésie française.

La mise en commun des résultats obtenus avec les 3 techniques (annexe 3) montre que ces derniers sont cohérents et confirment ceux de la PCR nichée, avec 14% des bénitiers qui sont associés avec un seul clade, le clade A. La répartition géographique des sous-clades de *Symbiodinium* indique que Tahiti ouest est le site qui présente la diversité symbiotique la plus importante (Figure 43) et Raivavae la plus faible. Le clade D n'a été trouvé qu'à Tahiti ouest, et le sous-clade C57 uniquement à Raivavae, où il semble présent chez tous les individus. A ce jour, il semble que ce sous-clade n'ait été identifié uniquement qu'au sein de coraux du genre *Millepora* présents au Japon (Jeong *et al.*, 2014), donc pas chez les coraux de Polynésie française. En revanche, il n'est pas spécifique d'un type d'hôte puisqu'il a été identifié au sein des bénitiers de notre étude et au sein de coraux dans l'étude de Jeong (Jeong *et al.*, 2014). Le sous-clade A3 est présent chez les coraux en Polynésie française (Putnam *et al.*, 2012), alors que les sous-clades A14 et A13 n'ont pas été identifiés. Le clade C est le clade qui a montré la plus grande diversité au sein des coraux de Polynésie française, avec 57 haplotypes différents appartenant à 6 sous-clades différents. Les sous-clades C2, C31, C90 et C91, qui pourraient être présents au sein des bénitiers, n'ont pas été identifiés dans cette étude sur les coraux, contrairement aux sous-clades C1, C3 et C15. Le sous-clade C2 a été trouvé chez le bénitier *Hippopus hippopus* à Palau (LaJeunesse, 2001), le sous-clade C31 au sein de coraux au Japon (Jeong *et al.*, 2014) et les sous-clades C90 et C91 au sein de foraminifères, respectivement à Panama et à Guam (Pochon *et al.*,

2012). Une faible diversité en clades est observée aux Australes, mais seulement 5 échantillons ont été analysés.

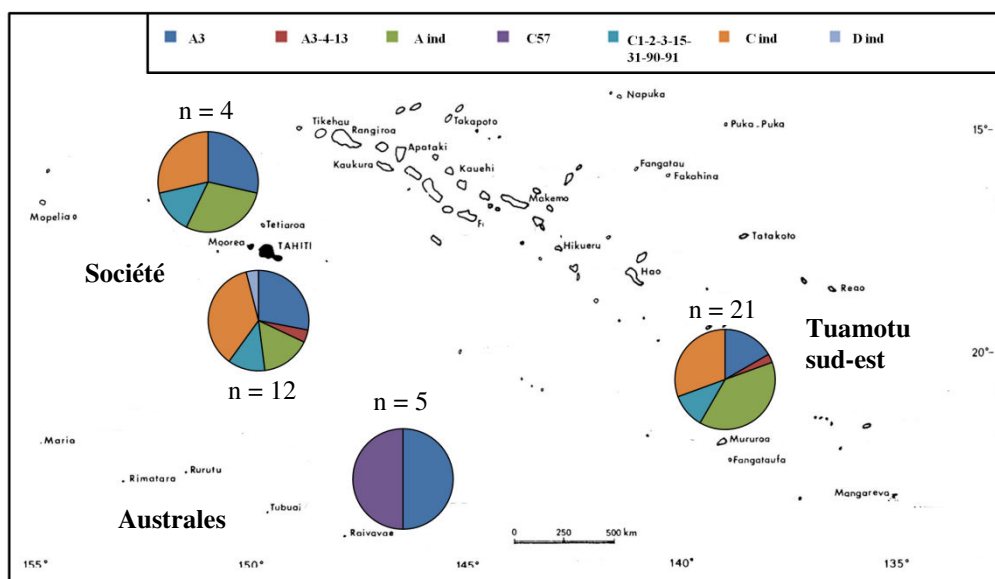


Figure 43. Distribution des sous-clades de *Symbiodinium* sur 4 sites de Polynésie française : Moorea, Tahiti ouest, Mururoa et Raivavae. Seuls les bénitiers pour lesquels la combinaison de clades est validée ont été comptabilisés ici. Dans les groupes indéterminés (Ind) se situent les clades pour lesquels on n'a pas séquencé les échantillons, on ne connaît donc pas le sous-clade de *Symbiodinium*. Quand les sous-clades de *Symbiodinium* sont séparés par un tiré (par exemple A3-4-13) cela signifie que les séquences n'ont pas pu être discriminées entre les différents sous-clades. Le sous-clade C1-2-3-15-90-91 est laissé ici afin d'indiquer que même si le sous-clade de *Symbiodinium* n'a pas pu être déterminé précisément il est différent de C57.

II. Synthèse et discussion partielle

Malgré l'avantage évident que présente l'utilisation de l'ADN mitochondrial dans les études de diversité intraspécifique, et son utilisation massive dans de nombreux programmes de barcoding, cette utilisation a souvent été remise en question. En effet, la première limitation évoquée réside dans le fait qu'il ne s'agisse que d'un seul locus et donc que cela ne révèle qu'une partie de l'histoire évolutive des espèces (Zhang et Hewitt, 2003). La seconde limitation vient du fait que l'ADN mitochondrial n'est pas toujours sélectivement neutre (Galtier *et al.*, 2009), ce qui représente un paramètre limitant pour la détermination des inférences à partir des données génétiques (DeBoer *et al.*, 2014). Les marqueurs nucléaires représentent une alternative aux marqueurs mitochondriaux, puisque leur héritage biparental permet les recombinaisons, intégrant ainsi des processus généalogiques additionnels (Heuertz *et al.*, 2004).

Cependant une étude récente (DeBoer *et al.*, 2014) a démontré la concordance entre les marqueurs mitochondriaux et nucléaires utilisés de concert, soulignant ainsi l'utilité et le bienfondé des études basées sur l'ADN mitochondrial.

Sur 314 séquences *COI* provenant d'individus de *T. maxima* prélevés dans l'ensemble des 4 archipels de Polynésie française qui possèdent des bénitiers, 57 haplotypes différents ont été trouvés, ce qui représente 18 % de diversité génétique. Pour la même espèce et la même superficie, dans la région Indo-Pacifique, différentes études ont trouvé entre 55,5% (Nuryanto et Kochzius, 2009) et 83% de diversité génétique (Huelsenken *et al.*, 2013). L'observation d'une importante diversité génétique est fréquente chez les bivalves marins (Huvet *et al.*, 2000; Kenchington *et al.*, 2006; Launey *et al.*, 2002; Vasemagi *et al.*, 2010). Elle a été décrite comme une stratégie d'adaptation des populations habitant dans des environnements instables (Levins, 1968), en particulier pour les espèces sessiles inféodées à un habitat particulier (Selander et Kaufman, 1973) et limitées à un substrat spécifique (Nevo, 1978; Lemer, 2010). Cette diversité génétique, importante notamment pour les bénitiers dans la région Indo-Pacifique, est bien moindre chez les bénitiers de notre étude, provenant de Polynésie française, comme c'est le cas aussi pour d'autres espèces.

Trois sites de la région Indo-Pacifique (les mers de Java et de Flores et le détroit de Makassar) présentent une faible diversité génétique qui contraste avec l'ensemble des résultats observés dans cette région. Trois facteurs potentiels, ou une combinaison de ces facteurs, ont été mis en avant pour expliquer la faible diversité génétique des populations de bénitiers sur ces sites : l'effet fondateur, la surexploitation et les épisodes de blanchissement des bénitiers (DeBoer *et al.*, 2008; Kochzius et Nuryanto, 2008; Nuryanto et Kochzius, 2009). En effet ces trois facteurs, auxquels peuvent se rajouter la pollution et la dégradation des récifs coralliens, peuvent engendrer une réduction des populations et induire ainsi une diminution de leur diversité génétique, voir un phénomène de goulot d'étranglement. Pour une même aire de répartition, la diversité génétique de *T. maxima* en Polynésie française, déterminée lors de notre étude, est bien plus faible que dans la région Indo-Pacifique. Les trois facteurs énoncés plus haut, l'effet fondateur, la surexploitation et le blanchissement des bénitiers, peuvent expliquer en partie cette observation. En effet, le temps d'évolution depuis l'arrivée de l'haplotype fondateur influence la diversité génétique des populations d'une espèce. En Polynésie française, les îles volcaniques hautes les plus jeunes ont moins de 1 à 2 millions d'années, elles n'ont donc pas pu être colonisées avant cette date. De plus l'exploitation des bénitiers est conséquente en

Polynésie française (plus de 70 tonnes de chair par an en 2013, communication personnelle de la Direction des Ressources Marines et Minières), et plusieurs épisodes de blanchissement et de mortalité massive ont été observés récemment (Harris, 1995; Adjeroud *et al.*, 2001 ; Adessi, 2001; Andréfouët *et al.*, 2013), entraînant une diminution importante de la taille de certaines populations, comme à Tatakoto où une mortalité de 83% des populations de bénitiers a été observée en 2013. Cependant, malgré l'exploitation massive et les épisodes de blanchissement et de mortalité, les populations de bénitiers de Polynésie française présentent des densités encore très importantes (Salvat, 1972; Andréfouët *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2006). Cette abondance pourrait influencer positivement la diversité génétique, mais les bénitiers semblent être arrivés trop récemment en Polynésie française pour que la grande taille des populations n'ait le temps d'influencer la diversité génétique. Parmi les trois facteurs évoqués plus haut, l'effet fondateur récent semble donc l'hypothèse la plus plausible pour expliquer la faible diversité génétique observée en Polynésie française. De plus, si l'on part du principe que la biodiversité et la diversité génétique sont liées, le gradient décroissant de biodiversité qui s'étend d'ouest en est depuis la région Indo-Pacifique jusqu'au Pacifique central (Karlson *et al.*, 2004), où se situe la Polynésie française, permet également d'expliquer la faible diversité génétique observée au sein des populations situés à la fin de ce gradient.

Enfin, la faible diversité génétique observée peut également être la résultante de flux de gènes conséquents permettant de maintenir une homogénéité génétique au sein des populations (Lemer, 2010). La dispersion, le déplacement des individus du lieu de naissance vers un site d'installation et de reproduction (Hauser, 2001), est associée aux stades larvaires chez les espèces benthiques (Cowen et Sponaugle, 2009). Elle influence considérablement le flux génique et le maintien de la taille des populations (Lemer, 2010). Les organismes sessiles présentent des capacités de dispersion supérieures à la plupart des organismes non fixés, et les invertébrés dont font partie les mollusques bivalves ont tendance à montrer un flux génique important (Bonhomme et Planes, 2000). Malgré une phase larvaire courte (10 jours : Jameson, 1976; Lucas, 1988) et une aire géographique conséquente (4 millions de km²), la présence de très nombreuses îles en Polynésie française réduit la distance entre les habitats de recrutement et rend possible la dispersion par « sauts de puce » des larves de bénitiers sur l'ensemble du territoire. Ainsi si l'on considère une vitesse de déplacement au gré des courants de 5 à 10 cm/s en Polynésie française, selon les archipels (Martinez *et al.*, 2009) et une phase larvaire de 10 jours, la distance qui peut être parcourue par les larves avant de se fixer sur un substrat est comprise entre 43 et 86 km, distance supérieure à celle qui sépare de nombreuses îles de notre

aire d'étude. Cependant les distances inter-archipels ou entre les sous-archipels (îles du vent, îles sous le vent) restent supérieures à 86 km.

Les 57 haplotypes trouvés en Polynésie française se répartissent en deux clades distincts, un présent essentiellement au nord, dans l'archipel des Tuamotu, et l'autre essentiellement au sud, dans les archipels de la Société, des Australes et des Gambier. Cette division en deux clades ainsi que leur distribution géographique est observée pour la première fois en Polynésie française. En effet, des différences génétiques significatives avaient été observées entre les populations des archipels de la Société, des Tuamotu et des Australes chez *T. maxima*, et la différenciation génétique avait été corrélée avec la séparation géographique (Laurent *et al.*, 2002; Planes et Laurent, 2004), or nos résultats montrent la présence des deux clades répartis de part et d'autre d'un axe nord-ouest/sud est séparant les Tuamotu des autres archipels. Les populations de bécards des Gambier et des Australes sont génétiquement plus proches de celles de la Société que les populations des Tuamotu qui sont pourtant géographiquement plus proches. Les archipels des Gambier et des Australes sont plus éloignés de la Société que ne le sont les Tuamotu, et nos résultats montrent que le clade *mapiko sud* a néanmoins été retrouvé dans ces archipels. 5 zones ont pu ainsi être déterminées en fonction de la structure génétique des populations de bécards qui les composent : la Société, les Tuamotu de l'ouest, les Tuamotu de l'est, les Gambier et les Australes. Nous avons également démontré que les populations de l'archipel de la Société sont génétiquement plus proches de celles des Australes et des Gambier que de celles des Tuamotu, contrairement à ce qui serait attendu si l'on considérait l'éloignement géographique et les courants marins.

L'huître perlière et le bécard sont les seuls bivalves ayant fait l'objet d'études génétiques en Polynésie française. Chez *Pinctada margaritifera*, contrairement aux résultats obtenus pour *T. maxima*, aucune différenciation génétique n'a été trouvée entre individus d'archipels différents (Arnaud 2000 ; Lemerre 2010), mais la comparaison est difficile car l'huître a subi de nombreux transferts inter-îles, et sa phase larvaire est bien plus longue (environ 20 jours - Saucedo & Monteforte, 1997) que celle du bécard d'environ 10 jours. Les études génétiques menées sur les poissons en Polynésie française donnent également des résultats variés suivant les espèces. Les poissons demoiselle *Dascillus trimaculatus* et *Dascillus aruanus* (Bernardi *et al.* 2001 ; Planes *et al.*, 1993) n'ont montré aucune différenciation génétique entre archipels, indiquant un flux de gènes assez conséquent pour maintenir une homogénéité génétique malgré la distance et l'isolement lié à la présence de barrières récifales. En revanche, chez le poisson *Acanthurus*

tristogus, les populations se sont avérées être très structurées (Planes *et al.*, 1993; Planes et Fauvelot, 2002) et leur distance génétique semble proportionnelle à la distance géographique (Planes *et al.*, 1996). Ainsi en Polynésie française la structure génétique semble spécifique à chaque espèce, et dépend certainement de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, ainsi que de l'histoire de l'espèce considérée.

Etudier la connectivité des populations grâce aux marqueurs moléculaires permet de tester si la capacité de dispersion permet un flux de gènes important entre les sites considérés (Lemer, 2010). L'analyse de la connectivité entre les populations des îles de la Polynésie française a mis en évidence qu'une connectivité importante est présente entre les groupes de la Société, des Australes et des Gambier, ainsi qu'entre les deux groupes des Tuamotu. Hormis la connectivité entre les Australes et les Gambier qui peut s'expliquer par les courants actuels, la connectivité observée entre les autres groupes apparaît perpendiculaire aux courants de surface présents dans cette zone, indiquant soit l'influence des événements du passé sur la connectivité actuelle des populations de bécards de Polynésie française, soit l'influence d'évènements récents distincts des courants de surface.

Contrairement aux espèces sédentaires d'eau douce, de nombreuses espèces marines présentent, comme dans le cas des bécards en Polynésie française, une structure des populations relativement faible maintenue par d'importants flux géniques (Palumbi, 1992; Waples, 1998; Ward *et al.*, 1994). De plus des paramètres tels que de grandes tailles de populations, une variabilité génétique importante, une fécondité importante et l'existence de larves pélagiques entraînent une homogénéité génétique (Nielsen et Kenchington, 2001). D'un autre côté, la différenciation des populations de ces espèces pourrait être maintenue par la capacité de migration limitée des adultes et les courants océaniques qui favorisent le recrutement local (Lemer, 2010). Ces deux conditions antagonistes contribuent à des structurations génétiques différentes. Au regard de sa très grande aire de répartition, la même espèce *T. maxima* peut présenter ces deux caractéristiques suivant la région analysée. Les populations de l'Indo-Pacifique présentent une forte structuration génétique avec la présence de 3 clades distincts, spécifiques d'une zone géographique (Kochzius et Nuryanto, 2008); cette structuration contraste avec la connectivité observée en Polynésie française où les deux clades identifiés peuvent se retrouver dans la même zone géographique, même si la proportion de chacun des deux clades varie selon un gradient nord-sud.

A une échelle plus grande, une classification biogéographique établie à partir des espèces marines des zones côtières et des zones de plateaux de la planète a permis de définir 62 provinces et 232 écorégions (Figure 44 : Spalding *et al.*, 2007). Une province est une grande aire définie par la présence de biotas distincts qui présentent une cohésion dans leur histoire évolutive. La plupart de ces biotas est le résultat de paramètres abiotiques qui ont défini leurs frontières. Ces paramètres incluent les traits géomorphologiques ou hydrographiques ainsi que les influences géochimiques. Les provinces sont des unités qui englobent l'histoire de vie des nombreux taxa qui la constituent, incluant les espèces mobiles et dispersives. Les écorégions sont des aires de composition spécifique relativement homogène, clairement distincte des systèmes adjacents. Cette composition peut être le résultat de traits océanographiques ou topographiques. Les agents de forçage biogéographique dominants définissant les écorégions incluent l'isolement, l'upwelling côtier, la disponibilité en nutriments, l'apport en eau douce, les régimes de température, la sédimentation, les courants et la complexité bathymétrique ou côtière. Les écorégions sont des unités qui englobent les processus écologiques ou d'histoire de vie de la plupart des espèces sédentaires.

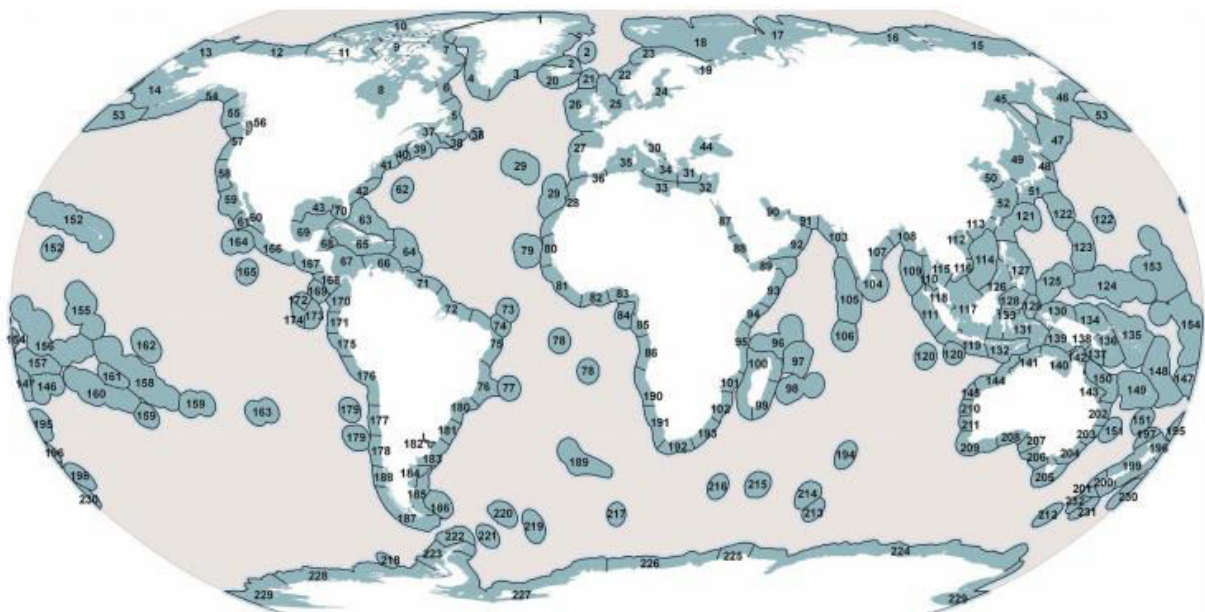


Figure 44. Classification biogéographique montrant la distribution des 232 écorégions.

(D'après Spalding, 2007)

Au niveau phylogénétique, la Mer Rouge et le Kenya semblent ne former qu'un seul clade alors qu'ils appartiennent à deux provinces différentes, matérialisées par la division des populations de ces provinces en deux sous-clades (Tableau 17). La Thaïlande et Sumatra forment

un seul clade qui correspond à la province 26. Sulawesi et la Nouvelle Guinée, qui appartiennent à la province 30, présentent étonnamment une distance évolutive extrêmement longue. La Nouvelle Guinée, les îles Salomon et l’Australie, qui appartiennent à 3 provinces différentes mais géographiquement proches, forment un seul et unique clade, proche de celui formé par les populations de Fidji. En revanche Fidji et Tonga, qui appartiennent à la même province (Polynésie occidentale), présentent une distance évolutive très importante. Les échantillons de Tonga appartiennent à la même lignée que celle de la Polynésie française alors que ces deux groupes d’îles appartiennent à deux provinces différentes. Nos résultats obtenus pour Fidji, Tonga et la Polynésie française ne reflètent donc pas la classification biogéographique établie par Spalding et ses collaborateurs (Spalding *et al.*, 2007).

Tableau 17. Provinces et écorégions des zones géographiques concernées par notre étude phylogénétique de *T. maxima*.

Zone géographique	Province	Ecorégion
Mer rouge	18	87-88
Kenya	20	95
Thaïlande	26	115
Sumatra	26	118
Sulawesi	30	128/133
Nouvelle Guinée	30	130
Iles Salomon	31	135
Australie	33	142-143
Fidji	35	146
Tonga	35	147
Polynésie française	40	158 : Tuamotu 160 : Australes 161 : Société

Parmi les trois groupes qui se distinguent lors de l’analyse phylogénétique des échantillons de *T. maxima* provenant de la mer rouge, du Kenya, de la région Indo-Pacifique et du Pacifique (Huelsenken *et al.*, 2013; Nuryanto et Kochzius, 2009 plus nos échantillons), la distribution de Sulawesi et de la Nouvelle Guinée, et de Fidji et Tonga, dans deux groupes distincts, ne reflète pas la distance géographique. Ces régions doivent se situer dans deux écozones limitrophes, séparées par une barrière biogéographique. Deux barrières ont été tracées en fonction de la composition faunistique entre Sulawesi d’un côté et l’Australie et la Nouvelle Guinée de l’autre :

la ligne de Weber (Weber, 1902) et la ligne de Lydekker (Lydekker, 1896). Ces frontières peuvent expliquer l'absence de connectivité et donc la grande distance génétique entre les populations de Sulawesi et de Nouvelle Guinée. La grande distance évolutive observée entre Fidji et Tonga, également très proches géographiquement, peut être liée à l'existence d'une barrière semblable entre ces deux régions. La dynamique océanique dans le Pacifique Ouest est particulièrement complexe du fait de la présence de nombreuses îles qui représentent des obstacles topographiques, et cette région reste encore relativement peu étudiée. Si on se base sur les courants de surface moyens actuels, ces derniers sont dirigés vers le sud-ouest au niveau des îles Fidji et Tonga (Martinez *et al.*, 2009), il est donc possible que cette orientation ne favorise pas les échanges entre les deux groupes d'îles (Figure 45). La différence génétique trouvée entre les populations de bécotiers de ces deux groupes d'îles pourrait donc être due à une très faible connectivité liée à l'existence d'une barrière biogéographique due à l'orientation des courants de surface. Il faut cependant garder à l'esprit que les anomalies climatiques de type El Niño ou La Niña peuvent perturber et modifier les courants moyens.

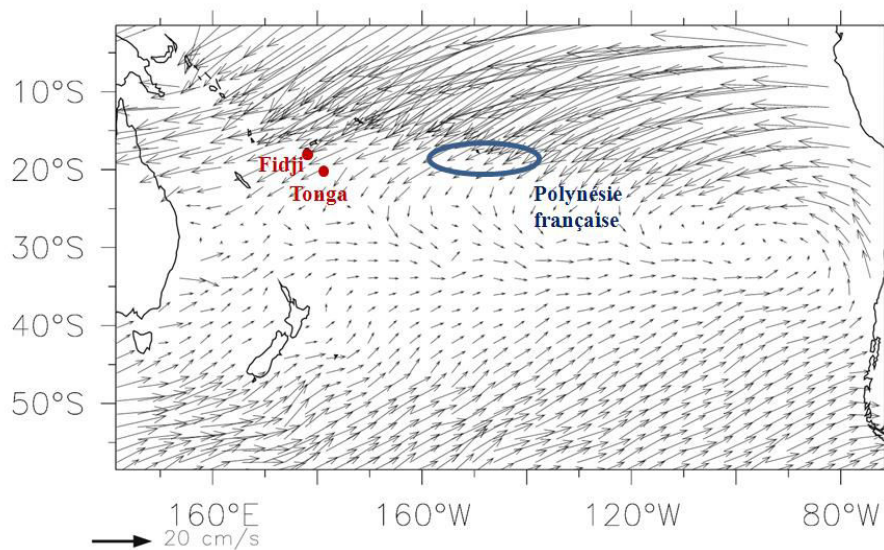


Figure 45. Carte des principaux courants de surface moyens du Pacifique sud observés de janvier 1993 à janvier 2001 et localisation des îles de Fidji, Tonga et de Polynésie française. (D'après Martinez et al., 2009)

Nos résultats indiquent l'existence d'un ancêtre commun proche entre les populations de bécotiers des îles de Polynésie française et de Tonga, contrairement aux populations de Fidji qui sont génétiquement bien plus éloignées. Deux courants d'ouest, le Contre-Courant Equatorial Sud et le Contre-Courant Tropical Sud atteignent au moins ponctuellement l'ouest de la

Polynésie française. Or ces deux courants ne passent pas au niveau des Tonga, le premier passe bien au nord et le second bien au sud de ce groupe d'îles. La colonisation de la Polynésie française par des larves de bécards provenant des Tonga semble impossible, en tous cas dans le cadre d'un transport des larves par les courants de surface du Pacifique sud-ouest actuels. En revanche le Courant Equatorial Sud relie les îles de Polynésie française à celles des Tonga. La ressemblance génétique entre les bécards de Polynésie française et de Tonga pourrait donc s'expliquer par une dérive des larves le long du Courant Equatorial Sud qui s'écoule vers l'ouest. Cependant avec le mode de dispersion des bécards (phase larvaire mobile très courte, déplacement au gré des courants, de génération en génération), et pour une vitesse moyenne du courant estimée entre 5 à 10 cm.s⁻¹ dans cette région (Martinez et al., 2009), 86 km maximum peuvent être parcourus par génération, sachant qu'un bécard atteint la maturité sexuelle entre 12 et 18 mois en fonction des conditions. Cette distance n'est pas suffisante pour que la migration des larves en fonction des courants de surface actuels puisse expliquer la colonisation des Tonga depuis la Polynésie française, malgré la présence de nombreuses îles sur le trajet. Pour que cela soit possible il faudrait que le courant océanique de surface soit supérieur à 50 cm pendant plusieurs jours, or ces conditions ne sont pas atteintes même pendant les événements exceptionnels comme La Niña qui entraînent une intensification des courants. Cependant ces valeurs correspondent aux données climatologiques actuelles, qui ont pu être modifiées au cours des temps géologiques, et notamment lors des épisodes de glaciation.

Parmi les études réalisées sur l'identification des clades de *Symbiodinium*, plusieurs ont mis en évidence le clade majoritaire présent au sein de chaque bécard, grâce à des séquences d'ADNr *ITS2* (Baillie et al., 2000; Weber, 2009), d'ADNr *18S* (Carlos et al., 1999) ou encore des marqueurs microsatellites (Pinzón et al., 1999). Seules deux études, celle de T. DeBoer (2012) et la notre, permettent d'identifier plusieurs clades présents au sein d'un même bécard. Nos résultats seront donc essentiellement comparés à ceux obtenus dans cette étude. Il faut cependant garder à l'esprit que les techniques utilisées sont différentes. Nous avons utilisé une PCR nichée réalisée avec des amorces *28S* spécifiques des différents types de clades, alors que T. DeBoer a réalisé une migration sur un gel dénaturant puis une amplification et le séquençage de l'ADNr *ITS2*. L'avantage de la technique de T. DeBoer est qu'elle permet d'identifier plusieurs sous-clades d'un même clade, et l'avantage de la technique que nous avons mise au point est qu'elle permet d'identifier les clades ultraminoritaires.

Comme de nombreux taxa de la région Pacifique, la diversité des *Symbiodinium* présents au sein des bécitiers diminue d'ouest en est à travers le Pacifique sud (Figure 46). La diversité des *Symbiodinium* est la plus faible au niveau du Pacifique sud-est (Polynésie française, îles Cook et Samoa), intermédiaire au niveau de Fidji et du Vanuatu, et la plus élevée au niveau de l'Indo-ouest-Pacifique (Australie et Papouasie Nouvelle Guinée : Weber, 2009).

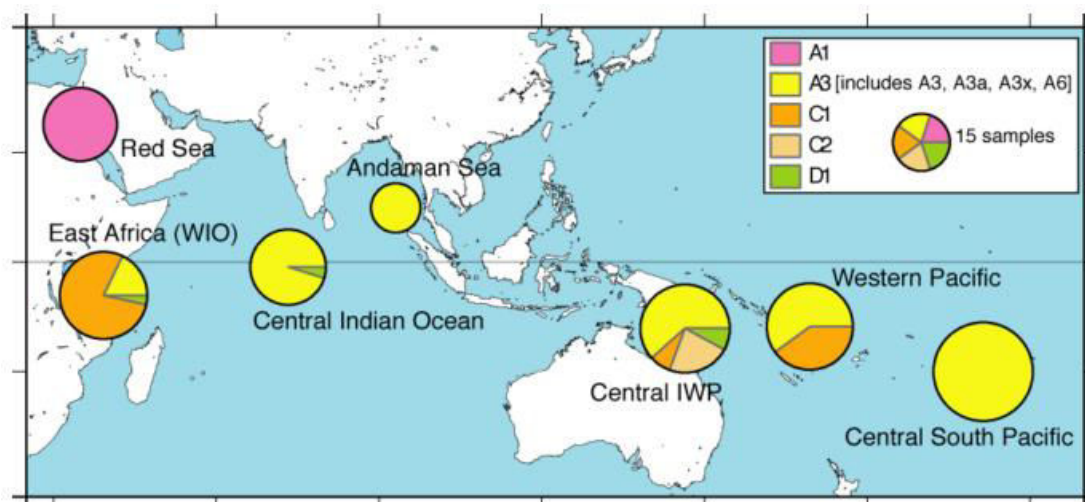


Figure 46. Distribution des sous-clades de *Symbiodinium* présents au sein des bécitiers, mise en évidence à partir de séquences ITS2. La couleur jaune inclut toutes les lignées proches du type A3. La taille des cercles représente le nombre d'échantillons de chaque région. (D'après Weber, 2009)

5 sous-clades de *Symbiodinium* différents, appartenant aux clades A, C et D, ont pu être identifiés parmi les 48 échantillons de notre étude. Pour la même espèce, *T. maxima*, au niveau de l'Indonésie, 7 sous-clade de *Symbiodinium* ont été identifiés sur 28 échantillons (DeBoer *et al.*, 2012), confirmant la présence d'une diversité bien plus importante dans cette région. Il semble donc que la diversité des *Symbiodinium* soit originaire de la région Indo-Pacifique, et que ces derniers se soient ensuite dispersés dans les îles isolées, à partir de cette région (Briggs, 2007; Rosen, 1988). Le clade A est présent, associé aux bécitiers, sur une aire d'étude allant de la mer rouge à la Polynésie française (Figure 47). Ce clade a été décrit comme étant la lignée de *Symbiodinium* la plus ancestrale, à partir de laquelle les autres clades auraient divergé (aPochon (Pochon *et al.*, 2006; Tchernov *et al.*, 2004). De plus le clade A, capable de s'associer à une large gamme de types d'hôtes, a démontré de grandes capacités de dispersion (LaJeunesse, 2001). Il n'est donc pas surprenant de le retrouver dans tous nos échantillons de Polynésie française. Le sous-clade A3 apparaît comme un type généraliste qui s'est diversifié au cours du temps, amenant à l'apparition de lignées dérivées spécifiques de régions géographiques particulières (Weber, 2009).

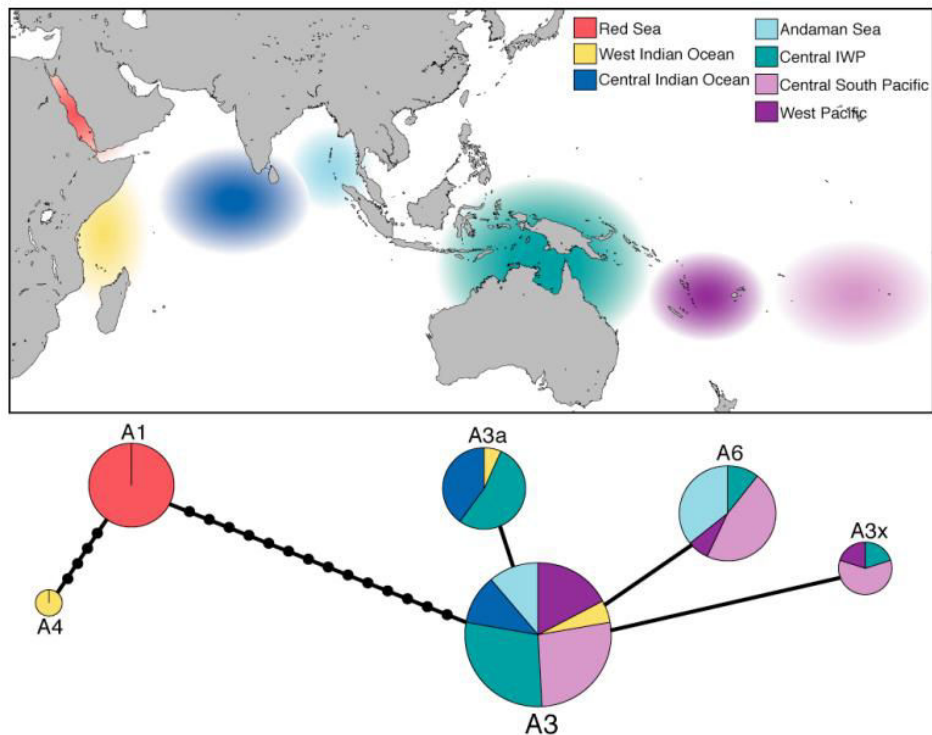


Figure 47. Diagramme en réseau du clade A de *Symbiodinium* présent au sein du genre *Tridacna*. Les camemberts représentent la proportion de chaque sous-clade au sein du clade A, identifiés dans chaque région. Chaque ligne noire représente un changement au niveau d'un nucléotide parmi les 300 nucléotides de la séquence ITS2 et chaque point noir représente un génotype intermédiaire hypothétique. La taille des cercles représente la taille de l'échantillon ; Le type ancestral A3 a été identifié chez 63 bénitiers. (D'après Weber, 2009)

Dans cette étude, les sous-clades A3, A6 et A3x ont été identifiés parmi les bénitiers de Polynésie française, alors que parmi nos échantillons le sous-clade A3 a été identifié, seul ou indifférenciable des sous-clades A4 et A16. En plus du clade A, présent chez l'ensemble des échantillons de notre étude, le clade C a été observé chez 83% des individus, et dans un cas, il a également été trouvé associé au clade D en plus du A. Le plus étonnant est que nous avons observé que le clade C était majoritaire chez 38% des bénitiers de Polynésie française, alors qu'il n'avait pas été détecté dans l'étude de Weber qui indiquait qu'en Polynésie française *T. maxima* était spécialiste du sous-clade A3 et des lignées proches qui en dérivait. Notre étude remet donc en cause l'existence d'une association symbiotique unique entre *T. maxima* et le sous-clades A3 de *Symbiodinium* décrite par Weber (Weber, 2009). A une échelle encore plus grande, les mêmes sous-clades de *Symbiodinium* ont été retrouvés au sein d'hôtes différents et dans des lieux différents (océans Atlantique et Pacifique), suggérant que ces organismes sont capables d'une large dispersion et ne sont pas spécifiques d'un type d'hôte (T. C. LaJeunesse, 2001). Nos

résultats confirment cette observation, puisque le type C57, identifié chez les bénitiers dans le cadre de notre étude, a déjà été observé au sein de coraux au niveau du Japon.

Nos résultats indiquent que le clade A semble non seulement le clade omniprésent au sein des bénitiers Polynésie française, mais également qu'il présente dans 62% des cas, la plus forte abondance au sein des individus. Par comparaison, en Indonésie le clade A n'est présent que chez 36% de individus, et 2 sous-clades, A3, commun avec les individus de Polynésie française, et A6, ont été identifiés (DeBoer *et al.*, 2012). Nos résultats indiquent que seuls 14% des bénitiers de Polynésie française sont associés avec un seul clade (A), contre 68% en Indonésie : 25% avec le clade A, 32% avec le clade C, et 11% avec le clade D (DeBoer *et al.*, 2012). L'association avec plusieurs sous-clades de symbiontes semble donc bien plus répandue en Polynésie française malgré une diversité symbiotique plus faible. Contrairement à l'Indonésie (DeBoer *et al.*, 2012), le clade C n'a pas été retrouvé seul au sein des bénitiers. Il est donc toujours en présence du clade A, et très rarement en présence du clade D (environ 2% des individus). Le sous-clade C57 est présent chez au moins 10% des individus et au moins 14% des individus possède un sous-clade parmi les suivants, C1, C2, C15, C90 et C91, mais plutôt les sous-clades C1 et C90 d'après nos analyses. Concernant le clade D identifié dans un échantillon de notre étude, il n'a pas pu être identifié mais semble proche des sous-clades D1, D1a, D8/D13 et D15. Parmi ces 4 sous-clades de *Symbiodinium*, seul le sous-clade D1a a déjà été identifié au sein de *T. maxima* en Indonésie (DeBoer *et al.*, 2012), et seuls les sous-clades D1 et D1a ont été identifiés au sein des coraux en Polynésie française (Putnam *et al.*, 2012). Il est donc probable que le sous-clade de *Symbiodinium* de clade D identifié dans notre étude soit un haplotype appartenant au sous-clade D1a. Le bilan de l'ensemble des clades et sous-clades de *Symbiodinium* identifiés à ce jour chez *T. maxima* de la mer rouge à la Polynésie française, incluant les résultats de notre étude, est regroupé dans le Tableau 18.

Tableau 18. Clades et sous-clades de *Symbiodinium* identifiés chez *T. maxima* de la mer rouge à la Polynésie française, incluant les résultats de notre étude.

Clade de <i>Symbiodinium</i>	A			C			D			Technique	Référence
	A1	A3	A6	C1	C15-30	C57	D1a	D1b/D5	D1b-103		
Sous-clade											
Mer rouge et golf de l'Aqaba	X									ADNr ITS2	Weber 2009
Ouest de l'océan Indien				X						ADNr ITS2	Weber 2009
Philippines et Palau	X									ADNr 18S	Carlos et al. 1999
Indo-Pacifique		X								ADNr ITS2	Baillie et al.2000
Indo-Pacifique		X								marqueurs microsatellites	Pinzon et al. 2011
Indonésie		X	X	X	X		X	X	X	DGEE + ADNr ITS2	DeBoer et al. 2012
Fidji et Vanuatu		X		X						ADNr ITS2	Weber 2009
Polynésie française, îles Cook et Samoa		X								ADNr ITS2	Weber 2009
Polynésie française		X		?		X	?			ADNr 28S	Notre étude 2014

Alors qu'en Polynésie française nos résultats ont montré que l'association symbiotique de *T. maxima* avec le clade A est largement majoritaire, en Indonésie *T. maxima* ne semble pas associé avec un clade particulier de *Symbiodinium* (DeBoer *et al.*, 2012). Deux types d'associations symbiotiques sont communs aux deux sites : A et AC, mais dans des proportions très différentes (Tableau 19), possiblement liées aux techniques utilisées. Les types d'associations symbiotiques trouvées en Indonésie sont plus variés qu'en Polynésie française, avec des combinaisons de clades spécifiques de cette région : C, CD et D. En contrepartie la combinaison de clades ACD semble spécifique à la Polynésie française.

Tableau 19. Proportions des différentes combinaisons de clades observées au sein de *T. maxima* en Indonésie (DeBoer *et al.*, 2012) et dans nos échantillons de Polynésie française.

Combinaison	Polynésie française	Indonésie
A	14%	25%
AC	83%	11%
ACD	2%	-
C	-	32%
CD	-	21%
D		11%

Le sous-clade A6, trouvé en Indonésie, n'a pas été retrouvé en Polynésie française, le sous-clade C15-31 semble spécifique à l'Indonésie et C57 à la Polynésie française, et les sous-clades D1a et D1b/D5 ont été identifiés en Indonésie alors que le sous-clade trouvé en Polynésie française semble légèrement différent de ces derniers, et commun à un sous clade trouvé au sein d'un corail en mer de Chine (Jeong *et al.*, 2014).

Si on considère la répartition géographique des sous-clades de *Symbiodinium* chez *T. maxima* en Indonésie (Figure 17 : DeBoer *et al.*, 2012) et en Polynésie française (Figure 43 : notre étude), certains sites présentent de nombreux sous-clades de *Symbiodinium*, alors que d'autres sites présentent une spécificité des sous-clades. Par exemple le site *Biak* compte 7 sous-clades de *Symbiodinium* différents et Tahiti ouest au moins 4, alors que *Yapen*, *Misool* et *Dampier Strait* (Figure 48) ne comptent que 3 sous-clades différents, et *Raivavae* seulement 2. En Polynésie française, le sous-clade A3 se retrouve sur tous les sites, ce qui n'est le cas d'aucun type de *Symbiodinium* en Indonésie, malgré une aire d'étude 10 fois plus petite. En Indonésie les sous-clades A3-223 et C1 ne sont présents que sur un seul site, *Biak*, qui est celui qui présente la diversité symbiotique la plus élevée (Figure 48). En Polynésie française, 2 sous-clades de *Symbiodinium* sont spécifiques d'un site : le sous-clade D, trouvé à Tahiti ouest, qui présente une

diversité symbiotique importante, et le sous-clade C57, trouvé à Raivavae. Sur ce dernier site tous les bénitiers échantillonnés vivent simultanément en symbiose avec les sous-clades A3 et C57, indiquant une particularité géographique parlante de cette région. Concernant la diversité des *Symbiodinium*, il semblerait que les Australes se distinguent des autres archipels, indiquant une frontière nord/sud en Polynésie française. Comparée à la frontière nord/sud délimitée lors de l'étude de la diversité génétique de *T. maxima*, qui distinguait les Tuamotu des autres archipels, celle définie par l'étude de *Symbiodinium* se situe ainsi plus au sud.

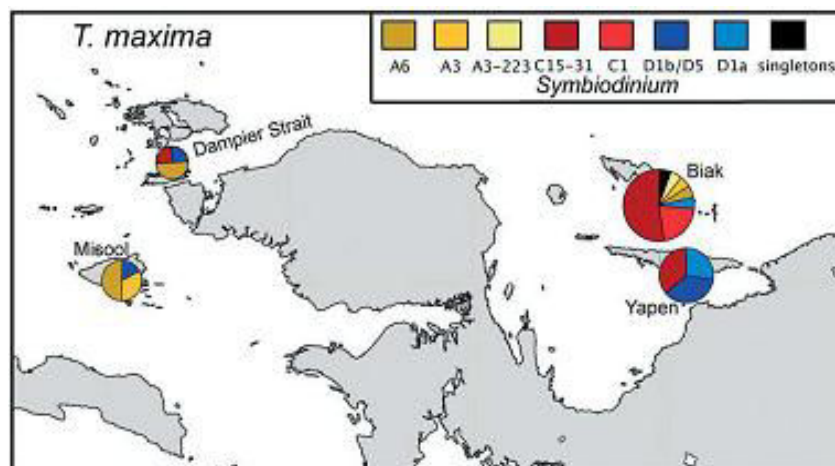


Figure 48. Fréquence de chaque type de *Symbiodinium* chez *T. maxima*. Les hôtes contenant plusieurs sous-clades de *Symbiodinium* sont comptés comme contribuant de façon équitable (50%) à chaque sous-clade. (D'après DeBoer, 2012)

Nos résultats ne montrent aucun lien entre les sous-clades de *Symbiodinium* et le clade de l'hôte au sein duquel ils se trouvent, il semble donc qu'aucune association symbiotique ne soit spécifique des clades de bénitiers présents en Polynésie française, mais cette observation doit être vérifiée par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons.

Au final, dans cette étude, les associations symbiotiques semblent indépendantes du clade de bénitier (*mapiko sud* ou *mapiko nord*). Le sous-clade ubiquitaire A3 a été identifié parmi nos échantillons et semble présent chez tous les bénitiers en Polynésie française. Le sous-clade C57 a été identifié pour la première fois au sein des bénitiers, mais également pour la première fois en Polynésie française. Il semble présent uniquement dans l'archipel des Australes où les températures de l'eau sont les plus basses de la Polynésie française, ce qui suggère une thermosensibilité différente avec les autres sous-clades disponibles dans la région. Il a été identifié au sein de coraux au Japon, où les températures de l'eau varient entre 14 et 26°C en fonction des sites et de la période de l'année, ce qui conforte l'hypothèse d'une résistance à de

faibles températures (pour des lagons). Le fait qu'il n'ait pas été identifié au niveau de la Société et des Tuamotu sud, indique qu'il serait également thermosensible, non adapté aux températures supérieures à 27°C.

Les *Symbiodinium* présents dans l'estomac des bénitiers sont d'origine exogène puisque acquis par l'alimentation (Anonyme, 2006). L'expulsion des *Symbiodinium* par les coraux les rend disponibles pour les bénitiers, et réciproquement. L'établissement de la symbiose entre des *Symbiodinium* provenant de coraux et des larves de bénitiers a été observée (Kurihara *et al.*, 2012), indiquant que des échanges de symbiontes entre ces organismes est tout à fait possible (Belda-Baillie *et al.*, 1999). La lignée dominante dans l'océan Pacifique, associée aux coraux, est le clade C (Abrego *et al.*, 2009; Lajeunesse *et al.* 2003; Lajeunesse *et al.* 2004; Lajeunesse *et al.* 2004). Le clade D, relativement rare, semble présent à moins de 10% dans les communautés symbiotiques coralliennes, mais avec une grande aire de répartition (Lajeunesse *et al.*, 2010). Les clades A, B (à l'état de trace), C et D ont été trouvés au sein de 3 espèces de coraux en Polynésie française (Rouzé, 2013). Les 4 clades sont donc certainement présents dans l'environnement, et donc disponibles pour les bénitiers. Or seuls 3 clades, A, C et D, ont été trouvés au sein des bénitiers, suggérant une spécificité d'hôte. Deux hypothèses permettraient d'expliquer cette spécificité. La première serait que les conditions présentes au sein du manteau soient plus favorables à certains clades de *Symbiodinium*. De plus, lors d'une infection de bénitiers avec deux clades différents de *Symbiodinium*, il a été montré que l'un des deux peut prendre le dessus sur l'autre par compétitivité une fois à l'intérieur du bénitier (Fitt, 1985). On sait également que les clades de *Symbiodinium* présentent des taux de croissance différents au sein des bénitiers, et certains clades (non déterminés) meurent quand ils sont prélevés dans l'estomac et placés dans le manteau (Fitt, 1985). Ainsi, la sélection d'un clade particulier peut s'effectuer de façon passive et être déterminée par la capacité de ce clade à survivre dans l'environnement particulier présent au sein de l'hôte (Fitt, 1985). Cette hypothèse est d'autant plus plausible que la symbiose s'établit au stade pédivéligère et que lors de notre étude l'identification des communautés symbiotiques a été réalisée chez des individus adultes, donc plusieurs années après l'acquisition des symbiontes. La seconde hypothèse, non exclusive avec la précédente, consiste en l'existence d'un système de reconnaissance des différents clades (sous-clades) de *Symbiodinium* par les bénitiers, sélectionnant ainsi ceux susceptibles d'être maintenus. Ce système de reconnaissance pourrait se situer au niveau des cils branchiaux qui serait à l'origine de l'intégration ou non d'un type de clade voire sur l'ensemble de l'épithélium stomacal et tubulaire pour leur fixation. L'identification de protéines d'adhésion aux

Symbiodinium, par rétention sur une colonne d'affinité par exemple, permettrait de valider cette seconde hypothèse. Cependant, le système semble encore plus complexe, puisque les *Symbiodinium* inoculés chez les larves aposymbiotiques de bédouilles placés en milieu « stérile » sont génétiquement différents de ceux que l'on retrouve dans l'hôte plusieurs mois plus tard, ce qui souligne la dynamique des populations de *Symbiodinium* présentes au sein des bédouilles, populations qui ne sont donc pas clonales (Belda-Baillie *et al.*, 1999).

Pour terminer, si on se place du point de vue de l'écologie des récifs coralliens, les bédouilles représentent une forte concentration de symbiotes et en relarguent une grande quantité (Maruyama et Heslinga, 1997). La diversité de leurs clades/sous-clades hébergés, ne reflète pas les communautés présentes dans le milieu environnant. Ainsi, les bédouilles pourraient contribuer significativement à maintenir la disponibilité/dispersion de symbiotes particuliers dans les zones récifales et rendre disponibles certains clades/sous-clades pour les autres animaux vivant en symbiose avec eux (DeBoer *et al.*, 2012) tels que les coraux mais aussi les éponges, les nudibranches et autres (Wecker *et al.*, soumis), et servir ainsi d'espèce « clef de voûte ».

PARTIE IV

Réponse de *Tridacna maxima* au stress thermique

Connaître l'impact du stress thermique sur les organismes marins représente un enjeu majeur dans le contexte actuel du réchauffement climatique. Deux expériences de stress thermique ont été menées afin de déterminer les réponses transcriptomiques et métabolomiques des béditiers dans différentes conditions.

I. Choix du stress thermique appliqué et mesures des paramètres de l'eau au cours de l'expérience

Afin de déterminer la réponse des béditiers à divers types de stress thermique ainsi qu'à un multi-stress, c'est à dire un stress thermique plus la modification d'un autre paramètre physique de l'environnement, deux expériences de réchauffement ont successivement été menées. La première a pour but de comparer la réaction des béditiers à un même stress thermique conséquent, en présence ou en absence de coraux de l'espèce *Pocillopora damicornis*. Cette espèce de corail a été spécifiquement choisie car elle fait partie, avec *Porites rus*, des deux espèces les plus régulièrement décrites dans la littérature à proximité des béditiers, ce qui a été confirmé par nos observations de terrain. La seconde permet d'observer les effets d'un stress thermique plus modéré et ceux d'un stress multiple. Deux types de stress multiple ont été appliqués aux béditiers: un stress thermique conséquent assorti d'un stress lumineux consistant en l'absence de lumière, et un stress thermique conséquent assorti d'un stress hyperoxique consistant avec l'augmentation de la quantité de dioxygène dissous dans l'eau (Figure 49). Tous les béditiers ont été acclimatés dans les bacs pendant 15 jours avant le début de l'expérience. Les béditiers de la première et de la deuxième expérience ont été prélevés à 20 jours d'intervalle sur le même site, ils avaient sensiblement la même taille et ont été conditionnés de la même façon pour le transport.

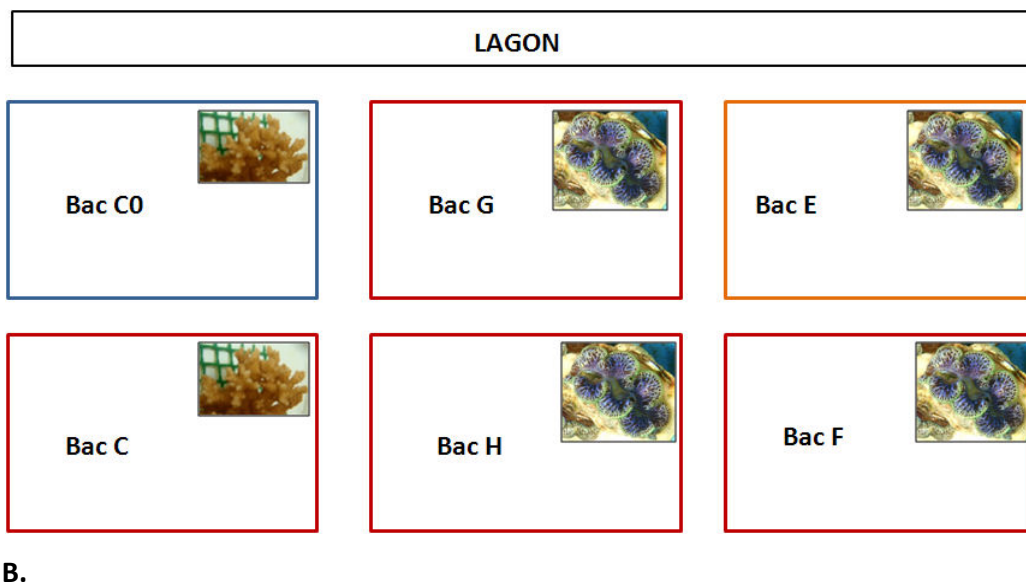
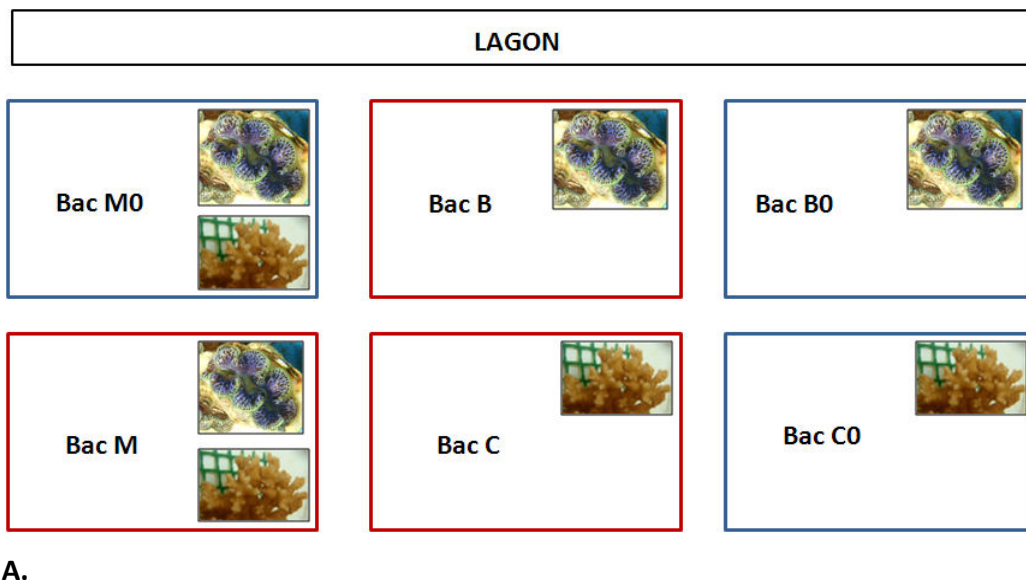


Figure 49. Disposition des aquariums dans les deux expériences de réchauffement. A : Expérience 1, B : Expérience 2. En bleu les bacs témoins, alimentés par l'eau du lagon à température ambiante, en rouge, aquariums ayant subi le stress thermique conséquent (jusqu'à 32°C), en orange, aquarium ayant subi le stress thermique modéré (jusqu'à 28°C). B, B0, E, F, G, H : Bacs contenant des bécitiers, C, C0 = Bacs contenant des coraux, M = Bac mixte (bécitiers + coraux), B0, C0 et M0 : Bacs témoins (26°C), E = Bacs chauffés (stress niveau 1) + O₂ + lumière, F = bac chauffé (stress niveau 2) + O₂ + lumière, G = bac chauffé (stress niveau 2) + O₂ – lumière (lumière cachée par un carton), H = bac chauffé (stress niveau 2) – O₂ + lumière (bulleur, air lift et pompe de brassage enlevés).

Le stress thermique conséquent consistait à augmenter la température d'1°C toutes les 24 heures, par palier jusqu'à atteindre 32°C, température maintenue pendant 5 jours avant un retour à la température initiale de 26°C en 24 heures. La température seuil de 32°C a été choisie grâce aux données de la littérature qui font état d'un blanchissement ou d'une mortalité des bécotiers lorsque les températures dépassent 30/31°C pendant un certain temps (Addessi, 2001) ou lorsque les variations de température (*Sea Surface Temperature SST*) sont importantes (Andréfouët *et al.*, 2013). Le stress thermique modéré consistait en une augmentation d'1°C toutes les 24 heures jusqu'à atteindre 28°C, température maintenue pendant 9 jours (Figure 50). Ces deux expériences ont été réalisées de façon consécutive, dans les mêmes conditions et à 20 jours d'intervalle. Les temps de prélèvements (t0 à t6) ont été définis à des moments clés de l'expérience (au cours de l'augmentation progressive de la température, lorsque le seuil de 32°C a été atteint, à la fin du plateau à 32°C, dès le retour à la température initiale et 24h après) et leur nomenclature est identique pour les deux expériences (Figure 50). Deux temps de prélèvement (T1 et T6) ont été retirés des bacs « mixtes » afin de diminuer le nombre de bécotiers et de laisser de la place dans les aquariums pour les coraux, permettant ainsi de respecter le volume d'eau minimum recommandé pour les expériences sur les bivalves (Bayne *et al.*, 1985).

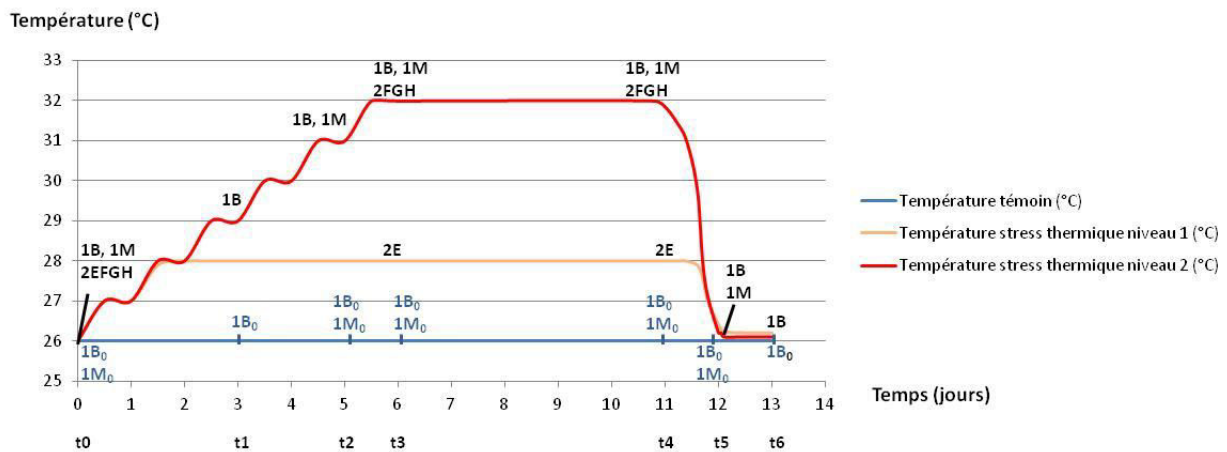


Figure 50. Courbe de température des expériences de réchauffement et temps de prélèvement des bécotiers. 1 : 1^{ère} expérience, 2 : 2^{ème} expérience, B : *T. maxima* stress thermique, M : *P. damicornis* + *T. maxima* stress thermique, B₀ : *T. maxima* témoin, M₀ : *P. damicornis* + *T. maxima* témoin, E, F, G, H : *T. maxima*, E : stress thermique niveau 1, F : stress thermique niveau 2, G : stress thermique niveau 2 + stress lumineux, H : stress thermique niveau 2 + stress anoxique. En bleu : Température des aquariums témoin, en orange : température des aquariums chauffés jusqu'à 28°C, en rouge : température des aquariums chauffés jusqu'à 32°C.

Un minimum de 4 individus était prélevé à chaque temps de prélèvement (Tableau 20). Chaque bénitier prélevé au cours de l'expérience a été disséqué et le manteau a été séparé en 3 fragments distincts afin d'être stockés pour les analyses génétiques, transcriptomiques et métabolomiques. Les échantillons étaient labélisés de la façon suivante : pour le bac B les 5 échantillons prélevés au temps t0 étaient marqués Bt01 à Bt05, pour le temps 1 Bt11 à Bt15, etc. La première lettre représente ainsi le bac d'où provient l'échantillon, la seconde le temps de prélèvement, et la troisième le numéro du réplicat.

Tableau 20. Répartition des prélèvements et nombre de bénitiers prélevés.

N° de l'expérience	Nom des bacs	Temps prélèvements	de	Nombre de répliquats	de	Nombre d'échantillons	total
				prélèvement			
1	B, B0	t0, t1, t2, t3, t4, t5, t6		5		70	
1	M, M0	t0, t2, t3, t4, t5		5		50	
2	E, F, G, H	t0, t3, t4		4		48	
TOTAL						168	

Hormis la température pour les bacs chauffés, les paramètres physiques de l'eau sont restés stables au cours de l'expérience dans l'ensemble des bacs. La salinité était en moyenne de $37 \pm 0,28$ (sans unité), la conductivité de $56,1 \pm 0,28$ mS et le pH de $8,5 \pm 0,07$. Dans les bacs H (stress thermique plus stress hyperoxique), la quantité de dioxygène dissous et la saturation en air étaient respectivement de $7,0 \pm 0,50$ mg/ml et $111,2 \pm 5,58$ %, alors que dans les autres bacs, elle était de $6,2 \pm 0,24$ mg/ml et $101,5 \pm 3,97$ %.

Les sels nutritifs ont été mesurés dans les bacs B, B0, M et M0, à T0 et à T3. La quantité de phosphates (PO_4) et de dioxyde d'azote (NO_2) est restée stable dans les bacs, avec des valeurs respectives de $0,24 \pm 0,11$ μ mol/L et $0,15 \pm 0,03$ μ mol/L. La quantité d'acide silicique ($Si(OH)_4$) était légèrement différente entre les bacs à t0 et à t3, avec des valeurs respectives de $3,92 \pm 0,23$ μ mol/L et $3,03 \pm 0,31$ μ mol/L. Les nitrates et nitrites, mesurés ensemble (NO_x), sont les sels nutritifs qui ont présenté la variation la plus importante, avec $0,37 \pm 0,24$ dans les bacs témoin, et $0,92 \pm 0,19$ dans les bacs stressés.

Les coraux ont commencé à blanchir à t1 dans le bac M0, t3 dans le bac M et étaient blanchis dans le bac C et morts dans le bac C0 à t2. Une efflorescence algale ainsi qu'une forte sédimentation ont été observés à t1 et t2 dans les bacs E et F. Les bénitiers étaient réactifs et colorés tout au long de l'expérience, excepté dans le bac G (absence de lumière) où ils étaient moins ouverts que dans les autres bacs tout au long de l'expérience. Dans ce bac, ils ont

commencé à blanchir (Figure 51) et à être moins réactifs à t3, et sont restés ainsi jusqu'à t4, 5 jours plus tard. Aucune mortalité n'a été observée chez les bénitiers tout au long des deux expériences de réchauffement.

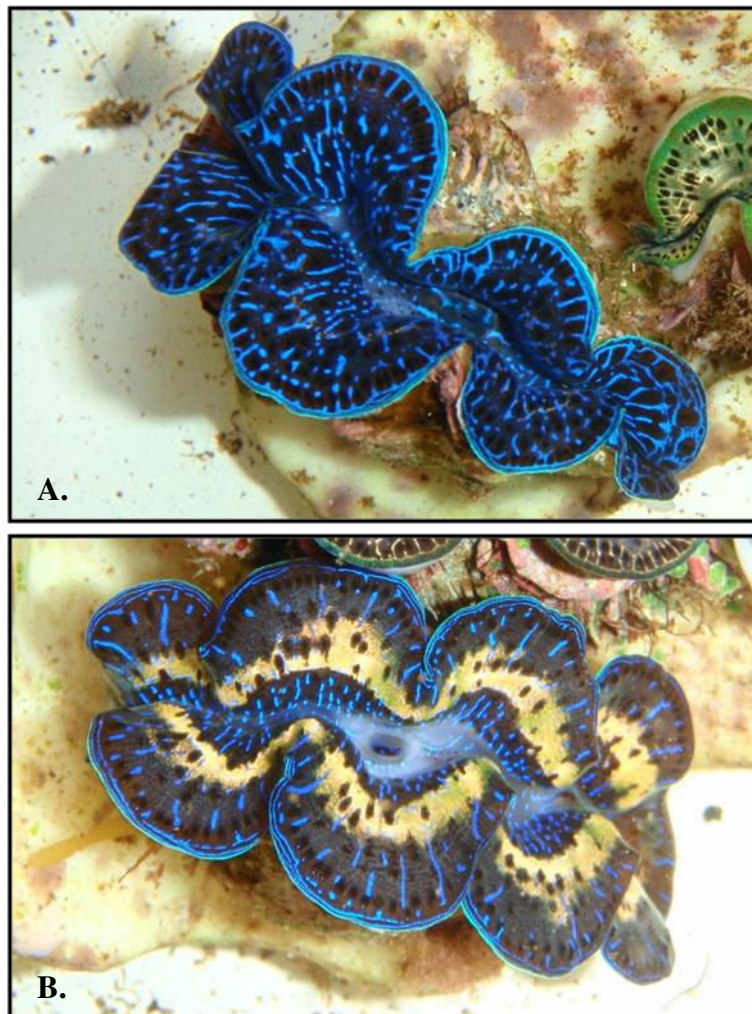


Figure 51. Photos d'un bénitier avant (A) et après (B) le blanchissement. Bénitier du bac G, stress thermique plus lumineux, prise à t0 (A) et à t3 (B).

II. Expression différentielle des gènes au cours du stress chez

T. maxima

A ce jour, on ne dispose d'aucune donnée sur l'expression génique des Tridacnids, nous avons donc réalisé un transcriptome complet de *T. maxima* afin d'avoir une référence pour l'analyse de l'expression des gènes en différentes conditions de stress.

II.1 Transcriptome global de *T. maxima*

Un transcriptome a été réalisé à partir de deux ressources de séquençage différentes afin d'avoir une profondeur maximale et d'obtenir un ensemble le plus exhaustif possible de transcrits spécifiques de cette espèce. Les gènes exprimés par 29 individus prélevés en différents sites et ayant subi divers types de stress ont ainsi participé à la construction du transcriptome global de *T. maxima*.

213 588 603 séquences de 100 pb ont été obtenues lors du 1^{er} séquençage, et l'assemblage de ces séquences effectué par le fournisseur a abouti à l'obtention de 878 101 contigs. L'assemblage des contigs a permis de diminuer leur nombre à 569 182. Au final, 71,84% des séquences ont permis d'obtenir 569 182 séquences de transcrits d'une longueur moyenne de 583 bases. Le second séquençage a généré 66 241 694 paires de séquences pour un total de 6 690 411 094 bases. Leur assemblage effectué par le fournisseur a abouti à l'obtention de 185 331 contigs compris entre 201 et 17 796 paires de bases, pour une longueur totale de 91 458 612 bases.

Après avoir regroupé ensemble les 346 071 991 séquences provenant des deux séquençages, nous avons obtenu 185331 contigs initiaux (N50:583), et après nettoyage d'après couverture des reads leur nombre a été réduit à 75092, dont 40221 ont été conservés (avec cds>300 aa). Un peu plus de 50% des transcrits ont pu être annotés. Les transcrits identifiés ont été classés en 6 grands groupes fonctionnels suivant la classification KEGG (Figure). 24% des transcrits identifiés correspondent à l'expression de gènes des différents systèmes de l'organisme, 23% à la réaction aux maladies, 20% au métabolisme, 13% au traitement de l'information sur l'environnement, 10% aux processus cellulaires et 10% au traitement de l'information génétique. Parmi ces groupes (excepté le groupe « réponse aux maladies » qui fait essentiellement référence aux maladies humaines), nous avons observé en détail chacune des voies qui les composent (Figure 52).

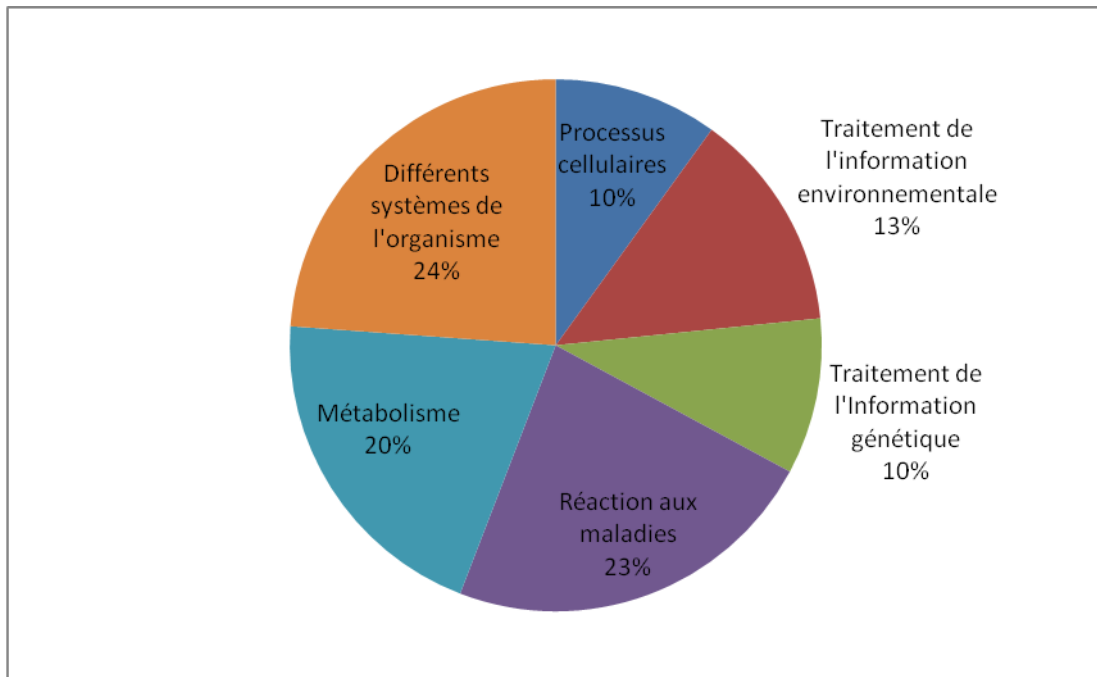


Figure 52. Répartition des 6 groupes de transcrits du transcriptome global de *T. maxima*.

Ainsi, en ce qui concerne les « processus cellulaires », les transcrits annotés se partagent équitablement entre « Transport cellulaire et catabolisme » et « Croissance et mort cellulaire » et représentent environ 33 % des transcrits de ce groupe, puis on retrouve les transcrits qui participent aux relations cellulaires, « communauté cellulaire » et enfin, le plus faible pourcentage de représentation (25%) concerne les transcrits participant à la motilité cellulaire (Figure 53). Les différentes proportions de représentation observées ici ne sont pas dues à un biais lors de l'élaboration du transcriptome *de novo*, car ces proportions sont similaires à celles attendues avec l'ensemble des données de la base de données de ce groupe.

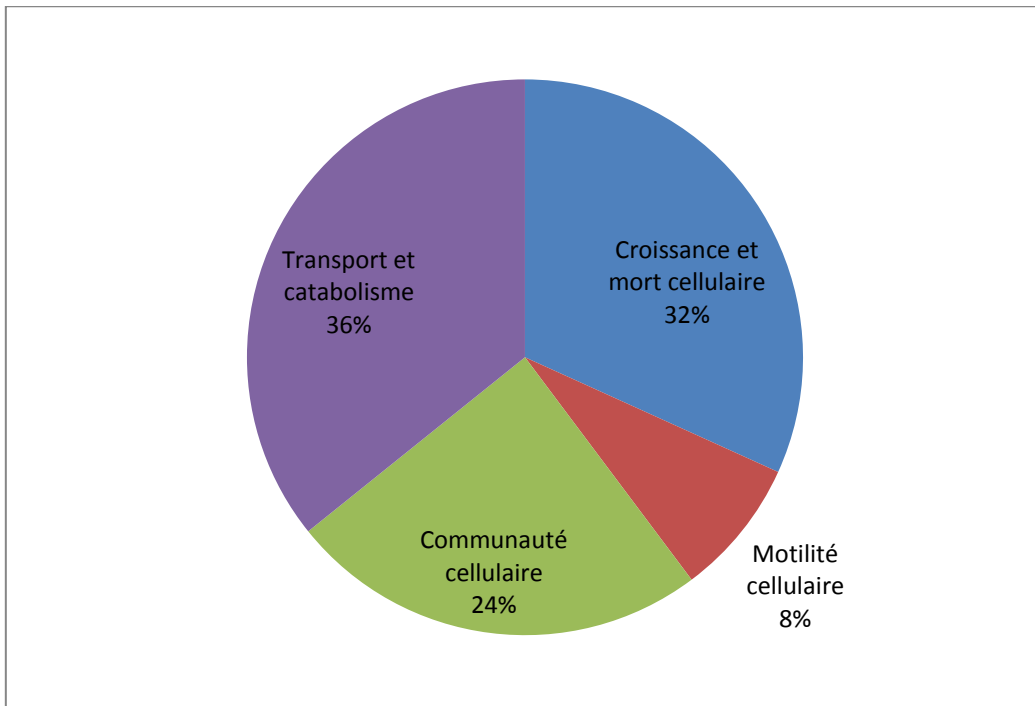


Figure 53. Répartition des transcrits du groupe « Processus cellulaire »

Pour le groupe intitulé « Traitement de l'information sur l'environnement », 89% des transcrits annotés participent aux voies de transduction de signal, voies prépondérantes de ce groupe, le reste étant des molécules de signalisation ou de transport membranaire (Figure 54).

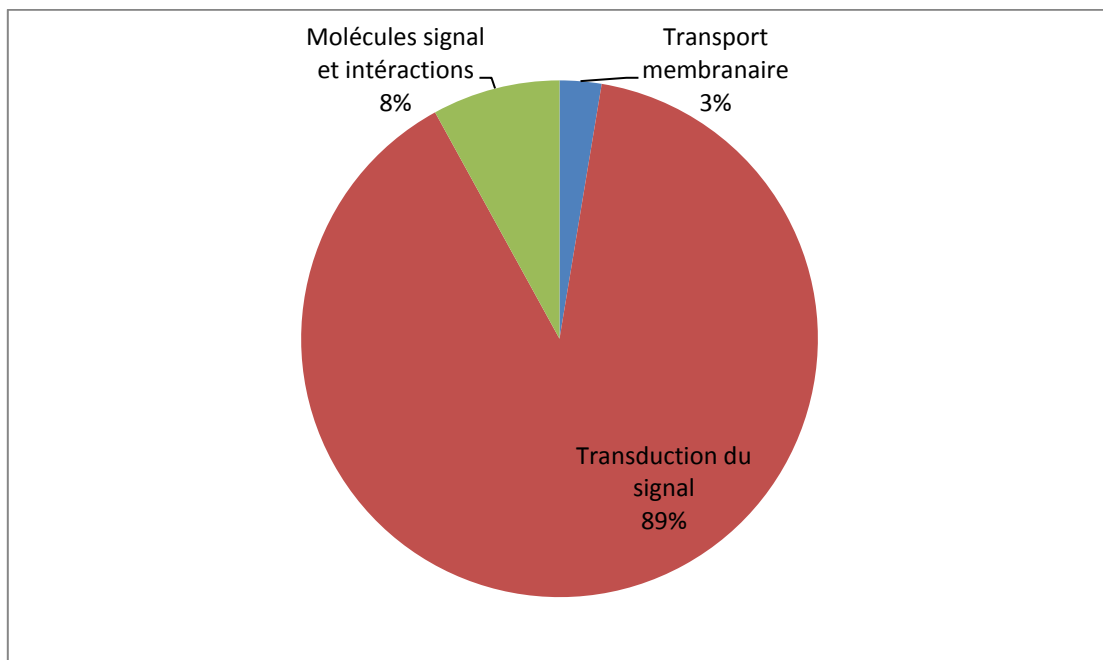


Figure 54. Répartition des transcrits du groupe « Traitement de l'information sur l'environnement »

Pour le traitement de l'information génétique, les transcrits annotés sont regroupés de manière homogène entre les 4 sous-groupes, avec une proportion un peu plus importante (32-34%) pour les voies de ménage (Repliement, tri et dégradation) et la traduction, suivi des voies de la réplication et réparation de l'ADN (20%) et enfin celles liées à la transcription (14% : Figure 55).

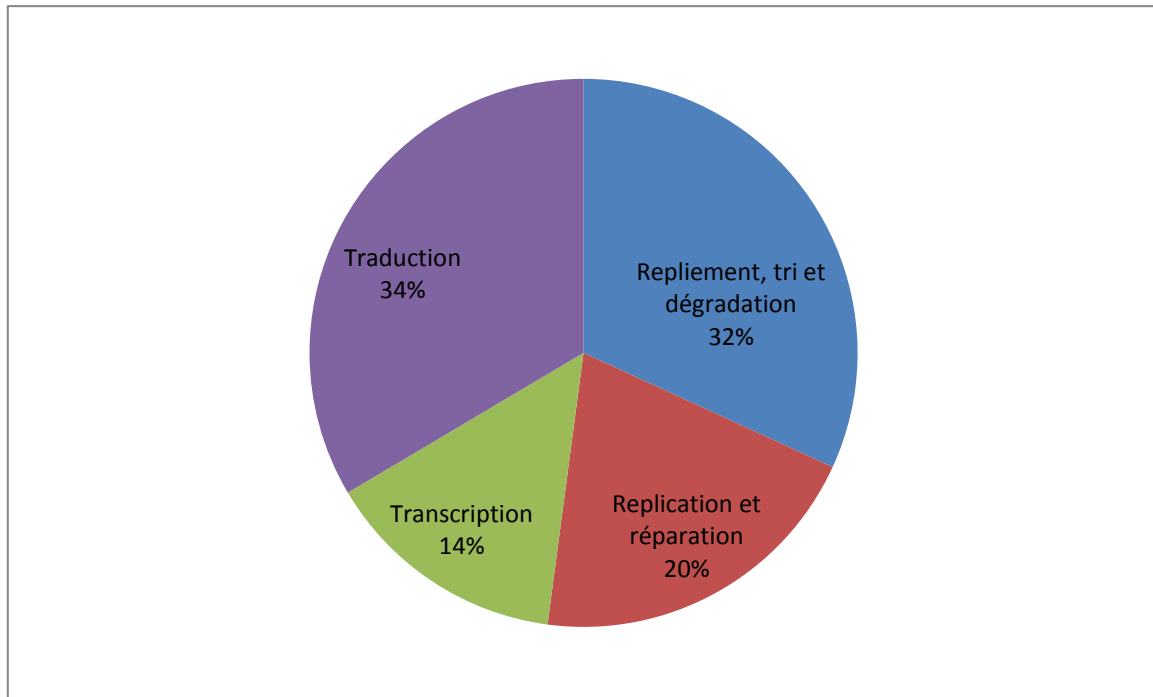


Figure 55. Répartition des transcrits du groupe « Traitement de l'information génétique »

Au niveau du métabolisme, l'ensemble des catégories possibles est représentée, avec majoritairement, celles du métabolisme des acides aminés (17%), des sucres (19%) et des lipides (15%), les 3 principales familles des composants de base cellulaires sur les 4 que comptent le monde vivant (avec les acides nucléiques Figure 56).

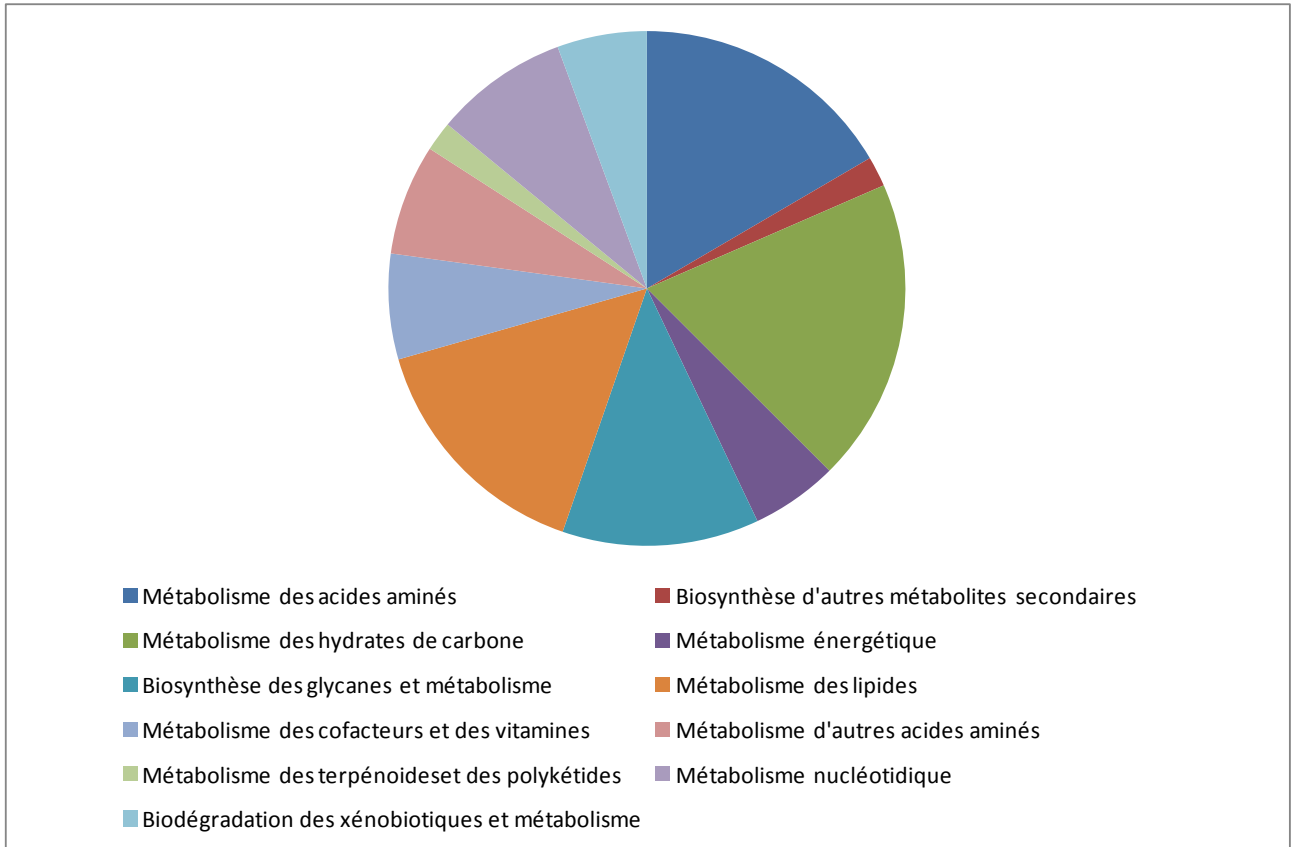


Figure 56. Répartition des transcrits du groupe « Métabolisme »

Avec la classification en système, 5 systèmes se distinguent : il s'agit des systèmes endocriniens, immunitaires, nerveux, digestif et sensoriel : Figure 57). L'emploi de stress et des individus de différentes taille avant l'extraction des ARN a sans doute participé à l'obtention d'une telle variété de transcrits, notamment ceux participant au développement (4%).

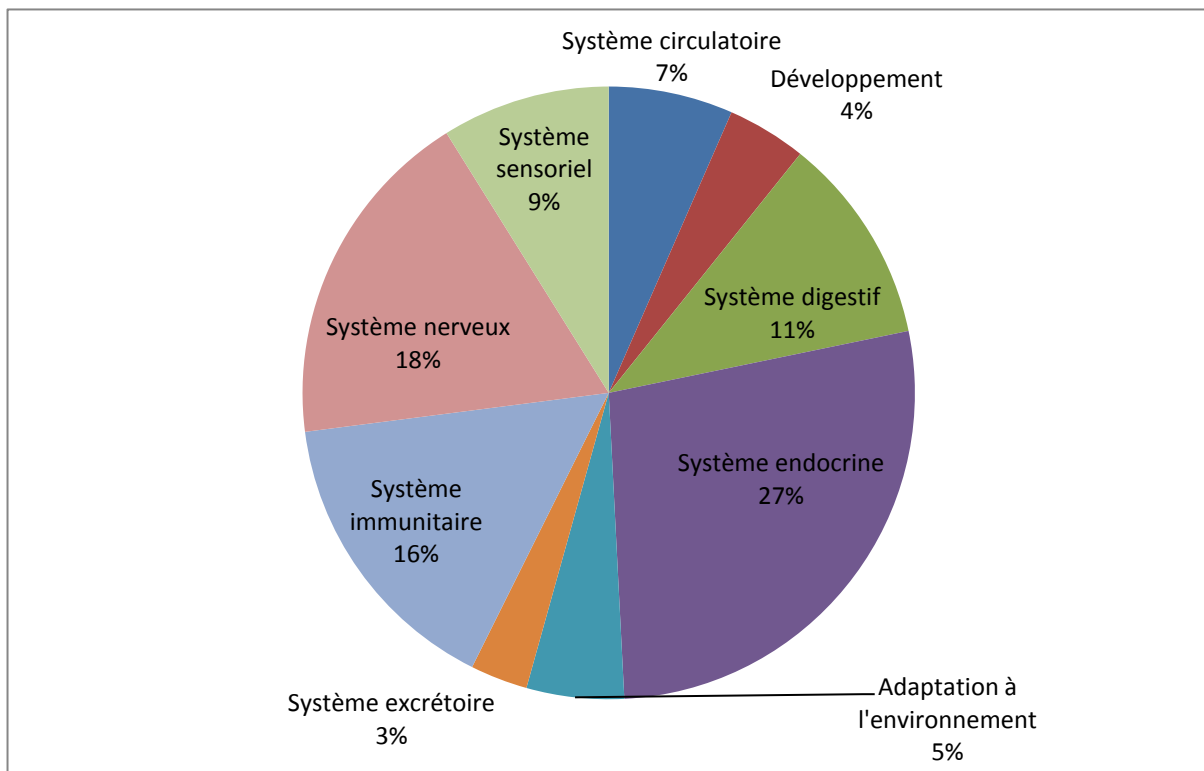


Figure 57. Répartition des transcrits du groupe « Différents systèmes de l'organisme »

La comparaison du transcriptome global de *T. maxima* que nous avons réalisé avec le transcriptome d'autres bivalves marins montre que nous avons obtenu un plus grand pourcentage de transcrits annotés (Tableau 21), comparable à celui de l'annotation du génome et transcriptome de *Crassostrea gigas* réalisé en 2012 (Zhang *et al.*, 2012). Ces annotations ont permis d'identifier de nombreuses voies et de nombreuses fonctions. Ce transcriptome global constitue donc une banque de données conséquente qui a servi de référence pour la comparaison de l'expression génique lors du stress. Seules les voies les plus connues de la réponse au stress ont été analysées dans cette partie.

Tableau 21. Comparaison du transcriptome global de 3 espèces de bivalves marins

Espèce	contigs annotés		Processus biologiques (%)	Composants cellulaires (%)	Fonctions moléculaires (%)	Référence
	Nb/	contigs				
	totaux					
<i>T. maxima</i>	20 201/	50%	1/3	1/3	1/3	Notre étude, 2014
<i>Ruditapes philippinarum</i>	32 606 /	30%	1/3	1/3	1/3	(Milan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pinctada margaritifera</i>	30 666 /	31%	1/2	1/4	1/4	(Huang <i>et al.</i> , 2013)

II.2 Transcriptome différentiel

II.2.1 Analyse globale de l'expression génique

Les ARN obtenus pour chacun des 24 lots de bénitiers de la première expérience, correspondant chacun à une condition et un temps de prélèvement donnés, ont été séquencés puis alignés sur les séquences du transcriptome global, afin de quantifier l'expression génique (nombre de séquences alignées par transcrit). La corrélation entre l'expression de l'ensemble des gènes des 24 lots de bénitiers a été réalisée par une comparaison 2 à 2. Une classification hiérarchique entre ces lots montre que deux lots, correspondant respectivement aux bénitiers prélevés au temps 6 dans les bacs témoins sans coraux (B0t6) et les bénitiers prélevés au temps 1 (29°C) dans les bacs sans coraux (Bt1), présentent une expression génique spécifique, peu corrélée à celle de tous les autres lots (Figure 58). Les 22 lots restants peuvent être séparés en deux grands ensembles. Le premier ensemble regroupe les bénitiers prélevés à 26°C (t0 et bacs non chauffés) quelque soit la configuration avec ou sans coraux (B0t0-6, M0t0-5, Bt0 et Mt0) et aux bénitiers prélevés à 31°C dans les bacs M (Mt2), en présence de coraux. Le second ensemble regroupe les bénitiers prélevés à 31°C dans les bacs B (Bt2) et à compter du prélèvement t3 (atteinte des 32°C) dans les bacs B et M. Il semble donc qu'en présence de coraux à proximité des bénitiers, l'expression génique varie peu entre 26 et 31°C, et qu'elle est modifiée à partir du moment où le seuil de 32°C est atteint. Lorsque les bénitiers sont seuls dans les bacs, l'expression génique semble modifiée plus tardivement, à partir de 32°C. Ensuite, indépendamment de la présence ou non de coraux, l'expression génique semble peu modifiée entre les individus qui viennent d'arriver à 32°C, ceux qui sont à 32°C depuis 5 jours, ou même 24 h après le retour à la température initiale.

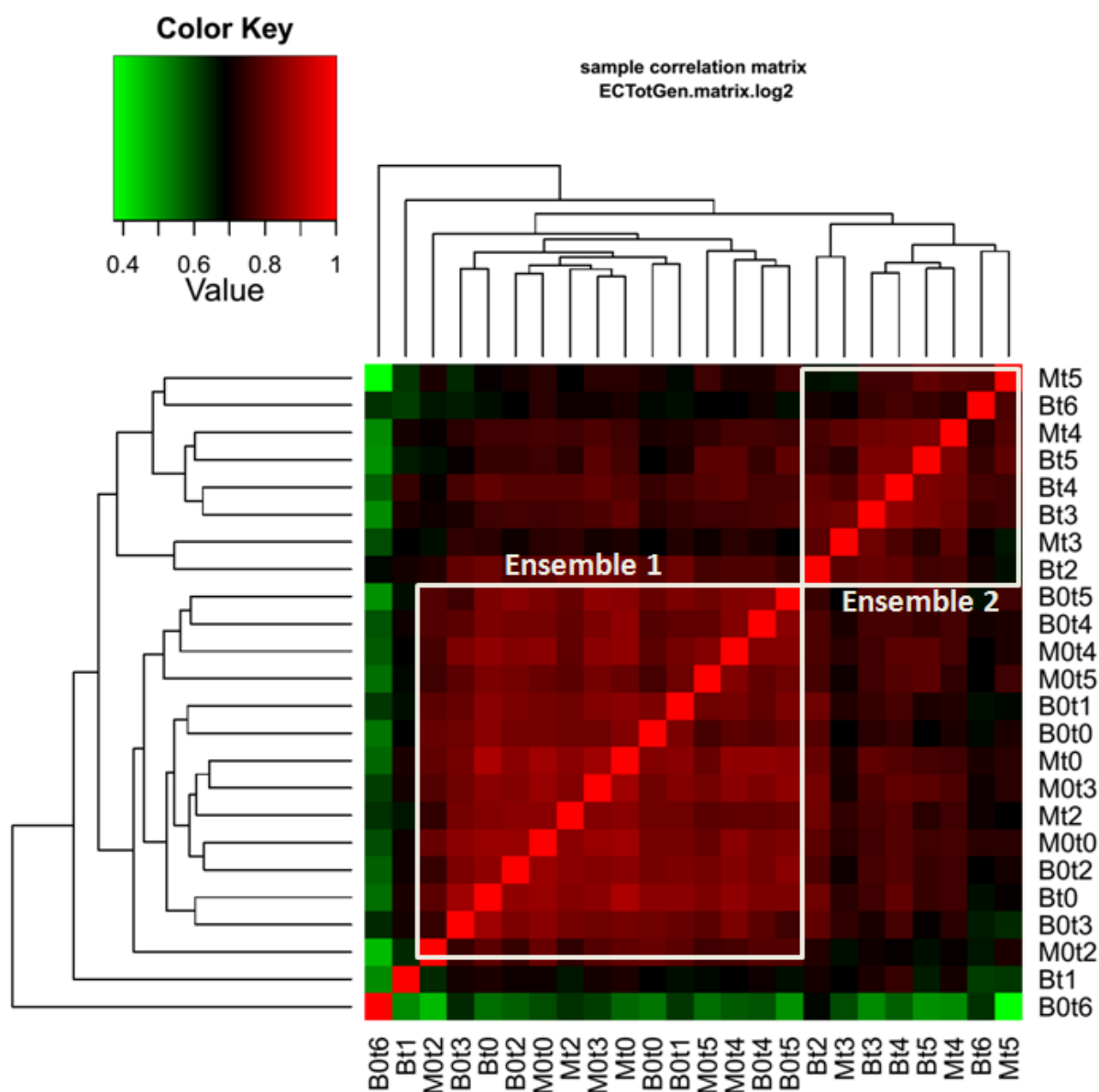


Figure 58. Corrélations de l'expression des gènes des différents groupes de benthiers comparés deux à deux.

II.2.2 Analyse spécifique de certains gènes de la réponse au stress

La réponse transcriptomique à un stress ne peut être expliquée par un seul gène ou une seule voie d'expression. Même lorsqu'on étudie la réponse à un seul stress de nombreux gènes participent et un réseau complexe entre les gènes et les voies induites est mis en jeu (Li *et al.*, 2013). Ainsi, afin d'identifier les gènes/voies induites ou réprimées en fonction des conditions de l'expérience, le transcriptome global, après annotation, a été classé suivant la classification « *Brite* » de la base de données KEGG constituant 38 voies hiérarchisées. Les transcrits de chacun de ces groupes ont été classés en clusters, définis en fonction de la variation de leur expression

au cours du stress. Chaque cluster a été analysé et ceux pour lesquels l'expression était modifiée au cours du stress ont été retenus. Les résultats les plus significatifs sont présentés dans cette partie.

Parmi les classes définies selon la classification Brite, il y a le regroupement des gènes intervenant dans la structuration protéique dénommé « Chaperonnes ». L'analyse de l'expression des transcrits de cette classe au cours des prélèvements a permis de le subdiviser en 9 clusters, soit 9 groupes de transcrits qui présentent une expression génique différente (

Figure 59).

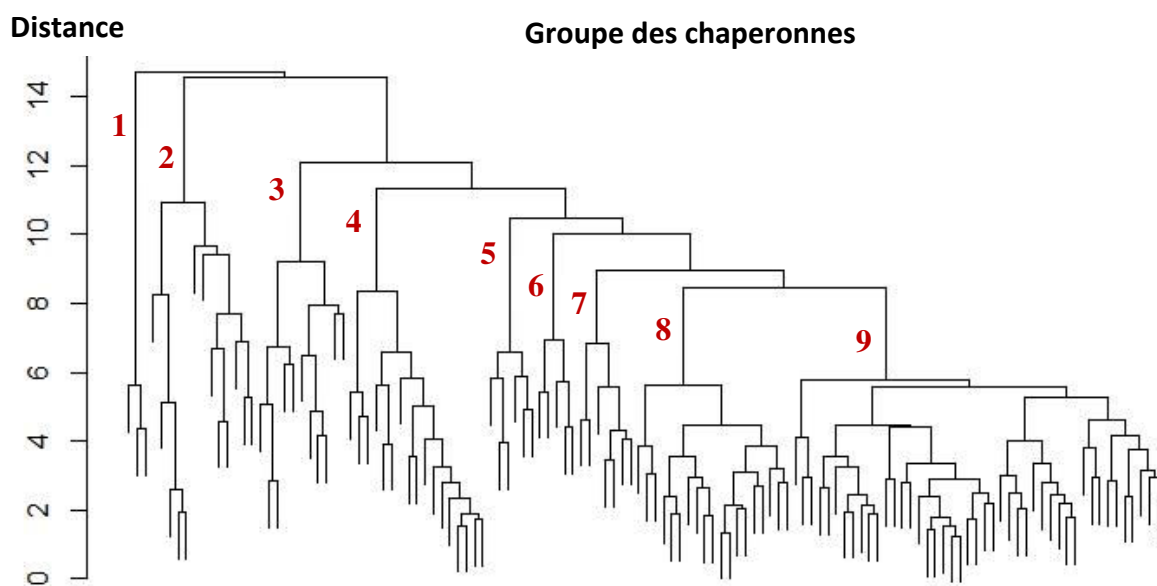


Figure 59. Arbre obtenu avec la classification des distances euclidiennes avec la méthode ward pour l'ensemble des transcrits du groupe « Chaperonnes » indiquant la branche correspondant à chacun des 9 clusters de ce groupe (en rouge).

Parmi ces 9 clusters, le cluster 8 met en évidence une différence dans l'expression des gènes entre les bénitiers stressés et les bénitiers non stressés. On observe une augmentation significative du nombre de transcrits de t1 à t4 dans les bénitiers des bacs B, alors qu'ils n'augmentent qu'à t3 dans les bénitiers des bacs M (Figure 60). De plus, le nombre de transcrits diminue de façon significative dès le retour à la température initiale (t5). Ce cluster comprend 17 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour des protéines de choc thermique du réticulum endoplasmique (HSP40, HSP100) et d'autres chaperonnes : une protéase d'un facteur de transcription lié à la membrane (MBTPS1), une protéine chaperonne ubiquitaire du réticulum endoplasmique (ERp29) qui agit lors de la maturation et la sortie des protéines du réticulum endoplasmique, une phosphoprotéine induite par le stress (STIP1), 3 protéines disulfide

isomérase A4 (PDIA4), 2 calnexines (CANX) présentes dans le réticulum endoplasmique, une protéine 37 du cycle de division cellulaire, présente dans la mitochondrie (le complexe CDC37-HSP90 est responsable des changements conformationnels induits par les nucléotides et de la liaison de co-facteurs), et une hexosaminidase (HEXA-B). Toutes ces protéines facilitent le repliement des protéines qui présentent une conformation anormale.

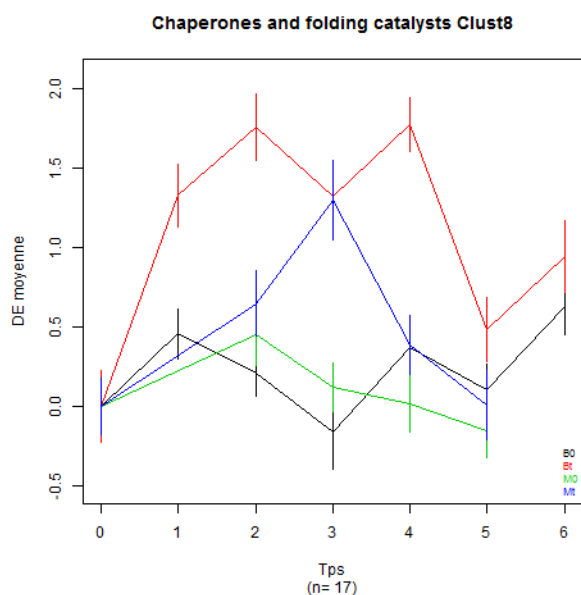


Figure 60. Variation de la quantité de transcrits du cluster 8 du groupe des chaperonnes au sein des bñitiars au cours de l'expñrience 1. En noir les bñitiars du bac B0, en rouge les bñitiars du bac B, en vert les bñitiars du bac M0 et en bleu les bñitiars du bac M. 0 à 6 : temps de prñlèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à t0.

La classe des ubiquitines a été divisée en 14 clusters parmi lesquels les clusters 10 et 12 ont été retenus. La quantité des transcrits du cluster 10 augmente de façon significative dès t1 au sein des bñitiars des bacs B, et diminue de façon significative à t6 (Figure 61). Au sein des bñitiars des bacs M elle augmente de façon significative à t3 et reste stable jusqu'à t5. Le cluster 10 comprend 13 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour des protéines qui reconnaissent les protéines mal conformées, les protègent et les adressent au protéasome (ubiquitines ligases), des protéines qui participent au fonctionnement du protéasome (cullines), des enzymes qui enlèvent l'ubiquitine des peptides issus des protéines dégradées afin qu'il puisse être réutilisé (thioestérase) et enfin des enzymes qui enlèvent l'ubiquitine des protéines marquées et empêchent ainsi leur adressage au protéasome (ubiquitine hydrolases). Ces dernières participent également, de manière non catalytique, à la régulation de la réparation de l'ADN.

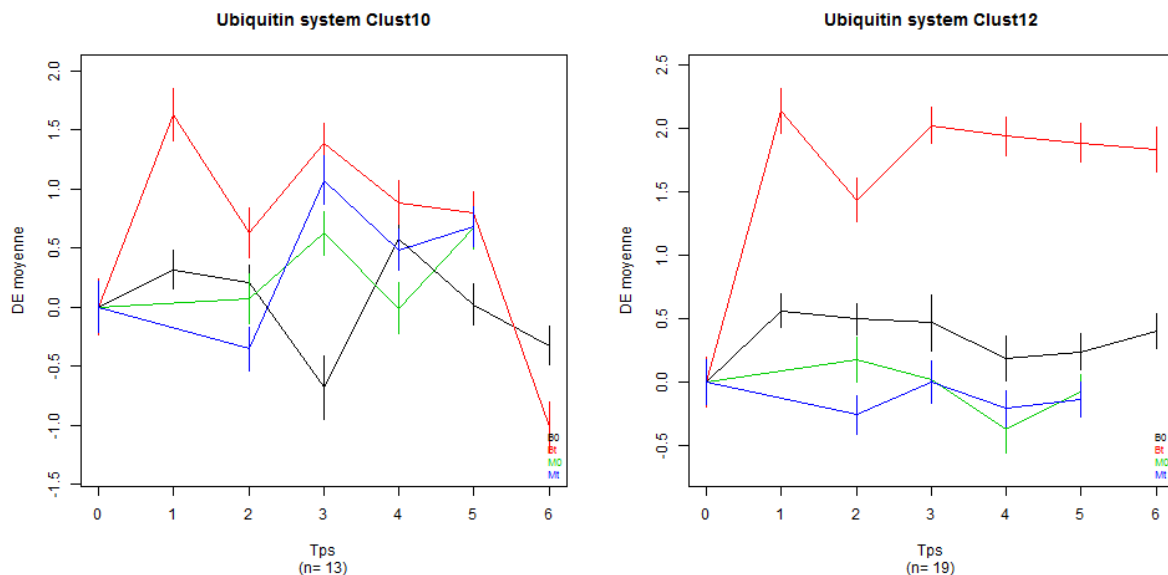


Figure 61. Variation de la quantité de transcrits des clusters 10 et 12 du groupe des ubiquitines au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bénitiers du bac B0, en rouge les bénitiers du bac B, en vert les bénitiers du bac M0 et en bleu les bénitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La quantité de transcrits du cluster 12 augmente de façon significative dès t1 au sein des bénitiers des bacs B et reste élevée jusqu'à t6, alors que la quantité de transcrits présents au sein des bénitiers des bacs M reste stable tout au long de l'expérience. Le cluster 12 comprend 19 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour des enzymes qui enlèvent l'ubiquitine des protéines marquées, empêchant ainsi leur adressage au protéasome et permettant le recyclage de l'ubiquitine (ubiquitine hydrolases) et des protéines induites par les dommages à l'ADN qui permettent grâce à une coupure spécifique d'obtenir des protéines matures.

La classe des protéines du protéasome a été divisée en 8 clusters parmi lesquels les clusters 2 et 8 ont été retenus. La quantité de transcrits du cluster 2 augmente de façon significative à t3 et t4 dans les bénitiers des bacs B, alors qu'elle reste stable pendant toute l'expérience dans les bénitiers des bacs M (Figure 62). Ce cluster comprend 7 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour les protéines constitutives du protéasome et les protéines qui reconnaissent et transportent les protéines ubiquitinilées jusqu'au protéasome.

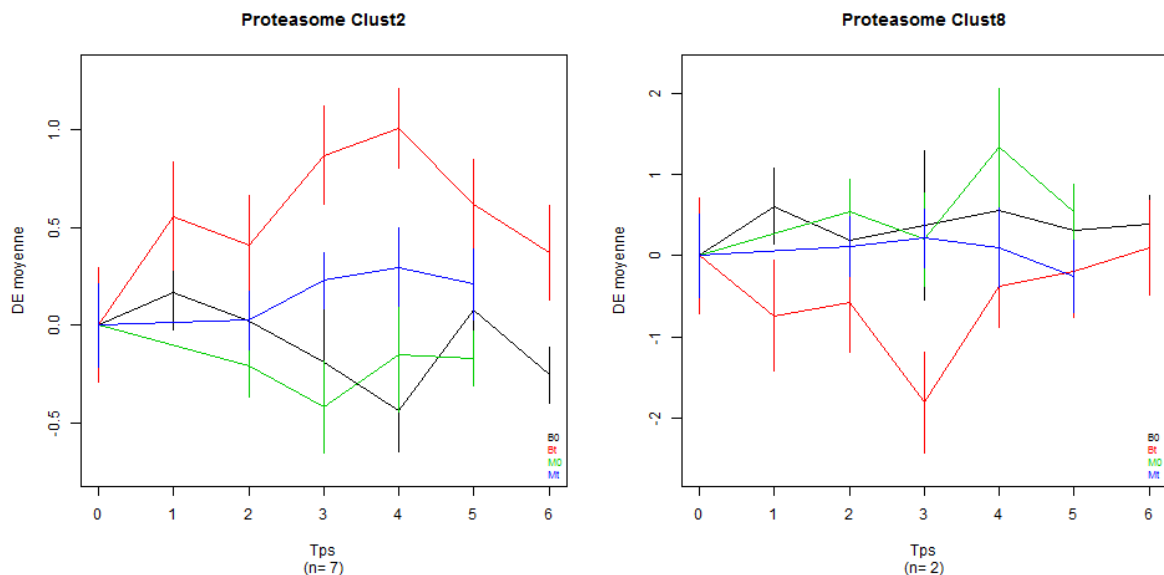


Figure 62. Variation de la quantité de transcrits des clusters 2 et 8 du groupe du protéasome au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bénitiers du bac B0, en rouge les bénitiers du bac B, en vert les bénitiers du bac M0 et en bleu les bénitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La quantité de transcrits du cluster 8 diminue de façon significative à t3 dans les bacs B, alors qu'elle reste stable tout au long de l'expérience dans les bacs M (Figure 62). Le cluster 8 comprend 2 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour des protéines ayant des rôles totalement différents. La première, la sedoheptulokinase, participe à l'assimilation du sedoheptulose dans les cellules animales, sucre produit par la photosynthèse, mais aussi à la voie des pentose phosphate permettant la production de pentose pour la biosynthèse des nucléotides et/ou au maintien de l'état redox de la cellule (voie du glutathion). La diminution de la quantité de sedoheptulokinase réduit les possibilités de synthèse des pentoses tout en maintenant les autres possibilités dont la production d'ATP et d'acétyl-coA, qui permettent la production d'énergie rendue alors disponible pour la cellule. La seconde est une protéine qui augmente l'activité du protéasome. La diminution de sa quantité diminue donc l'activité du protéasome. Cette régulation permet certainement, en cas de stress ponctuel, d'éviter que les protéasomes suractivés ou en grande abondance ne détruisent toutes les protéines dont la conformation a été modifiée.

La classe des exosomes comprend 12 clusters parmi lesquels le cluster 4 est présenté ici. La quantité de transcrits de ce cluster augmente de façon significative dès t1 et augmente à nouveau à t5 dans les bénitiers des bacs B, alors qu'elle reste stable tout au long de l'expérience

dans les bénitiers des bacs M (Figure 63). Ce cluster comprend 9 transcrits qui codent pour des protéines cytoplasmiques qui interviennent dans la formation des vésicules, permettant ainsi la sécrétion des protéines.

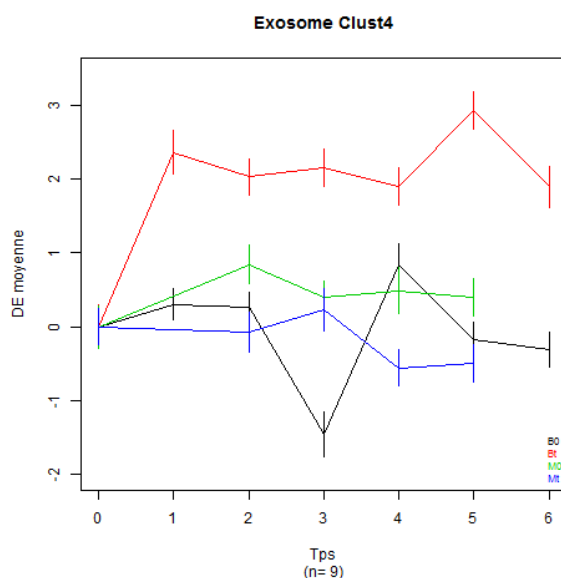


Figure 63. Variation de la quantité de transcrits du cluster 4 du groupe des exosomes au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bénitiers du bac B0, en rouge les bénitiers du bac B, en vert les bénitiers du bac M0 et en bleu les bénitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La classe des protéines de réparation de l'ADN comprend 10 clusters parmi lesquels les clusters 2 et 10 ont été retenus. La quantité de transcrits du cluster 2 augmente de façon significative dès t1 et reste importante jusqu'à t6 dans les bacs B, de manière plus modérée dans les bacs M (Figure 64). Ce cluster comprend 37 transcrits qui codent pour des protéines de recombinaison et de réparation de l'ADN et de l'ARN. La quantité de transcrits du cluster 10 diminue de façon significative dès t1 dans les bénitiers des bacs B, et retrouve son niveau initial à t5 et t6. En revanche dans les bénitiers des bacs M la quantité de transcrits augmente de façon significative dès t1, et augmente à nouveau à t4. Ce cluster comprend 7 transcrits, qui codent pour des facteurs de transcription qui activent les protéines de réplication. La différence observée en présence ou en absence de coraux à proximité des bénitiers (bacs M vs bacs B) indique que différents facteurs de transcription sont exprimés entre les deux conditionnements.

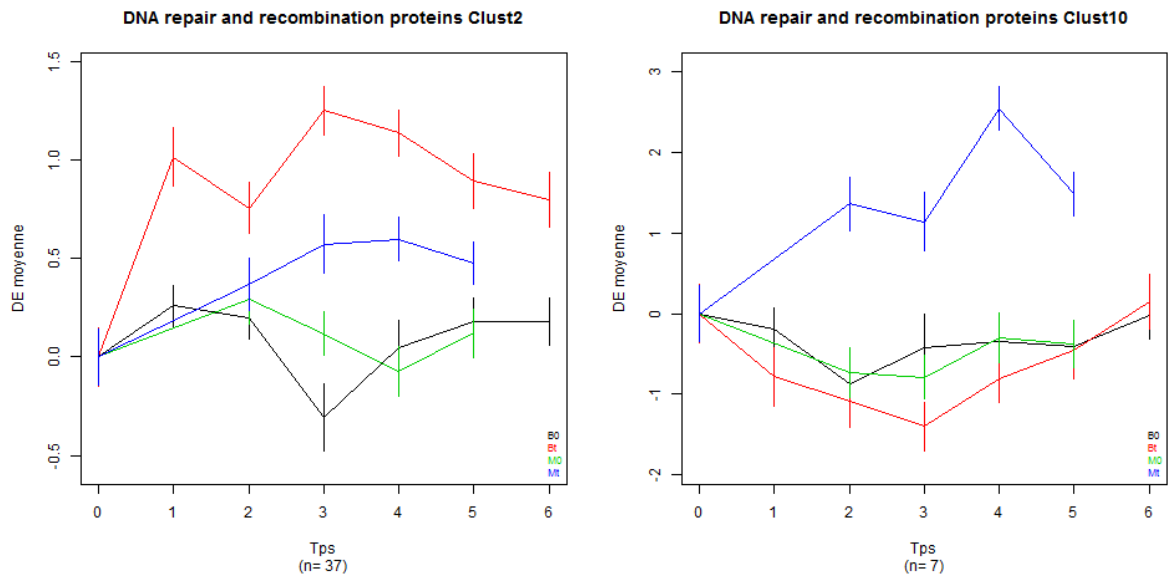


Figure 64. Variation de la quantité de transcrits des clusters 2 et 10 du groupe des protéines de réparation et de recombinaison de l'ADN au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bénitiers du bac B0, en rouge les bénitiers du bac B, en vert les bénitiers du bac M0 et en bleu les bénitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La classe des protéines de réplication de l'ADN comprend 8 clusters parmi lesquels le cluster 5 a été retenu. La quantité de transcrits de ce cluster diminue de façon significative dès t1 dans les bénitiers des bacs B, puis reste stable, et ne diminue que ponctuellement, à t3, dans les bénitiers des bacs M (Figure 65). Ce cluster comprend 9 transcrits qui codent pour des protéines qui initient la réplication ou pour des cyclines. Leur diminution inhibe donc la réplication.

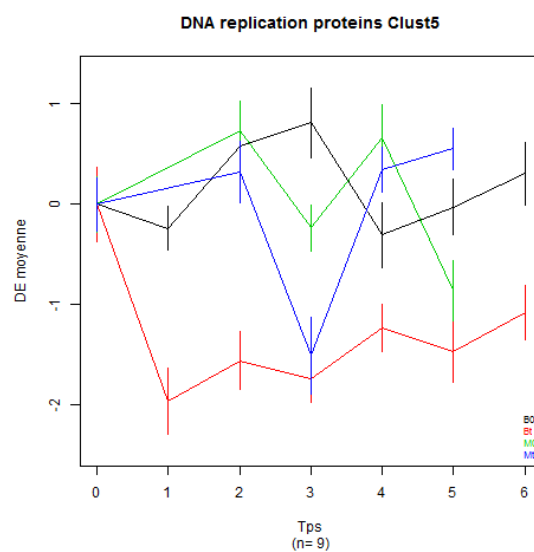


Figure 65. Variation de la quantité de transcrits du cluster 5 du groupe des protéines de réplication d'ADN au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1.

La classe des canaux ioniques comprend 9 clusters parmi lesquels le cluster 2 a été retenu. La quantité de transcrits de ce cluster augmente de façon significative à t3 et reste stable jusqu'à t6 dans les bacs B, et augmente de façon significative à t5 dans les bacs M (Figure 66). Ce cluster comprend 5 transcrits qui codent pour des canaux chlore ou des canaux de neurotransmetteurs qui permettent la régulation ionique, nécessaire au maintien du potentiel transmembranaire et pouvant jouer un rôle dans la sensibilité de certains récepteurs sensoriels, la sensibilité aux hormones et aux neurotransmetteurs.

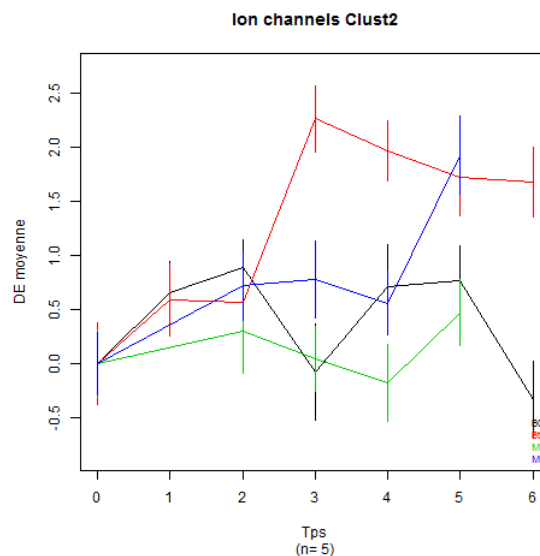


Figure 66. Variation de la quantité de transcrits du cluster 2 du groupe des canaux ioniques au sein des bécitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bécitiers du bac B0, en rouge les bécitiers du bac B, en vert les bécitiers du bac M0 et en bleu les bécitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La classe des cytochromes P450 comprend 6 clusters parmi lesquels le cluster 2 a été retenu. La quantité de transcrits de ce cluster diminue de façon significative à t2 et à t5 dans les bécitiers des bacs B, alors qu'il diminue progressivement jusqu'à t3 et augmente rapidement à t4 dans les bécitiers des bacs M (Figure 67). Ce cluster comprend 5 transcrits qui codent pour des protéines constitutives des cytochromes P450, protéines qui interviennent dans les réactions d'oxydoréduction des métabolites ou des xénobiotiques, permettant ainsi la détoxification.

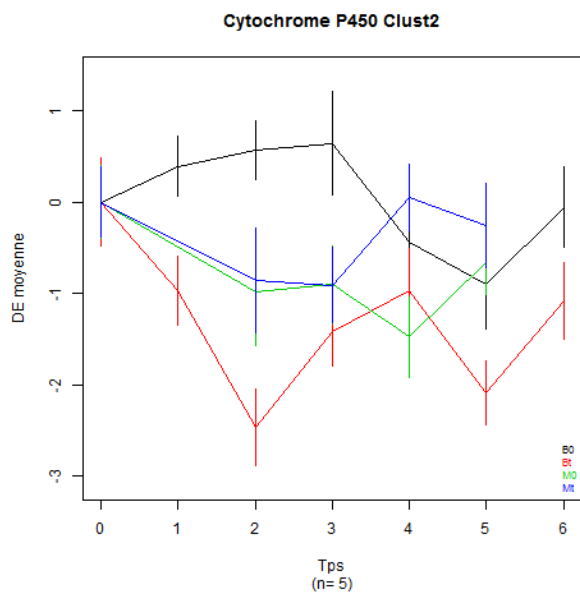


Figure 67. Variation de la quantité de transcrits du cluster 2 du groupe du cytochrome au sein des benthiques au cours de l'expérience 1. En noir les benthiques du bac B0, en rouge les benthiques du bac B, en vert les benthiques du bac M0 et en bleu les benthiques du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

De la même manière, la classe intitulée « cytosquelette », regroupant les gènes participant à la structure cellulaire, a été divisée en 12 clusters, parmi lesquels le cluster 8 a été retenu. L'expression des gènes de ce cluster augmente de façon significative dès t1 chez les benthiques des bacs B, et reste ensuite stable jusqu'à t6 (Figure 68). Contrairement aux bacs B, le nombre de transcrits reste stable tout au long de l'expérience dans les benthiques des bacs M. Le cluster 8 comprend 5 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour 2 dynéines cytosoliques (protéines de liaison à la tubuline), 2 myosines et une profiline exosomales.

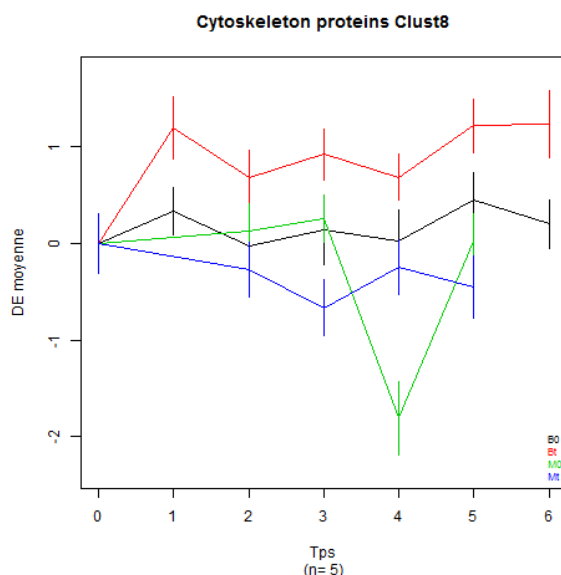


Figure 68. Variation de la quantité de transcrits du cluster 8 du groupe des molécules du cytosquelette au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bénitiers du bac B0, en rouge les bénitiers du bac B, en vert les bénitiers du bac M0 et en bleu les bénitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La classe des protéines participant à la voie de biosynthèse des lipides a été divisée en 7 clusters parmi lesquels les clusters 3 et 5 ont été retenus. La quantité de transcrits du cluster 3 augmente de façon significative dès t1 dans les bacs B, et à partir de t3 dans les bacs M. Ce cluster comprend 3 transcrits correspondant aux gènes codant pour les protéines qui participent à la synthèse (acyl-coenzyme A synthase) et l'élongation (ligase des acides gras à longue chaîne liées à l'acyl-coenzyme A) des phospholipides et des triglycérides, ainsi qu'à l'ajout d'un groupement acyle (monolysocardiolipine acyltransférase). La quantité de transcrits du cluster 5 augmente de façon significative dès t2 dans les bénitiers des bacs M, et reste importante jusqu'à t5 (Figure 69). En revanche elle est stable dans les bénitiers des bacs B tout au long de l'expérience. Le cluster 5 comprend 5 transcrits qui correspondent aux gènes qui codent pour les protéines qui permettent la synthèse des phospholipides et des triglycérides (acyl-coenzyme A thioesterase, acyl-coenzyme A synthase), leur élongation (acyltransférase, lysophospholipid acyltransferase) et leur activation (acyl-CoA synthétase spécialisée dans les longues chaînes, constituées de 12 à 20 carbones).

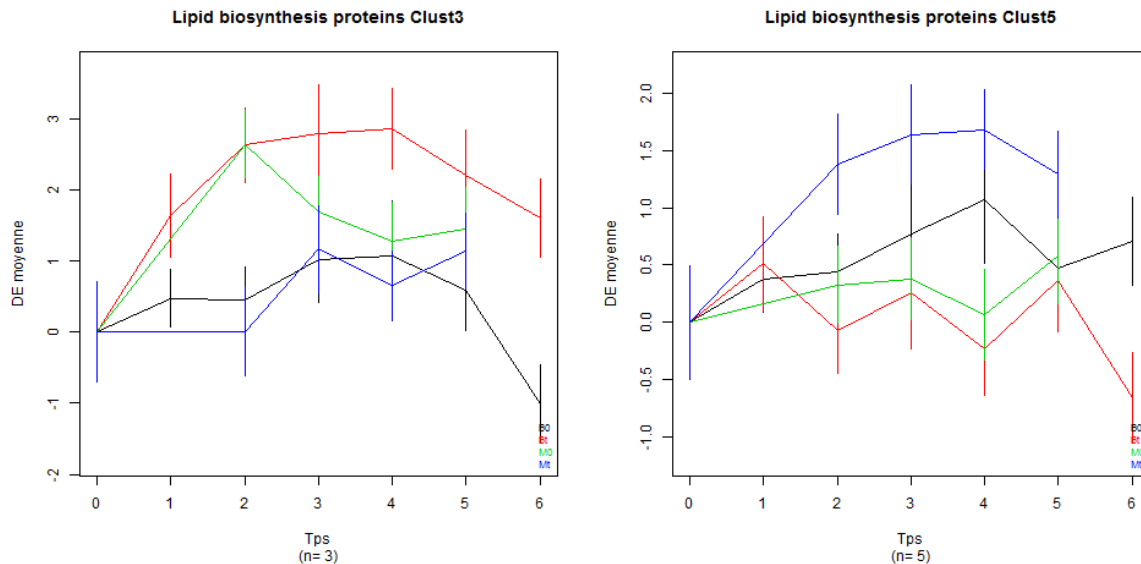


Figure 69. Variation de la quantité de transcrits des cluster 3 et 5 du groupe des protéines de synthèse des lipides au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bénitiers du bac B0, en rouge les bénitiers du bac B, en vert les bénitiers du bac M0 et en bleu les bénitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La classe de la biogénèse mitochondriale comprend 9 clusters parmi lesquels le cluster 8 a été retenu. La quantité de transcrits du cluster 8 augmente de façon significative dès t1 et reste importante jusqu'à t6 dans les bacs B, alors qu'elle reste stable tout au long de l'expérience dans les bacs M (Figure 70). Ce cluster comprend 29 transcrits qui codent pour des protéines aux rôles très différents. Certaines, comme l'amphisine, servent directement au maintien de l'intégrité de la mitochondrie. De nombreuses molécules chaperonnes sont également présentes. D'autres protéines permettent la régulation des ions, dont le fer, qui est un cofacteur important de nombreuses enzymes comme les cytochromes, ou encore le sodium, dont les mouvements intermembranaires régulent le pH et le potentiel membranaire. Certaines catalysent la déacétylation des histones, ce qui rend les gènes silencieux. Des co-transporteurs de phosphate inorganique sont également présents, ils participent à son apport dans la mitochondrie pour alimenter la voie de synthèse de l'ATP. Enfin la myosine, élément constitutif du cytosquelette, permet le mouvement des mitochondries dans le cytoplasme.

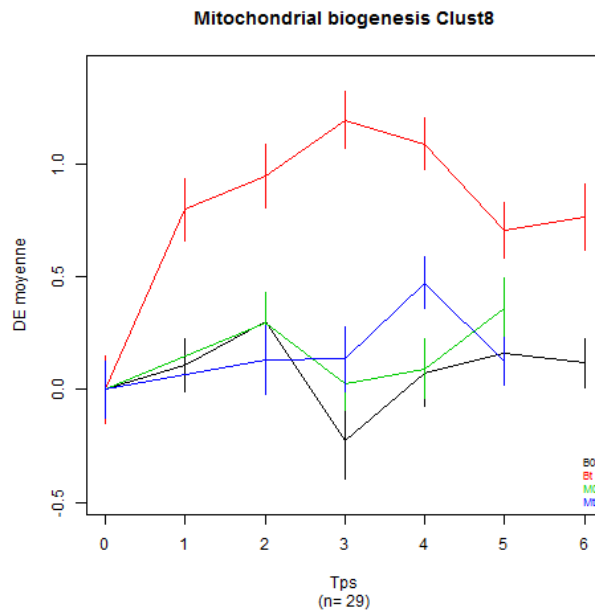


Figure 70. Variation de la quantité de transcrits du cluster 8 du groupe des protéines mitochondriales au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bénitiers du bac B0, en rouge les bénitiers du bac B, en vert les bénitiers du bac M0 et en bleu les bénitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La classe des protéines G, molécules qui participent à la transduction du signal, a été divisée en 8 clusters parmi lesquels le cluster 4 a été retenu. Les transcrits du cluster 4 augmentent de façon significative dès t1 dans les bénitiers des bacs B, ils restent à un niveau constant jusqu'à t6 (Figure 71). En revanche, les transcrits des bénitiers des bacs M restent stables tout au long de l'expérience. Le cluster 4 comprend 4 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour des récepteurs transmembranaires de la famille de la rhodopsine ou de la sécrétine, qui activent les protéines G et permettent ainsi la transduction des signaux. Les voies possibles dépendantes de ces protéines G sont multiples et touchent à l'ensemble des activités cellulaires. L'augmentation de leur expression traduit soit un recyclage plus important soit une augmentation de sensibilité de transduction par une augmentation des effecteurs de ces voies.

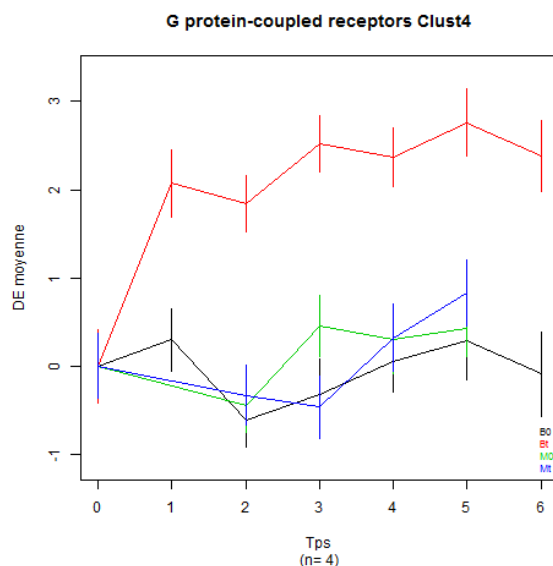


Figure 71. Variation de la quantité de transcrits du cluster 4 du groupe des protéines G au sein des bécitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bécitiers du bac B0, en rouge les bécitiers du bac B, en vert les bécitiers du bac M0 et en bleu les bécitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La classe des kinases a été divisée en 14 clusters, parmi lesquels les clusters 11 et 12 ont été retenus. La quantité des transcrits du cluster 11 augmente de façon significative dans les bécitiers des bacs B dès t1, augmente à nouveau à t3, puis diminue à t5 mais sans revenir au niveau observé à t0 (Figure 72). Dans les bécitiers des bacs M, leur quantité augmente de façon significative uniquement à t3/t4 et redescend à t5. Le cluster 11 comprend 17 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour des protéines qui jouent des rôles distincts au sein de la cellule. La kinase 8/11 dépendante de la cycline et la tyrosine protéine kinase participent au transport des acides aminés et au métabolisme énergétique ; La pyruvate déshydrogénase kinase mitochondriale inhibe la synthèse de 3 acides aminés, la leucine, l'isoleucine et la valine, 3 acides aminés qui entraînent la production de corps cétoniques lorsqu'ils sont abondants dans la cellule et peuvent être toxiques ; Les kinases polo-like qui bloquent la division cellulaire ; La kinase qui initie la traduction et les kinases calcium-dépendantes (CAMK), qui participent aux réponses cellulaires en fonction de la concentration calcique dont certaines aident les protéines à avoir une conformation qui les rend fonctionnelles.

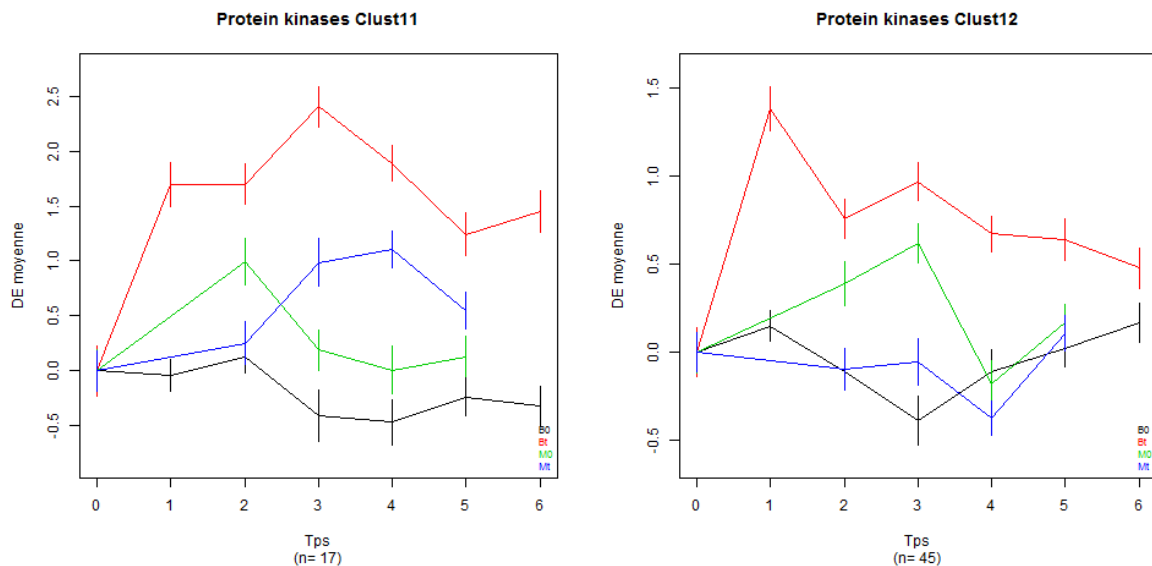


Figure 72. Variation de la quantité de transcrits des clusters 11 et 12 du groupe des kinases au sein des bénitiers au cours de l'expérience 1. En noir les bénitiers du bac B0, en rouge les bénitiers du bac B, en vert les bénitiers du bac M0 et en bleu les bénitiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

Les transcrits du cluster 12 augmentent de façon significative dès t1 dans les bénitiers des bacs B et, même si ils diminuent à t2, ils restent à un niveau élevé jusqu'à t6 (Figure 72). Contrairement au bac B, les transcrits des bénitiers des bacs M restent stables tout au long de l'expérience. Le cluster 12 comprend 45 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour différentes protéines. Certaines jouent un rôle dans l'adhésion intercellulaire liée au calcium (via les cadhérines), et donc dans le destin des cellules, la signalisation, la prolifération, la différenciation et la migration. D'autres évitent que les mutants du cycle cellulaire entrent en mitose et jouent un rôle clé dans la dynamique des microtubules durant la mitose.

La classe des lectines, des protéines qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains glucides et interviennent dans divers processus biologiques, au niveau de la reconnaissance entre les cellules notamment, a été divisé en 5 clusters. Parmi ces derniers, le cluster 2 met en évidence une différence dans l'expression des gènes entre les bénitiers stressés et les bénitiers non stressés. Les transcrits de ce cluster augmentent de façon significative dès t1 dans les bénitiers des bacs B, ils restent à un niveau constant jusqu'à t4 puis diminuent rapidement à t5 (Figure 73). En revanche, les transcrits des bénitiers des bacs M restent stables tout au long de l'expérience. Le cluster 2 comprend 3 transcrits, qui correspondent aux gènes qui codent pour 2 protéines de la famille des calréticulines et une protéine qui améliore la

dégradation des glycoprotéines associées au réticulum endoplasmique en catalisant l'hydrolyse du résidu mannose terminal, signe de la dissociation de la protéine en cours de structuration avec les chaperonnes du réticulum endoplasmique.

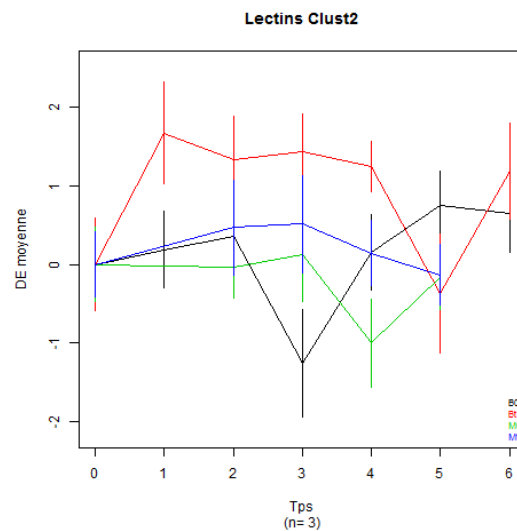


Figure 73. Variation de la quantité de transcrits du cluster 2 du groupe des lectines au sein des benthiers au cours de l'expérience 1. En noir les benthiers du bac B0, en rouge les benthiers du bac B, en vert les benthiers du bac M0 et en bleu les benthiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

La classe des protéines d'adhésion cellulaire comprend 11 clusters parmi lesquels le cluster 2 a été retenu. La quantité de transcrits de ce cluster augmente de façon significative dès t1 dans les bacs B pour diminuer régulièrement à partir de t3, alors qu'il reste stable dans les bacs M (Figure 74). 8 transcrits composent ce cluster. Ils codent pour des protéines qui permettent les interactions intercellulaires ou les interactions entre les cellules et les matrices extracellulaires (fibronectines, intégrines, immunoglobulines).

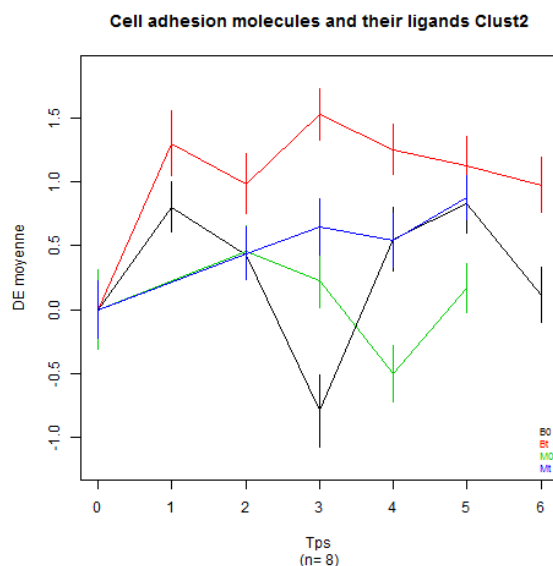


Figure 74. Variation de la quantité de transcrits du cluster 2 du groupe des molécules d'adhésion cellulaire au sein des benthiers au cours de l'expérience 1. En noir les benthiers du bac B0, en rouge les benthiers du bac B, en vert les benthiers du bac M0 et en bleu les benthiers du bac M. 0 à 6 : temps de prélèvement. DE moyenne : variation de la quantité de transcrits par rapport à la quantité à t0.

L'ensemble des variations de quantités de transcrits au cours de l'expérience est regroupé dans le Tableau 22. Il apparaît différents profils d'expression liés à la présence ou non des coraux dans les bacs. Ainsi, l'expression de certains gènes varie de la même façon chez les benthiers, qu'ils soient en présence ou en absence de coraux. Par exemple, l'expression des gènes de protéines chaperonnes, des protéines kinases, des protéines d'ubiquitination et des protéines exosomales augmente au moins à un moment du stress thermique. L'expression des gènes de protéines de réplication de l'ADN et de protéines du cytochrome P450 diminue au cours du stress. Dans les deux cas, la variation de l'expression génique varie néanmoins plus rapidement en absence de coraux à proximité des benthiers. La présence de coraux semble donc retarder la réponse transcriptomique des benthiers au stress thermique. L'expression des gènes de protéines de réparation et de recombinaison de l'ADN présente une variation quantitative différente chez les benthiers selon la présence ou non de coraux à proximité : elle augmente en présence de coraux et diminue en leur absence. L'expression des gènes de protéines de biosynthèse des lipides augmente chez les benthiers en présence de coraux alors qu'elle ne varie pas chez les benthiers seuls dans les bacs. L'expression de nombreux gènes varie uniquement chez les benthiers seuls dans les bacs. L'expression des gènes de protéines du cytosquelette, de protéines kinases, de lectines, de protéines du protéasome, de récepteurs couplés aux protéines G, de molécules d'adhésion cellulaire, de protéines de réparation et de recombinaison d'ADN, de

protéines exosomales et des protéines de biogénèse mitochondriale augmente dès le début du stress thermique, excepté pour le protéasome où la variation n'apparaît que lorsque le seuil de 32°C est atteint. D'autres gènes qui codent pour les protéines du protéasome voient leur expression diminuer à nouveau lorsque le seuil de 32°C est atteint.

Tableau 22. Bilan des variations de l'expression génique observée au cours du stress, en présence/absence de coraux à proximité des bénitiers.

Groupe de transcrits	Variation au sein des bénitiers seuls	Variation au sein des bénitiers à côté de coraux
17 protéines chaperonnes	↗ t1-t6	↗ t3
5 protéines du cytosquelette	↗ t1	-
17 protéines kinases	↗ t1-t6	↗ t3-t4
45 protéines kinases	↗ t1-t6	-
3 lectines	↗ t1-t4	-
5 protéines de biosynthèse des lipides	-	↗ t1-t5
3 protéines de biosynthèse des lipides	↗ t1-t4	↗ t3-t5
7 protéines du protéasome	↗ t3-t4	-
2 protéines du protéasome	↘ t3	-
13 protéines d'ubiquitination	↗ t1-t5	↗ t3-t5
19 protéines d'ubiquitination	↗ t1-t6	-
4 récepteurs couplés aux protéines G	↗ t1-t6	-
8 molécules d'adhésion cellulaire	↗ t1-t6	-
9 protéines de réplication de l'ADN	↘ t1-t6	↘ t3
37 protéines de réparation et de recombinaison d'ADN	↗ t1-t6	-
7 protéines de réparation et de recombinaison d'ADN	↘ t1-t4	↗ t2-t4
9 protéines exosomales	↗ t1-t6	-
5 canaux ioniques	↗ t3-t6	↗ t5
29 protéines de biogénèse mitochondriale	↗ t1-t4	-
5 protéines du cytochrome p450	↘ t1-t2, t5	↘ t2-t3

En bilan, comme attendu, de nombreuses voies et activités cellulaires participent à la réponse à un stress thermique dont celles qui participent au recyclage des protéines et au maintien de l'homéostasie cellulaire. Le fait marquant de cette première analyse est une différence marquée de l'expression génique du bécicotier en présence ou non de coraux dans les aquariums.

III. Des profils métabolomiques caractéristiques de l'état de stress

Les métabolites secondaires sont le plus souvent spécifiques d'une espèce et ont un rôle écologique important, ils sont utilisés par les animaux sessiles pour la communication intra et inter-spécifique (Hay, 1996). Ils sont impliqués dans les relations de défense, de compétition ou de reproduction. La méthodologie d'étude comprend différentes étapes incluant la conception et mise en place de l'expérimentation, compilation des données chimiométriques (couplages en spectrométrie de masse CLHP-SM ou CG-SM), traitement bioinformatique et analyse biostatistique des données, identification des métabolites et interprétation des résultats (Figure 75).

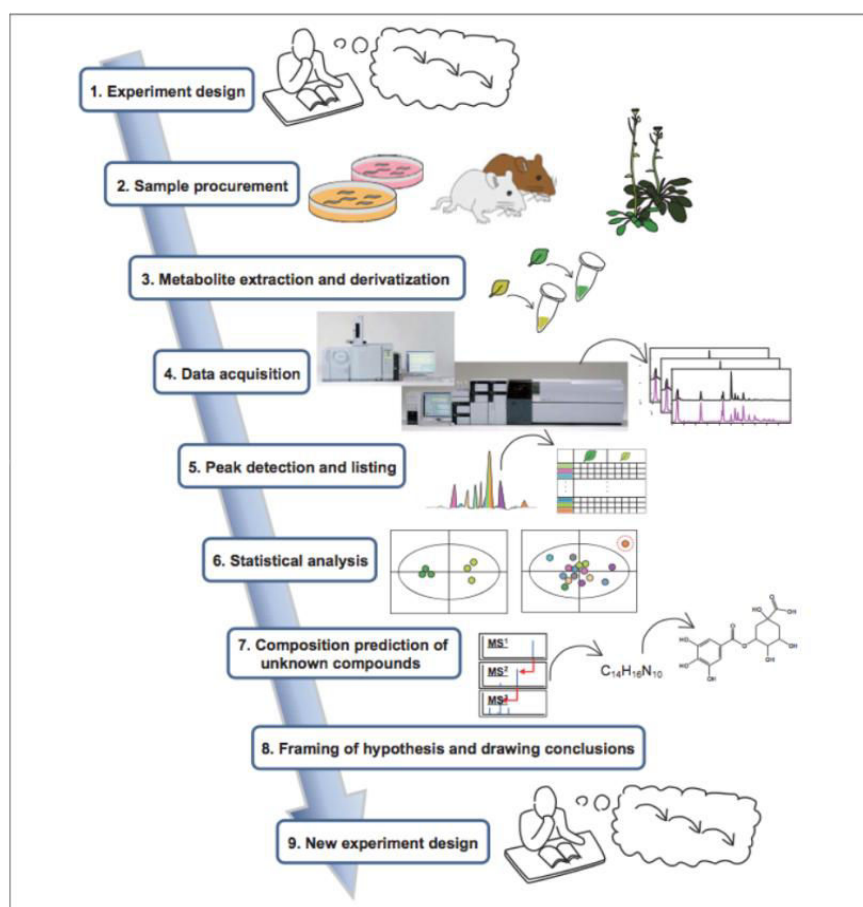


Figure 75. Schéma représentant les étapes d'une étude métabolomique.

(D'après Ogura et al., 2011)

Deux types d'approche en métabolomique peuvent être mises en œuvre, l'approche ciblée et l'approche non ciblée. La première s'intéresse à des classes particulières du métabolome, alors que la seconde prend en compte l'empreinte globale de l'ensemble du métabolome. L'approche ciblée a été très largement utilisée dans des études de la réponse métabolomique d'un organisme à des perturbations environnementales. Ce genre d'étude, qui se focalise sur les métabolites connus et susceptibles d'être impactés par les perturbations, permet d'observer la modification quantitative du métabolite ciblé mais pas la réaction métabolique globale de l'organisme.

Dans le cas d'organismes bivalves, les métabolites primaires tels que les lipides et d'autres types de métabolites secondaires tels que les caroténoïdes ou les MAAs sont susceptibles d'être affectés par des facteurs abiotiques comme le stress thermique (Farias, 2003). L'approche choisie compile une approche ciblée, notamment sur les lipides, à une étude supplémentaire non ciblée adaptée des travaux de Mohamadi *et al.* (2014), qui permet à la fois une analyse qualitative des profils de métabolites totaux d'un organisme, incluant les métabolites cités plus hauts, et une analyse quantitative aboutissant à l'identification de clusters de métabolites qui présentent la même réaction (augmentation ou diminution) au stress. Parmi ces clusters les métabolites identifiés comme les plus discriminants peuvent ensuite être isolés et caractérisés. Cette approche pourrait permettre la mise en évidence de nouvelles voies métaboliques mises en route lors de stress environnementaux, et l'identification de nouveaux biomarqueurs.

III.1 La réponse des métabolites secondaires apolaires

L'étude de la phase apolaire en CLHP-SM a permis de mettre en évidence les métabolites apolaires présents au sein de chaque bénitier des deux expériences de réchauffement. 364 pics distincts ont pu ainsi être définis à partir de l'ensemble des chromatogrammes réalisés, considérés alors comme 364 métabolites différents. Le choix de ne pas réduire cette importante matrice à un nombre de métabolites plus petit a été effectué afin de ne pas éliminer les métabolites présents en très faible quantité (qui peuvent être des métabolites nouvellement apparus) puisque l'importance biologique des métabolites ne dépend pas forcément de leur quantité. En effet, des métabolites présents à l'état de traces pourraient jouer un rôle biologique bien plus important que d'autres métabolites présents en grande quantité. Ces métabolites n'ont pas pu être identifiés avec les données des fragmentations de masse et des temps de rétention dont nous disposons, leur caractérisation nécessite de les isoler et de les analyser en RMN.

III.1.1 Exemple de résultat obtenu pour un échantillon

L'étude réalisée en CLHP-SM a permis de mettre en évidence les métabolites secondaires apolaires présents au sein de chaque bénitier de l'expérience. Dans l'exemple donné dans la Figure 76, le profil chromatographique des deux échantillons de bénitiers prélevés dans le même bac (M) à t0 (26°C) et à t3 (32°C) fait état de leur métabolome à ces deux stades de l'expérimentation. Pour mieux appréhender les faibles variations non visibles à l'œil nu, les résultats obtenus sur l'ensemble des bénitiers ont été traités de façon informatique.

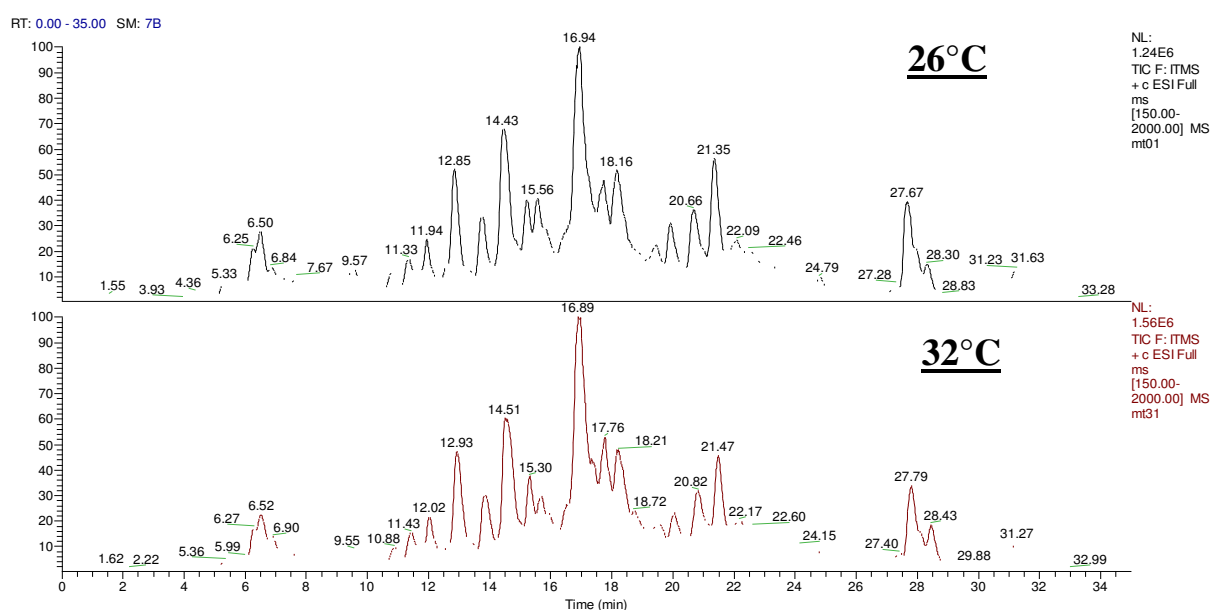


Figure 76. Profils obtenus en CL-SM, sur deux échantillons de bénitiers prélevés dans le même bac (M) à t0 (26°C) et t3 (32°C).

Les résultats sont développés dans les parties suivantes, avec tout d'abord une analyse globale de l'ensemble des données, puis une analyse spécifique permettant de mettre en évidence l'impact des conditions de stress sur la composition en acides gras des bénitiers. Il est important de noter qu'il s'agit de données sur la proportion et non sur la quantité de métabolites présents au sein des bénitiers.

III.1.2 Analyse globale

L'ensemble des échantillons a tout d'abord été analysé en analyse discriminante des moindres carrés (ADMC/PLSDA). Ce mode d'analyse adaptée aux études métabolomiques permet de représenter les échantillons graphiquement et de voir si en se plaçant dans les conditions les plus propices pour les différencier, il est vraiment possible de les discriminer selon

le paramètre choisi. Cette analyse a donc permis, dans un premier temps, d'observer la répartition de l'ensemble des bécitiers prélevés lors des deux expériences de réchauffement, en fonction de leur profil métabolique (Figure 77). Elle permet d'avoir une vue d'ensemble et de déterminer la meilleure façon d'analyser en détail les résultats. Ainsi, une discrimination en fonction des temps de prélèvement fait clairement apparaître sur la composante 1 une différence de composition en fonction des 2 expériences. Les deux expériences seront donc analysées séparément par la suite. Néanmoins, les bécitiers des bacs témoin (B0 et M0), maintenus à 26°C durant toute l'expérience, sont bien regroupés, indiquant que leurs profils métaboliques ont peu varié au cours du temps. De plus, les bécitiers prélevés au temps zéro dans les bacs du stress thermique (Bt0 et Mt0) se trouvent parmi les bécitiers des bacs témoin (B0 et M0), indiquant que les proportions des métabolites trouvées au sein de ces bécitiers sont semblables, et donc qu'à priori il n'y a pas d'effet bac. Par souci de clarté, les données des bacs témoins ont donc été retirées de la suite des analyses. Certains bécitiers (Et34, Ht31 et Ft42) montrent une composition métabolique particulière, très éloignée des autres bécitiers, et surtout des bécitiers provenant du même bac et prélevés au même moment. Par exemple parmi Ft41, Ft42, Ft43 et Ft44, qui sont 4 bécitiers prélevés au temps 4 dans le bac F, Ft41, Ft43 et Ft44 présentent une composition métabolique très proche, et Ft42 une composition métabolique très éloignée des 3 précédents. Ces profils particuliers ont été conservés pour la suite des analyses, mais il faut garder à l'esprit qu'ils ne sont pas représentatifs de la composition métabolique des bécitiers prélevés dans les mêmes conditions.

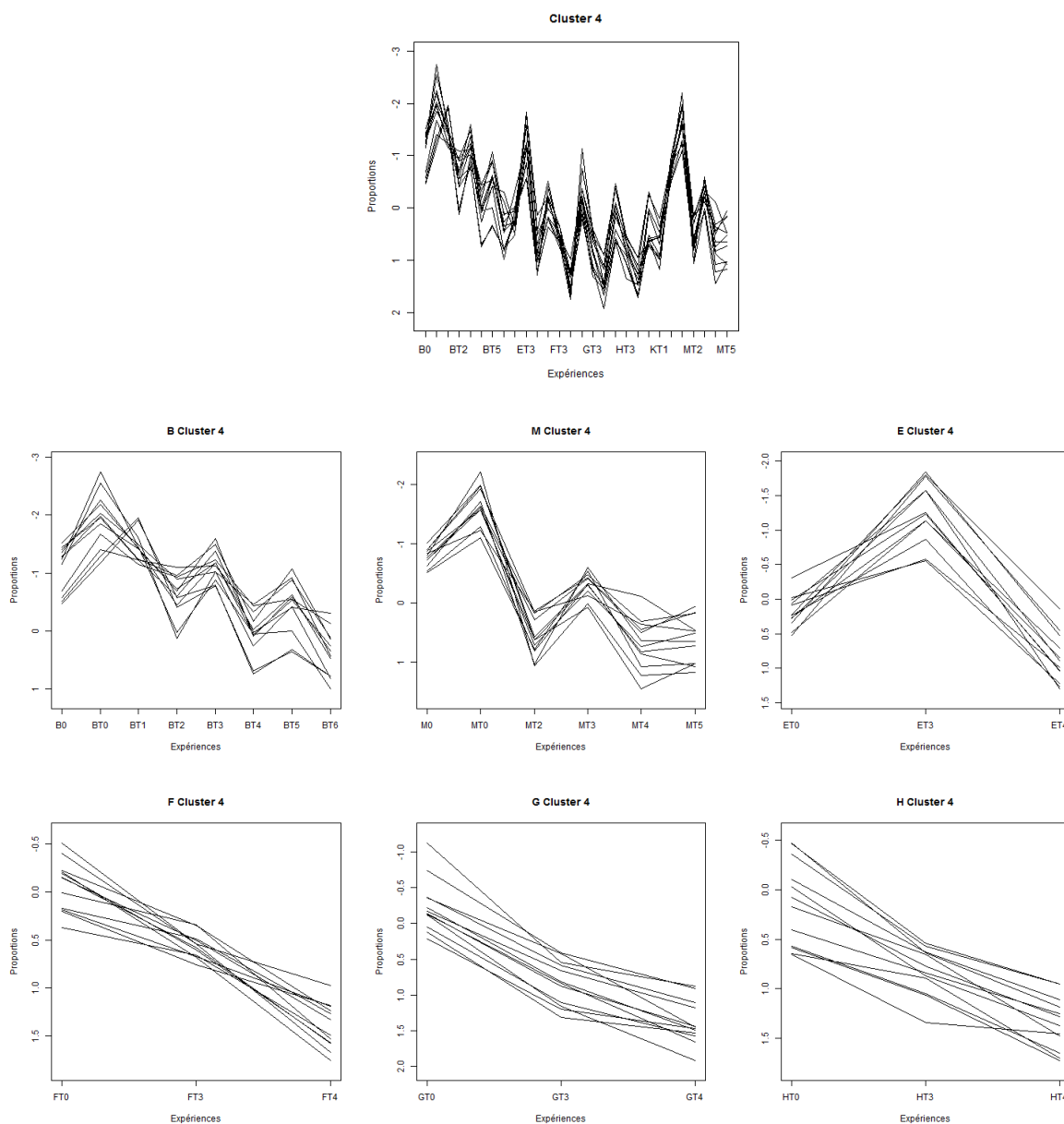


Figure 78. Exemple de groupe de métabolites qui évolue de la même façon au cours du réchauffement dans toutes les conditions de stress. Dans cet exemple, le groupe de métabolites nommé « cluster 4 » diminue au cours de l'expérience, dans les 6 conditions de stress (B, M, E, F, G et H), excepté pour Et3 pour lequel les profils particuliers des bénéitiers Et31 et Et34 (figure N°) ont pu engendrer un biais.

Une classification hiérarchique a été réalisée à partir de la distance euclidienne de la composition métabolomique entre les échantillons afin d'identifier les conditions de stress qui engendrent les profils métaboliques les plus proches. Les résultats de l'analyse globale sont tout d'abord présentés pour les 12 groupes de bénéitiers de la première expérience (bacs B et M), puis pour les 12 groupes de bénéitiers de la seconde expérience (bacs E, F, G et H).

L'analyse globale de la composition métabolique des bénéitiers de la première expérience met en évidence 2 ensembles distincts : un ensemble comprenant les groupes prélevés lors de

l'augmentation de température (de t0 à t3) et un ensemble comprenant les groupes prélevés après 5 jours à 32°C (t4) et après le retour à la température initiale (t5 et t6 : Figure 79). Parmi le premier ensemble, les bécitiers placés à proximité des coraux et ayant subi un stress thermique (Mt2 et Mt3) se détachent des autres groupes. Dans le second ensemble, aux temps 4 et 5 les profils métabolomiques des bécitiers en présence et en absence de coraux (Mt4/5 vs Bt4/5) sont bien séparés, et le profil métabolomique des bécitiers seuls au temps 6 (Bt6) est plus proche des profils des bécitiers placés à côté des coraux (Mt4/5) que des bécitiers seuls dans les bacs (Bt4/5).

Ainsi les individus prélevés à 26°C (t0) et lors de la phase d'augmentation de température jusqu'à 32°C (t1 à t3) présentent une composition métabolique différente des individus qui ont subi un stress thermique plus long (5 jours à 32°C pour t4) et ceux qui après ce stress sont revenus à la température de départ (t5 et t6). Dans l'ensemble on distingue aussi une différence entre les bacs ne comprenant que des bécitiers (bacs B) de ceux qui comprennent également des coraux (bacs M).

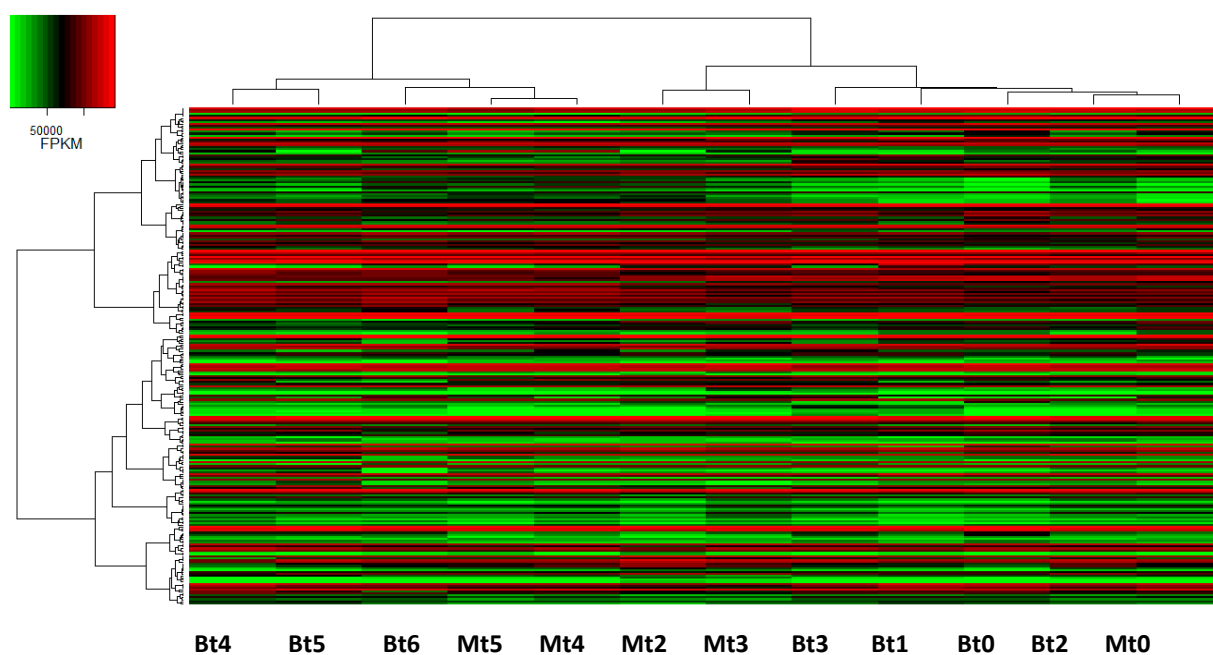


Figure 79. Représentation en « *chips* » des proportions de chacun des 364 métabolites présents au sein des bécitiers de l'expérience 1, obtenus en CLHP-SM. Les lignes représentent les différents métabolites et les colonnes les groupes de bécitiers. En haut à gauche se trouve le gradient de couleurs : en vert les métabolites présents dans les proportions les moins importantes, en rouge ceux présents dans les proportions les plus importantes, et en noir ceux qui sont entre les deux. Les arbres situés en haut et à gauche de la figure représentent les résultats de la classification des distances euclidiennes avec la méthode ward. L'arbre situé au dessus de la figure illustre les liens entre les groupes de bécitiers, l'arbre situé sur le côté les liens entre les métabolites.

L'analyse globale de la seconde expérience montre clairement que la composition métabolique des 4 bacs (E, F, G et H) à 26°C (t0) est différente de la composition à 32°C en début et en fin de plateau (t3 et t4 : Figure 80). En regardant de plus près la composition métabolique des groupes stressés (t3 et t4), il ressort que, excepté pour Et3 qui a un profil particulier, les profils métaboliques des bécitiers ayant subi un seul stress (E et F) diffèrent de ceux des bécitiers ayant subi un double stress (G et H). Parmi ces derniers, les individus prélevés après 5 jours à 32°C (Gt4 et Ht4) présentent la plus grande ressemblance dans leur composition métabolique.

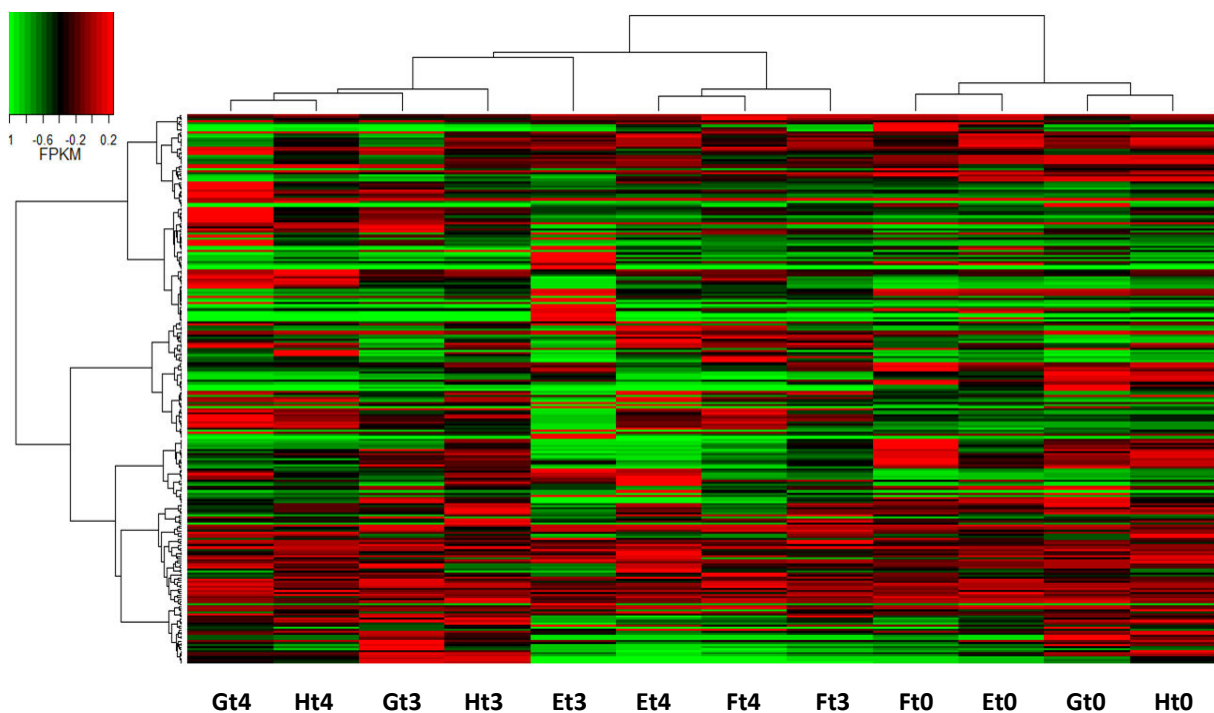


Figure 80. Représentation en « chips » des proportions de chacun des 364 métabolites présents au sein des bécitiers de l'expérience 2, obtenus en CLHP-SM. En haut à gauche se trouve le gradient de couleurs : en vert se trouvent les métabolites présents dans les proportions les moins importantes, en rouge ceux présents dans les proportions les plus importantes, et en noir ceux qui sont entre les deux. Les arbres situés en haut et à gauche de la figure représentent les résultats de la classification des distances euclidiennes avec la méthode ward. L'arbre situé au dessus de la figure illustre les liens entre les groupes de bécitiers, l'arbre situé sur le côté les liens entre les métabolites.

Comme l'annonçaient les résultats obtenus grâce aux cinétiques présentées précédemment, certains métabolites semblent présents en grandes proportions tout au long de l'expérience (lignes rouges), alors qu'au contraire d'autres métabolites semblent présents en faibles proportions (lignes vertes). Ces métabolites ne semblent donc pas affectés par le stress thermique. En revanche, la proportion de certains métabolites varie considérablement au cours de l'expérience, dans un sens ou dans un autre. Ces métabolites, affectés par le stress thermique, sont ceux qui seront préférentiellement étudiés dans cette partie.

III.1.3 Analyse spécifique

L'analyse spécifique vise à comparer les profils métaboliques des bécitiers discriminés en fonction des temps de prélèvement ou des conditions de stress. Elle est réalisée sur un nombre d'échantillons restreint afin de mettre en évidence l'impact de l'amplitude du stress thermique, de la présence de coraux, ou encore de l'ajout d'un second type de stress.

III.1.3.1 Effet du stress thermique

Dans les deux expériences, la discrimination des échantillons en fonction des temps de prélèvement donne 3 ensembles distincts, qui se discriminent sur les deux premières composantes (Figure 81). La variation de la composition métabolique de ces trois ensembles met en évidence l'impact de l'augmentation de température et l'impact de la durée du stress. En revanche, le retour à la température initiale (T5 et T6) ne semble pas affecter la composition métabolique des bécitiers, qui reste proche de celle des bécitiers à t4 (32°C). Ainsi, au moins 2 grandes variations de composition métabolique sont observées, pouvant résulter de voies cellulaires qui se mettent successivement en route : l'une précoce, de T1 à T3, et l'autre plus tardive, observée ici à partir de T4. Un prélèvement régulier d'échantillons le long du plateau à 32°C aurait éventuellement permis de préciser le temps nécessaire à la mise en route de cette voie tardive.

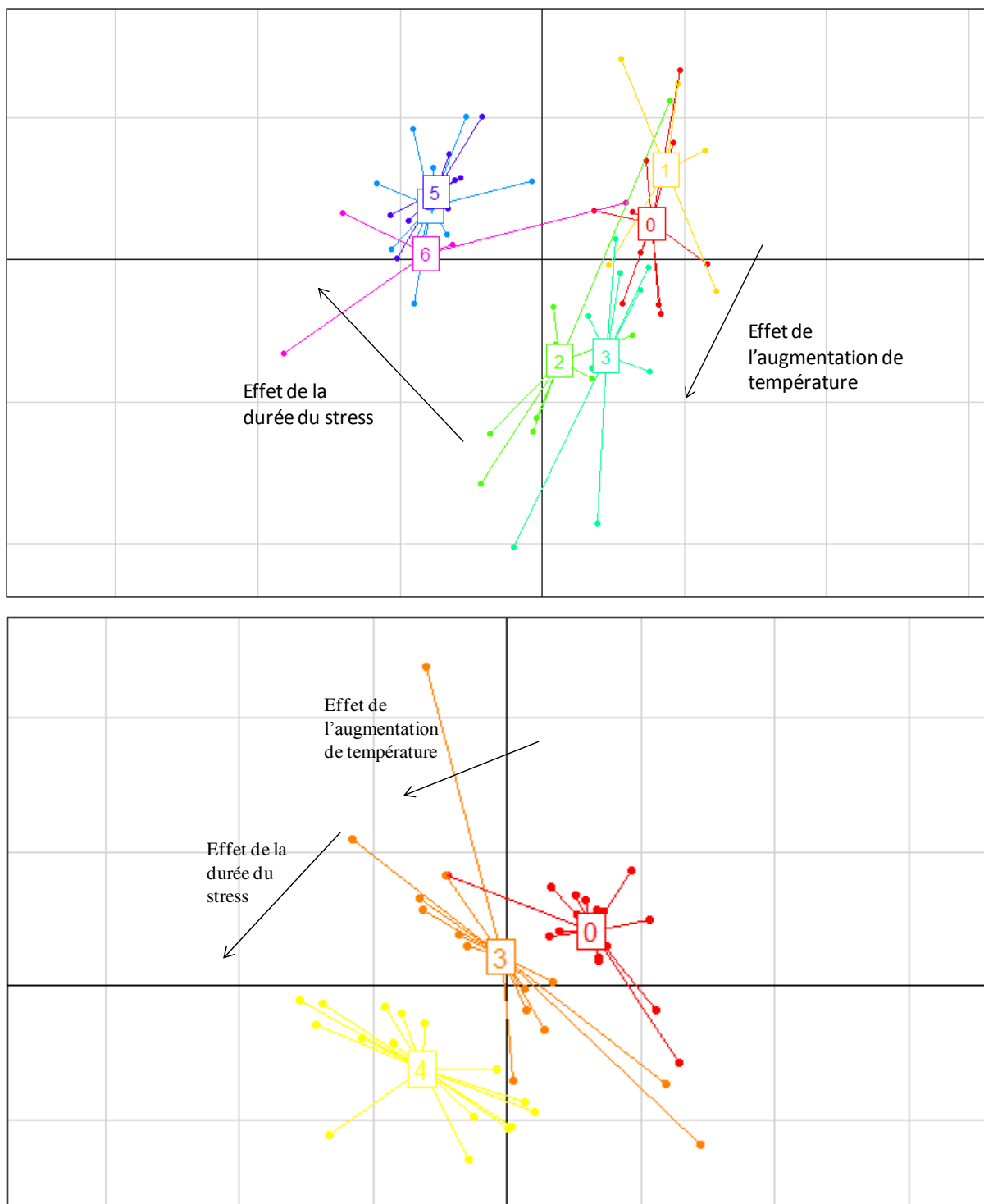


Figure 81. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bœufiers obtenus en CLHP-SM. A : Bœufiers de la première expérience, B : bœufiers de la seconde expérience. 0, 3, 4 : temps de prélèvements. Les points représentent les échantillons, et le cadre coloré dans lequel est indiqué le temps de prélèvement est situé au centre de l'aire délimitée par les points correspondant à ce temps de prélèvement. Cp 1 : composante 1, Cp 2 : composante 2.

Ayant alors connaissance des métabolites participants significativement à la structure des composantes, il est possible de les comparer en fonction des expériences. A T0, 2 métabolites sont présents dans des proportions importantes au sein des bécitiers de l'expérience 1, et 12 métabolites, différents des 2 précédents, au sein des bécitiers de l'expérience 2. Au temps 3 (T3), 97 métabolites sont présents dans des proportions importantes au sein des bécitiers de l'expérience 1, et 74 au sein des bécitiers de l'expérience 2, dont 18 en commun. Au temps 4 (T4), 5 métabolites sont présents dans des proportions importantes au sein des bécitiers de l'expérience 1, et 29 au sein des bécitiers de l'expérience 2, dont un seul en commun. Ces résultats montrent la variabilité individuelle de biosynthèse de certains métabolites avec néanmoins des métabolites communs, suggérant que ces derniers sont ubiquitaires en réponse au stress.

Afin de préciser l'impact du retour à la température initiale sur le métabolome à la fin de l'expérience, il faut se focaliser sur les métabolites présents au sein des bécitiers des bacs B de la première expérience, pour lesquels on a réalisé des prélèvements à T5 et à T6. On observe qu'après un retour rapide à 26°C (T5), la composition métabolique des bécitiers reste inchangée par rapport à la fin du plateau à 32°C (T4), alors que 24h après (T6) les profils métaboliques sont différents (Figure 82). Cette discrimination s'effectue sur la composante 2 qui présente des valeurs négatives chez les bécitiers prélevés à T6.

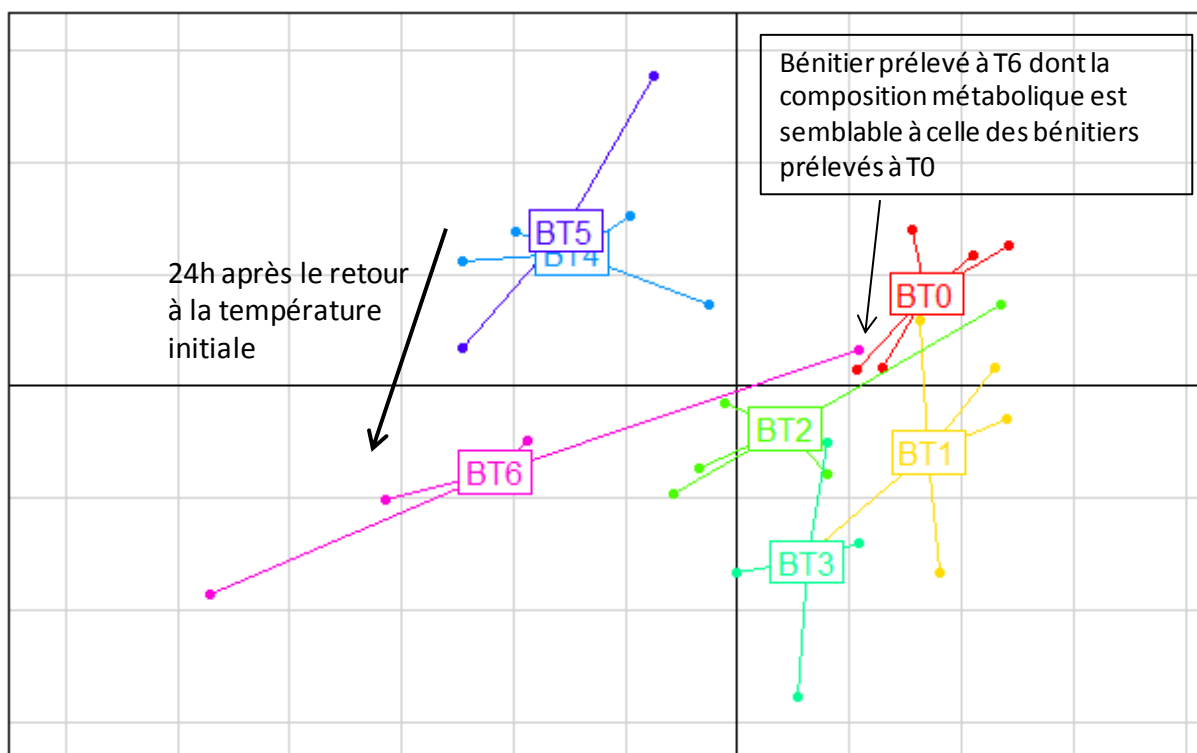


Figure 82. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des benthiers des bacs ne contenant que des benthiers (bacs B) de la première expérience, obtenus en CL-SM. T0 à T6 : temps de prélèvements. Les points représentent les échantillons, et le cadre dans lequel est indiqué le temps de prélèvement est situé au centre de l'aire délimitée par les points correspondant à ce temps de prélèvement. Cp 1 : composante 1, Cp 2 : composante 2.

Lors du retour rapide à 26°C (T5) la composition métabolique reste inchangée, alors que 24 heures plus tard (T6) elle est différente (Figure 82). A T6, la proportion de 22 métabolites diminue par rapport à T5 (Figure 83), et celle de 52 autres métabolites augmente. Ceci met en évidence la notion de temps nécessaire à la modification de la composition en métabolites présents au sein des cellules et des tissus. Les benthiers prélevés à 26°C à T0 et à T6 présentent une composition métabolique distincte, excepté pour un benthier prélevé à T6 qui a une composition semblable aux benthiers prélevés à T0. Il semble donc qu'un retour à la température initiale après 11 jours de stress thermique ne soit dans la majorité des cas pas suffisant pour retrouver la composition métabolique initiale, en tous cas pas en 24 heures. Des prélèvements temporels supplémentaires, avec maintien de la température de l'eau à 26°C, auraient permis de voir si les benthiers retrouvaient leur composition métabolique initiale, et dans ce cas, d'évaluer la durée nécessaire pour un retour à la composition métabolique de départ.

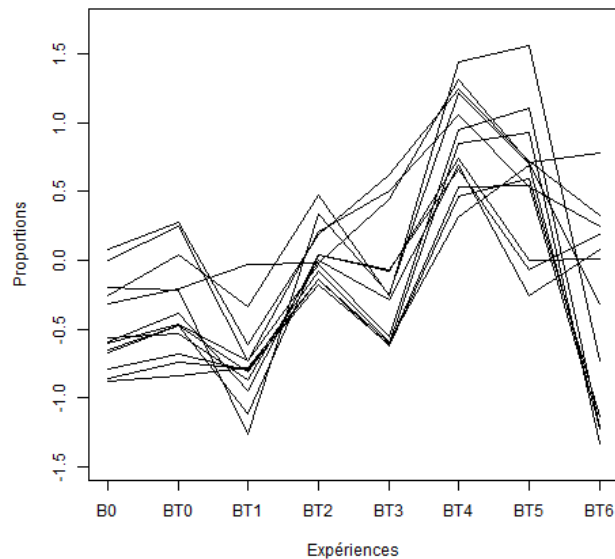


Figure 83. Variation de la proportion de 11 métabolites qui réagissent de la même façon au cours du stress thermique. Ces métabolites font partie des 22 métabolites dont la proportion diminue entre T5 et T6.

III.1.3.2 Impact de l'amplitude du stress thermique

La comparaison des profils métaboliques des bécotiers des bacs E, ayant subi un stress thermique modéré (28°C), et ceux des bécotiers des bacs F, ayant subi un stress thermique conséquent (32°C), montre une différence à T3 (valeurs positives sur la composante 1 et négatives sur la composante 2 pour E, et inversement pour F) mais pas à T4, où les valeurs des composantes 1 et 2 sont négatives (Figure 84). Il semblerait donc que l'intensité du stress thermique influence la composition métabolique des bécotiers dans les premiers jours du stress ($t_3 = 6^{\text{ème}}$ jour) mais qu'ensuite le temps d'exposition au stress soit le facteur déterminant, puisqu'à T4 la différence métabolique des bécotiers ayant subi un stress thermique modéré ou conséquent disparaît. 25 métabolites sont présents dans des proportions importantes au sein des bécotiers prélevés à 26°C (T0), 12 au sein des bécotiers prélevés dès l'arrivée à 32°C (T3) pour E et 28 pour F, dont aucun en commun, et enfin 35 au sein des bécotiers prélevés après 5 jours passés à 32°C (T4) pour E et F. La variation de 17 de ces métabolites est représentée dans la Figure 85.

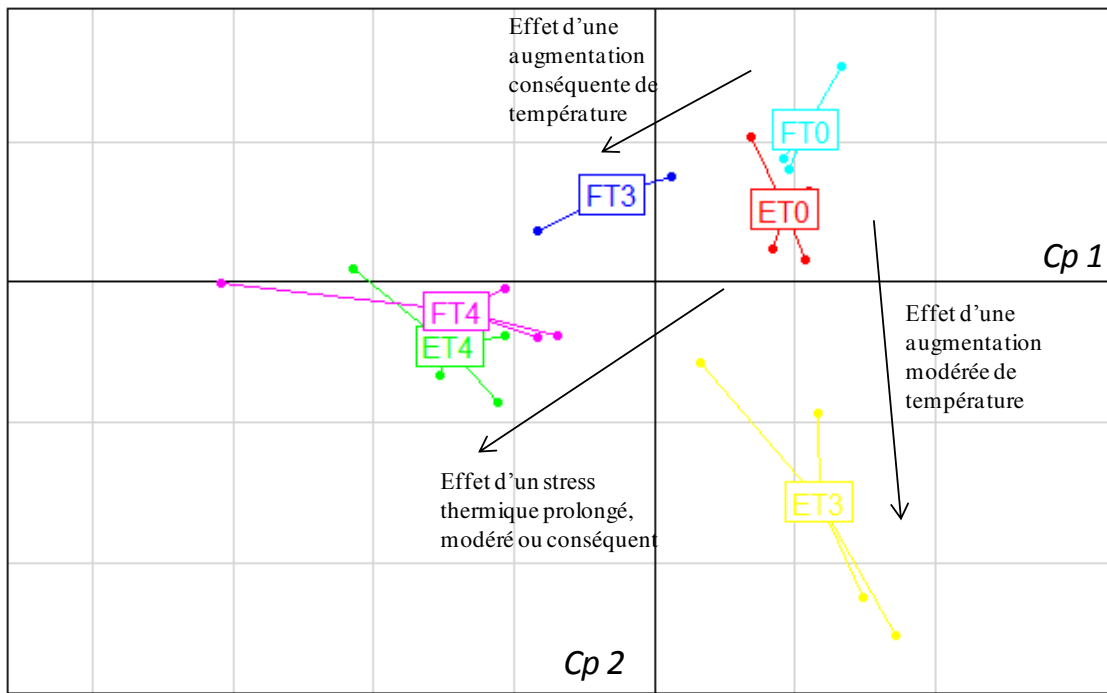


Figure 84. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des benthiques de la deuxième expérience ayant subi uniquement un stress thermique, obtenus en CLHP-SM. T0, T3, T4 : temps de prélèvements. Les points représentent les individus, et le cadre coloré dans lequel est indiqué le temps de prélèvement est situé au centre de l'aire délimitée par les points correspondant à ce temps de prélèvement. Cp 1 : composante 1, Cp 2 : composante 2.

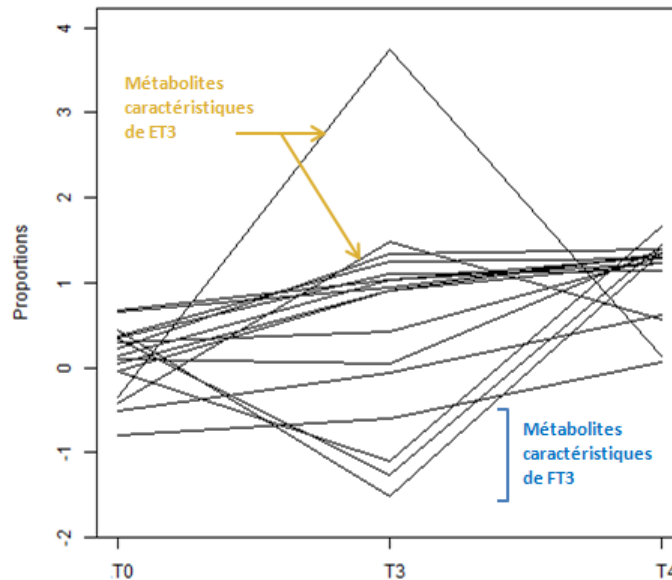
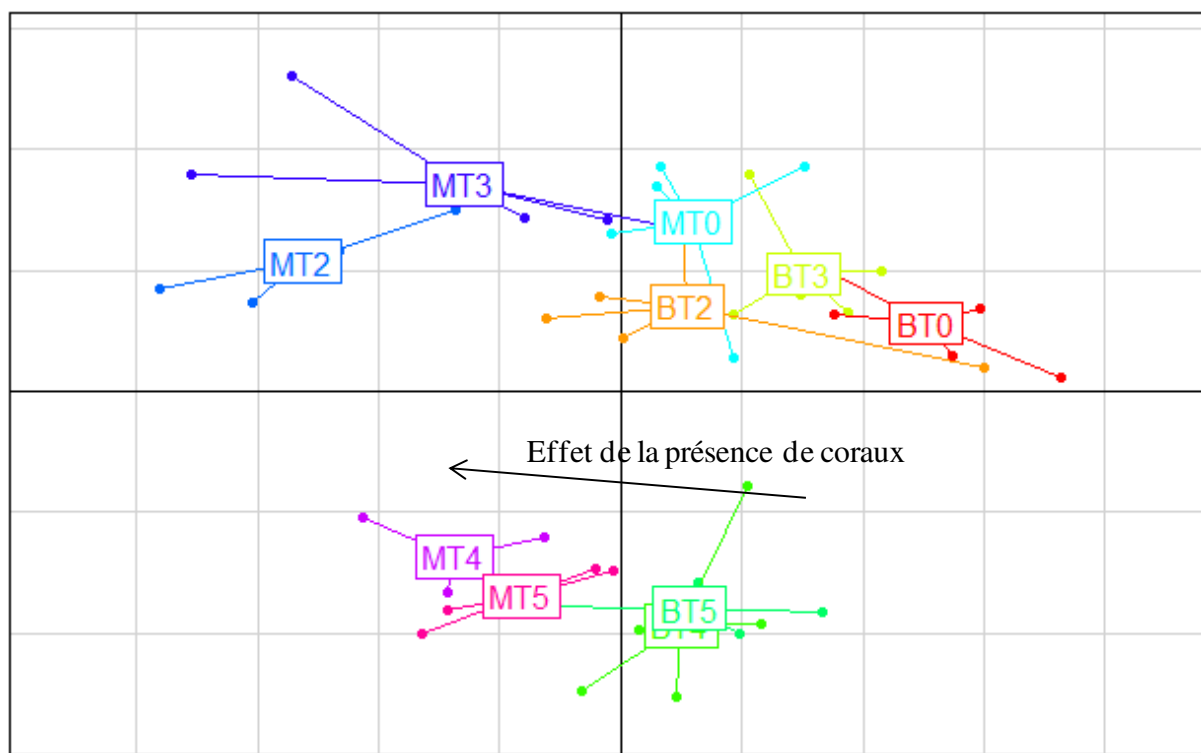


Figure 85. Variation de la proportion de 17 métabolites discriminant les benthiques qui ont subi un stress thermique modéré (E) de ceux qui ont subi un stress thermique conséquent (F) à T3.

III.1.3.2 Effet de la présence de coraux à proximité des bécitiers

Le regroupement des données obtenues pour les bacs B et M pour les temps de prélèvement communs aux deux expériences met en évidence l'impact de la présence de coraux à proximité des bécitiers. Cette discrimination s'effectue sur la composante 1, qui présente des valeurs positives pour les bécitiers seuls dans les bacs, et des valeurs négatives pour les bécitiers placés à proximité des coraux (Figure 86).



La différence métabolique entre les bécitiers placés ou non à proximité des coraux, observée dès t0 (cf III.2.2.2.1), se retrouve tout au long de l'expérience. En effet, pour chaque temps de prélèvement, leur profil métabolique présente des valeurs plus faibles sur la composante 1, indiquant que la présence de coraux à proximité des bécitiers modifie leur composition métabolique. La proportion de 95 métabolites (6 spécifiques des bécitiers des bacs B et 89 spécifiques des bécitiers des bacs M) différencie les bécitiers vivant en présence de coraux des bécitiers seuls dans les aquariums lors de la réponse au stress thermique. Malgré

cette différence, on observe une tendance commune dans la réaction au stress thermique, puisque les profils métaboliques se déplacent de la même façon sur les deux composantes au cours du stress, avec comme démontré précédemment (Figure 81), la présence d'une réponse précoce (T2-T3) et d'une réponse tardive (T4-T5).

III.1.3.3 Effet de l'ajout d'un second type de stress

Les bénitiers des bacs E et F ont subi un seul stress, le stress thermique, alors que les bénitiers des bacs G et H ont subi 2 stress, thermique et lumineux pour G, thermique et hyperoxique pour H. Bien que les réactions au stress aillent dans le même sens (Figure 87), la composition métabolique des bénitiers ayant subi un seul stress et celle des bénitiers ayant subi un stress multiple diffère et est visible sur la composante 1. Lors de l'ajout d'un second stress, la proportion de 213 métabolites diminue, et celle de 151 métabolites augmente.

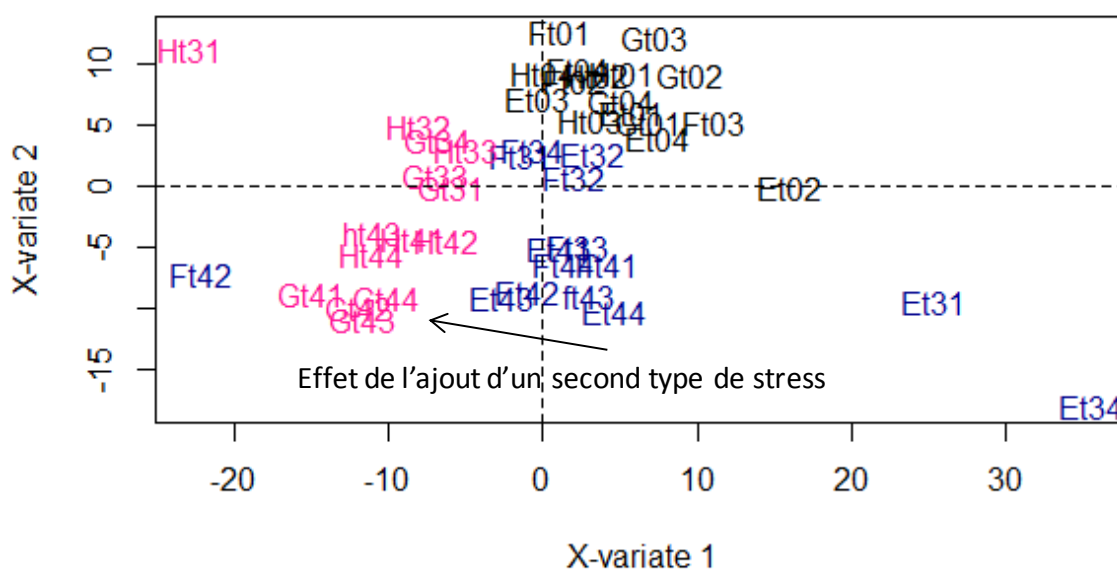


Figure 87. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénitiers de la deuxième expérience. En noir les individus des bacs E, F, G et H à t0, en bleu les individus des bacs E et F à t3 et t4, en rose les individus des bacs G et H à t3 et t4. Cp 1 : composante 1, Cp 2 : composante 2.

III.1.3.4 Bilan

Si on regroupe l'ensemble des résultats des deux expériences, uniquement pour les temps t0 (26°C), t3 (32°C début de plateau) et t4 (32°C fin de plateau) qu'elles ont en commun, la représentation tridimensionnelle de l'ensemble des métabolites trouvés dans les bénitiers montre qu'il est possible de les discriminer en fonction du temps (Figure 88).

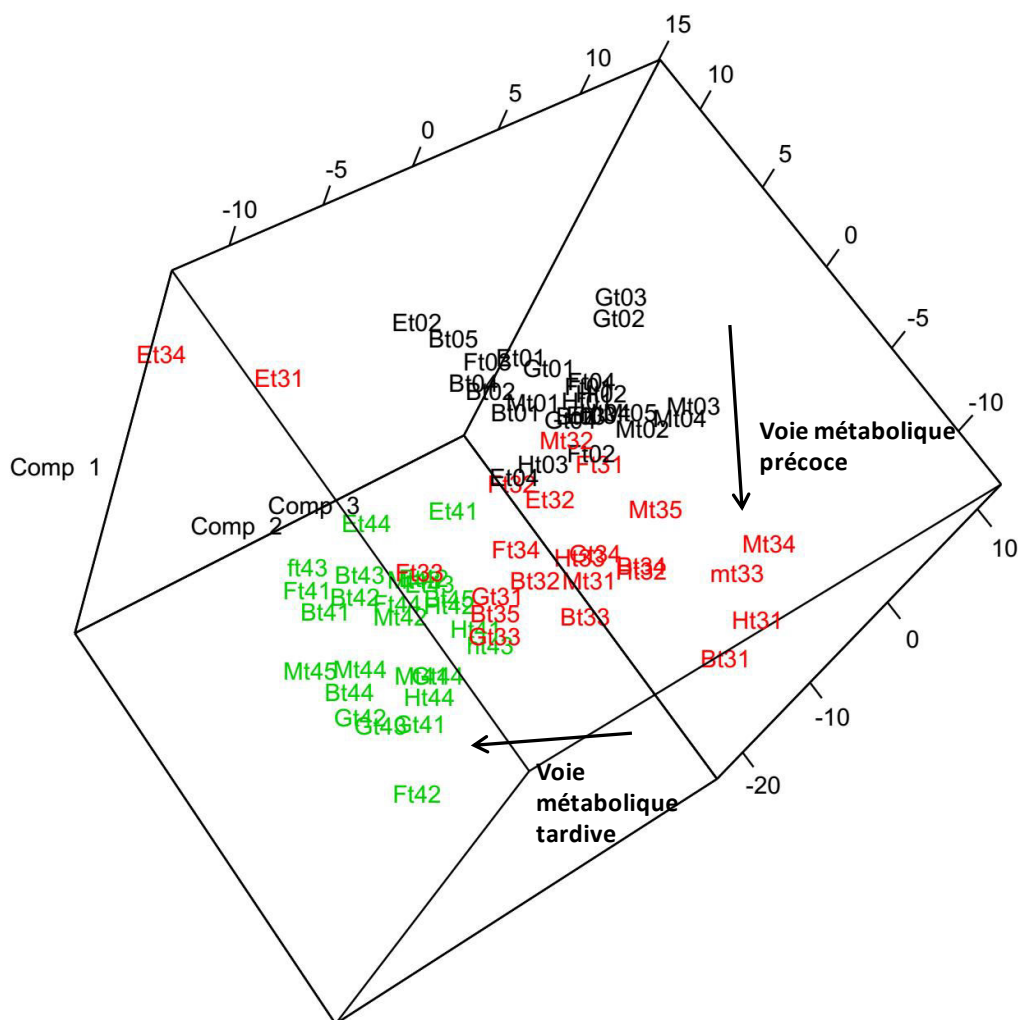


Figure 88. Représentation de la PLSDA-3D des profils métaboliques des bénitiers des deux expériences à t0, t3 et t4, obtenus en CL-MS. Comp 1 : composante 1, Comp 2 : composante 2, Comp 3 : composante 3. En noir les individus à t0 (26°C), en rouge les individus à t3 (32°C) et en vert les individus à t4 (après 5 jours à 32°C).

Il semblerait que quelque soit le profil métabolique des bénitiers à 26°C (qui était différent pour les bénitiers de l'expérience 1 et de l'expérience 2), ce dernier serait modifié lors du stress thermique avec la mise en route d'une voie métabolique précoce (de t1 à t3) puis d'une voie métabolique tardive (à t4). Deux phases successives se manifestent donc, aussi bien pour un stress thermique modéré ou conséquent, en présence ou en absence de coraux ou lors d'un

stress unique ou multiple. Ce résultat met en évidence l'importance de la durée du stress dans la réaction métabolomique.

Les profils métaboliques de l'ensemble des groupes de bécitiers des 2 expériences à t4 sont particulièrement proches, mettant en évidence une voie métabolique tardive plutôt homogène malgré la variété de conditions expérimentales qui a été appliquée lors des deux expériences de réchauffement. Sur les 364 métabolites retenus dans cette étude, à t4 la proportion de 26 d'entre eux augmente chez les bécitiers en présence de coraux, et il en est de même pour 11 métabolites lorsqu'on ajoute un second stress, et un seul métabolite est commun à ces deux conditions.

Le blanchissement observé chez les bécitiers prélevés à l'arrivée à 32°C dans le bac dans lequel un stress thermique plus un stress lumineux ont été imposés (GT3) n'est pas corrélé à une modification de la proportion des métabolites apolaires présents au sein de ces bécitiers. En effet, les profils métaboliques des bécitiers prélevés à GT3 et HT3 (stress thermique plus stress hyperoxique à T3) sont semblables (Figure). De même, le blanchissement des coraux présents à proximité des bécitiers dans les bacs mixtes à l'arrivée à 32°C ne semble pas affecter la composition métabolique des bécitiers (MT3), qui reste proche de celle des bécitiers prélevés à 31°C (MT2).

III.2 La réponse des acides gras

III.2.1 Réponse quantitative globale

La quantité totale de lipides présents au sein des bécitiers a été dosée pour les échantillons de la première expérience (Figure 89). Aucune variation significative n'a été observée au cours de l'expérience, indiquant une quantité de lipides stable chez les bécitiers malgré le stress thermique imputé.

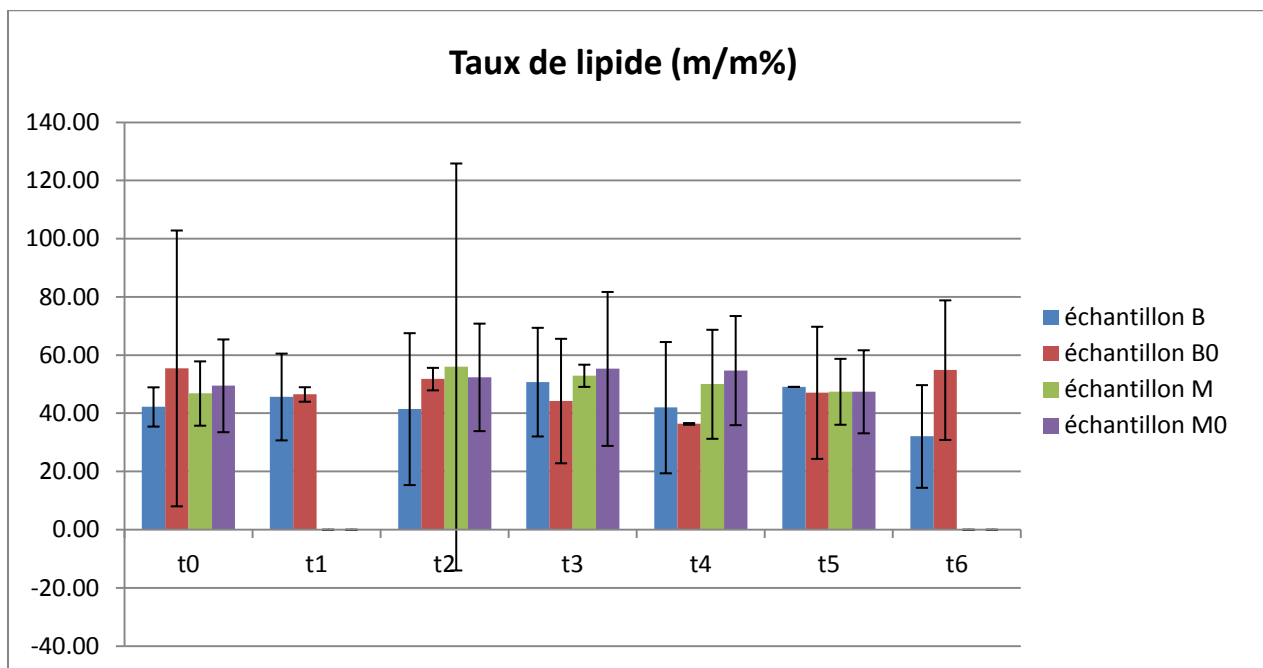


Figure 89. Histogramme du taux de lipides totaux des échantillons de la première expérience. B, bac ne contenant que des bécitiers, M, bac contenant des bécitiers et des coraux, B0 et M0, bacs témoins (maintenus à 26°C), t0 à t6, temps de prélèvements.

III.2.2 Réponse qualitative et variation quantitative de certains métabolites

L'étude en CG-SM a permis de mettre en évidence les métabolites primaires présents au sein de chaque bécitier de l'expérience, et notamment les acides gras présents dans la phase apolaire. 33 pics ont pu être définis à partir de l'ensemble des chromatogrammes, correspondant à 33 métabolites distincts, listés dans le Tableau ci-dessous (Tableau 23). Contrairement aux données obtenues en CLHP-SM, il a été possible à partir des données de spectrométrie de masse et de temps de rétention, par comparaison avec ceux de la banque de données du NIST et par comparaison avec les spectres de masses obtenus à partir d'étalons purs, de proposer une première détermination des métabolites mis en évidence en CG-SM. Les métabolites ainsi déterminés incluent principalement des AG (acides gras), des alcools (aliphatiques et stéroliques) ainsi qu'un hydrocarbure (eicosyne). La présence d'alcools aliphatiques à longue chaîne (pentadécanol et hexadécanol) pourrait provenir de phytols transférés par les *Symbiodium* ou de la dégradation des AG. Les données ainsi obtenues ont permis de proposer pour la première fois la composition en AG de l'espèce *T. maxima*.

Tableau 23. Liste des métabolites primaires identifiés en CG-SM chez les bécotiers non stressés et leurs proportions.

Métabolites/Type	Désignation	Proportion (%) / écart-type
Hydrocarbure		
eicosyne	C20:1	0.01 +/-0.02
Alcool		
pentadécanol	C15-OH	0.06 +/-0.1
hexadécanol	C16-OH	0.07 +/-0.1
heptadécanol	C ₁₇ H ₃₆ O	0.03 +/-0.06
cholestérol	C27	0.12 +/-0.14
Acides gras		
acide laurique	C12:0	0.11 +/-0.14
acide myristique	C14:0	0.76 +/-0.65
acide pentadécanoïque	C15:0	0.04 +/-0.02
acide palmitique	C16:0	7.77 +/-3.63
acide margarique	C17:0	0.09 +/-0.08
acide stéarique	C18:0	1.52 +/-1.04
acide arachidique	C20:0	0.11 +/-0.29
acide myristoléique	C14:1n-9	0.01 +/-0.0
acide palmitoléique	C16:1n	0.22 +/-0.14
acide oléique	C18:1n-9	1.39 +/-0.88
acide linoléique	C18:2n-3	0.14 +/-0.22
acide linoléique	C18:2n-6	0.26 +/-0.27
acide docosadiénoïque	C22:2n-6	1.34 +/-1.65
acide stéaridonique	C18:4n-3	42.87 +/-16.46
acide arachidonique (ou ARA)	C20:4n-6	9.87 +/-7.14
acide adrénique	C22:4n-6	2.22 +/-3.06
acide octadécapentanoïque	C18:5n-3	7.91 +/-5
acide eicosapentaénoïque ou EPA	C20:5n-3	3.59 +/-3.96
acide cervonique (DHA)	C22:6n-3	15.27 +/-16.19
acide 2- hydroxypalmitique	2- hydroxy -C16:0	1.47 +/-1.31
acide 2- hydroxy-stéarique	2-OH-C18:0	0.18 +/-0.18
acide 2-hydroxy-oléique	2-hydroxyC18:1n	0.1 +/-0.08
acide 2- hydroxy-heptadécadiénoïque	2-hydroxy C19:2n-6	0.52 +/-1.57
M472 (non identifié)	M472	1.29 +/-1.31
M484 (non identifié)	M484	0.05 +/-0.14
M486 (non identifié)	M486	0.58 +/-1.51

Les caractéristiques des métabolites mis en évidence chez les bécotiers non stressés sont regroupées dans le Tableau 24. Il montre la prépondérance des AG avec un nombre pair de carbone (97%) et poly-insaturés (84%). Bien qu'en forte proportion chez les bivalves, la

proportion des PUFA est néanmoins supérieure à celle retrouvée chez d'autres bivalves comme chez *Pecten maximus* (Soudant *et al.*, 1998) et *C. gigas* (Delaporte *et al.*, 2005; Waldock et Holland, 1984) par exemple. Les n-3 représentent la majorité des insaturés (69.79%) suivi des n-6 (14.21%) et enfin des n-9 (1.73%).

Tableau 24. Distribution des métabolites primaires identifiés en CG-SM chez les bénitiers non stressés en fonction de leurs caractéristiques

Caractéristiques des métabolites	Proportions (% masse)
MUFA	1.73+/-0.48
PUFA	84+/-3.35
Pair	97.14+/-1.62
n-3	69.79+/-5.89
n-6	14.21+/-4.49
n-9	1.73+/-0.48

Le suivi de l'évolution de la proportion relative de ces métabolites primaires lors de l'expérience du stress thermique a permis alors de déterminer l'effet du stress sur la composition en AG des bénitiers. Principalement retrouvés dans les lipides membranaires, ils participent activement aux propriétés physico-chimiques des membranes, notamment en termes de fluidité, essentielle pour maintenir l'intégrité et l'activité cellulaire.

III.2.2.1 Exemple de résultat obtenu pour un échantillon

L'étude de la phase apolaire en CG-SM a permis de mettre en évidence les acides gras présents au sein de chaque bénitier de l'expérience. Dans l'exemple ci-dessous (Figure 90), la comparaison des chromatogrammes de deux bénitiers prélevés à t3, un dans le bac témoin et un dans le bac ayant subi le stress thermique, et alors arrivé à 32°C, montre qu'environ 85% des pics restent inchangés, les métabolites correspondants semblent donc présents en même quantité chez les bénitiers restés à 26°C et chez ceux exposés au stress thermique. En revanche, il semble qu'il y ait une diminution quantitative d'au moins deux composés, qui sont respectivement visibles sur le chromatogramme aux temps de rétention de 7,13 min et de 15,16 min (Figure 90). Les données de CG-SM (spectrométrie de masse et de temps de rétention) semblent indiquer qu'il s'agit de l'acide myristique (C14:0) et de l'acide α -linoléique (C18:3n-6) (Figure 91). On observe également l'apparition de deux pics de très faible intensité, aux temps de rétention respectifs de 5,15 min et 25,66 min, correspondant à l'apparition d'au moins deux métabolites en faible quantité chez les bénitiers ayant subi le stress thermique. Le premier n'a

pas pu être identifié. Pour le second, il semblerait qu'il s'agit d'une chaîne hydrocarbonée non fonctionnalisée.

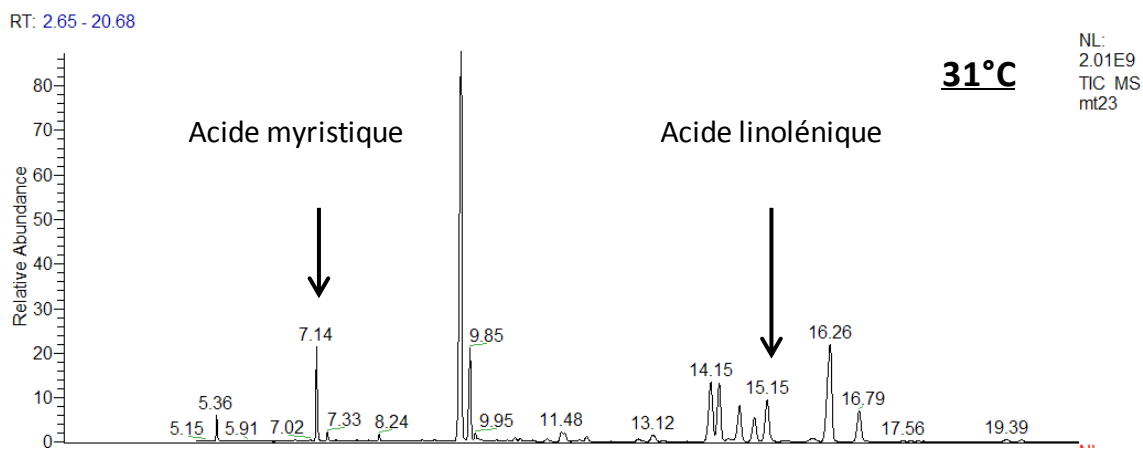
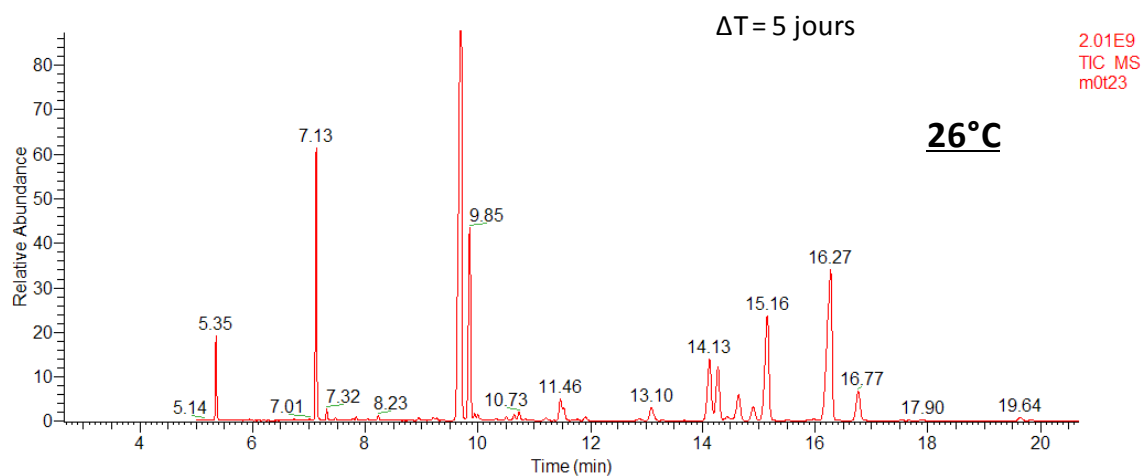


Figure 90. Profils obtenus en CG-SM, sur deux échantillons de bénitiers placés en conditions différentes (26°C et 32°C), au 6^{ème} jour de l'expérience 1.

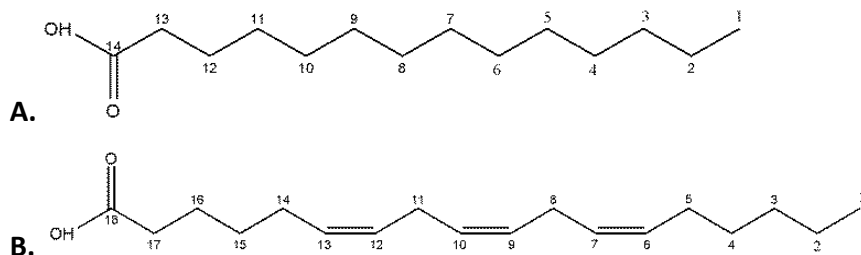


Figure 91. Acides gras identifiés sur les chromatogrammes présentés en figure 2.A : Acide myristique, B : Acide γ -linoléique

Ces observations, réalisées à l'œil nu, donnent une idée des résultats que l'on peut trouver grâce aux données obtenues suite aux analyses réalisées en CG-SM. Ces résultats sont développés dans les parties suivantes, avec tout d'abord une analyse globale de l'ensemble des données, puis une analyse spécifique permettant de mettre en évidence l'impact des conditions de stress sur la composition en acides gras des bécitiers. Il est important de noter qu'il s'agit de données quantitatives sur la proportion des métabolites et non sur la quantité de métabolites présents au sein des bécitiers.

III.2.2.2 Analyse globale de l'ensemble des résultats

Comme pour la CLHP-SM, l'analyse globale a été réalisée, pour les 33 métabolites mis en évidence, sur l'ensemble des bécitiers des deux expériences, afin d'observer la répartition des profils métaboliques. Une PLSDA, réalisée avec une discrimination en fonction du temps, montre que les profils métaboliques des bécitiers de la première expérience varient beaucoup, alors que ceux des bécitiers de la seconde expérience sont plus homogènes (Figure 92).

Les profils métaboliques des bécitiers de la première expérience prélevés aux temps 1 T1 et 2 T2 se différencient de ceux des bécitiers prélevés aux temps t0, t3, t4, t5 et t6. Cette discrimination est visible sur la composante 1 pour les bacs M, qui est négative pour Mt2 et M0t2 et neutre ou positive pour les autres, et sur la composante 2 pour les bacs B, qui est négative pour Bt1, Bt2, B0t1 et B0t2 et neutre ou positive pour les autres (Figure 92). Ces variations étant observées aussi bien dans les bacs témoins que dans les bacs stressés, elles ne peuvent être attribuées au stress thermique. Cependant nos mesures des paramètres physiques de l'eau (pH, salinité, conductivité, dioxygène dissous et saturation en air) n'indiquent pas de variation significative à t1 et à t2, ils ne permettent donc pas d'expliquer cette variation. Les variations métaboliques observées lors de l'analyse en CG-SM n'ont pas été observées en CLHP-SM, il semble donc que parmi les métabolites apolaires seuls les acides gras semblent avoir réagi à ces facteurs.

(C22:2n-6), l'acide adrénique (C22:4n-6), l'acide docosahexaénoïque ou DHA (C22:6n-3), l'acide hexadécadiénoïque (C16:2n-6), l'acide linoléique (C18:2n-6) et un acide gras non identifié. Il semble donc que la proportion d'acides gras à plus courte chaîne (C14 à C20) ait augmenté à t1 et t2, et que la proportion d'acides gras à longue chaîne (C18 à C22) ait diminué. Les longues chaînes carbonées semblent ainsi avoir été coupées. Comme les conditions expérimentales ne semblaient pas pouvoir expliquer ce résultat, en raison d'un résultat inverse attendu lors d'une augmentation de la température, un biais de manipulation a alors été envisagé. La seule différence entre ces deux groupes de bécitiers est que l'extraction des métabolites totaux présents au sein des bécitiers a été réalisée en premier sur les échantillons Bt1, Bt2, Mt1 et Mt2, qui avaient été choisis puisqu'ils correspondaient à des temps intermédiaires jugés moins importants que t0, t3 et t4. Ces échantillons avaient été extraits dès l'arrivée en France, après un transport à température ambiante, alors que les autres avaient été congelés avant d'être extraits. Or le froid limiterait les phénomènes d'oxydation, ceci expliquerait que les acides gras observés chez les bécitiers qui ont été congelés auraient eu leurs chaînes carbonées moins exposées à la dégradation. En conséquence, puisque cette différence est attribuée à un biais de manipulation plutôt qu'à une condition expérimentale, les échantillons Bt1, Bt2, B0t1, B0t2, Mt2 et M0t2 ont été retirés de la suite des analyses sur les acides gras.

L'analyse des proportions des 33 métabolites dans l'ensemble des conditions de stress éprouvées lors des deux expériences de réchauffement a alors mis en évidence 7 groupes de métabolites différents. Aucune tendance ne se dégage des cinétiques de variation des proportions de chacun de ces groupes au cours du réchauffement pour les différentes conditions de stress (B, M, E, F, G et H) ainsi que dans les bacs témoin (B0 et M0). De même, les regroupements effectués par une classification hiérarchique n'ont pas permis de mettre en évidence des similitudes entre les profils métaboliques des différents groupes de bécitiers. Il semble donc que dans le cas des métabolites étudiés en CG-SM, la réponse au stress soit ponctuelle et dépende des conditions de stress. L'étude détaillée de cette réponse est donc effectuée suivant chaque condition, en discriminant les profils métaboliques en fonction des temps de prélèvement.

III.2.2.3 Analyse spécifique

La comparaison des profils métabolomiques des bœnitiens à différents moments de la première expérience de réchauffement (stress thermique conséquent), obtenus grâce à la CG-SM, est développée dans cette partie.

III.2.2.3.1 Effet du stress thermique

La représentation en PLSDA-2D des profils métaboliques des bœnitiens de la première expérience placés seuls dans les bacs (bacs B) permet de déterminer l'impact des variations de température (Figure 93). Les profils métaboliques des bœnitiens prélevés dès l'arrivée à 32°C (Bt3) sont proches des profils métaboliques des bœnitiens prélevés avant le début du réchauffement (Bt0), avec des valeurs positives sur les deux composantes. En revanche à la fin du plateau à 32°C, les profils métaboliques sont totalement différents, et présentent des valeurs négatives sur les deux composantes. Cette composition métabolique reste inchangée juste après le retour à 26°C, mais elle varie 24h après, avec des valeurs sur la composante 2 qui deviennent positives.

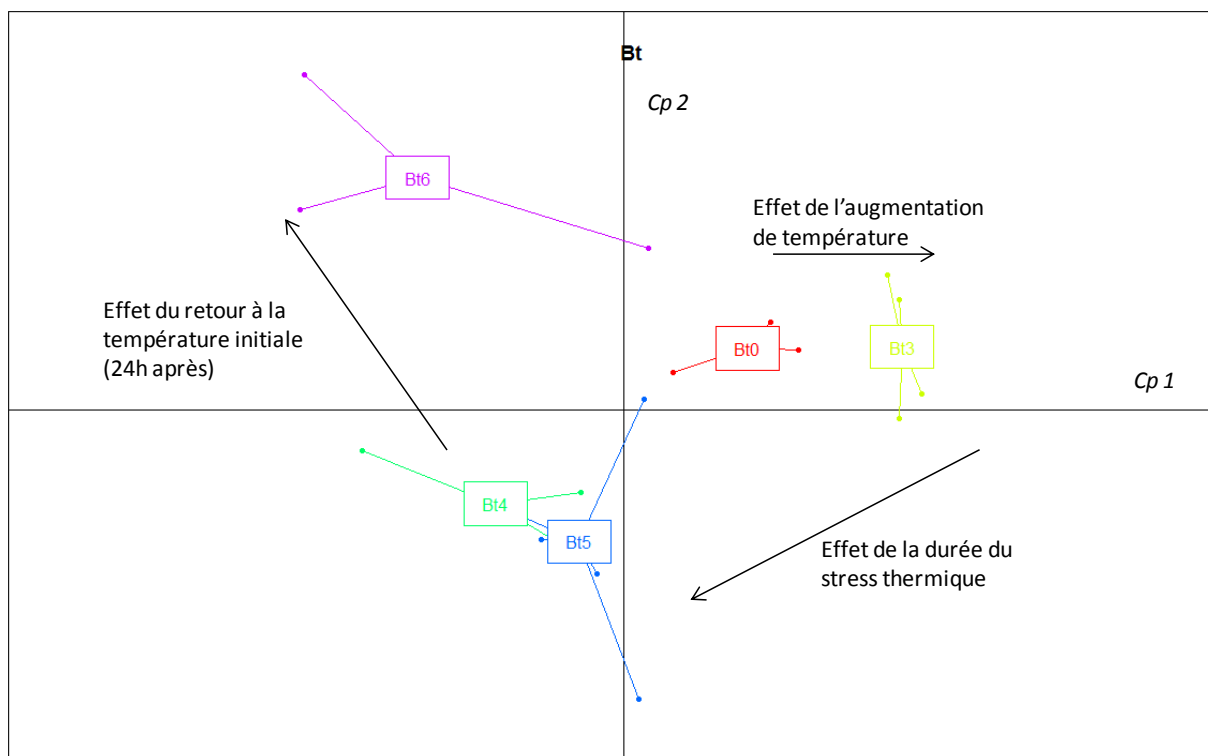


Figure 93. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bœnitiens présents seuls dans les bacs lors de la première expérience, obtenus en CG-SM. B : bœnitiens ayant subi un stress thermique conséquent. t0, t3, t4, t5 et t6 : temps de prélèvements. Les points représentent les individus, et le cadre dans lequel est indiqué le temps de prélèvement est situé au centre de l'aire délimitée par les points correspondant à ce temps de prélèvement. Cp 1 : composante 1, Cp 2 : composante 2.

La proportion de 5 métabolites augmente à t4 et t5, il semblerait qu'il s'agisse de l'acide arachidonique (C20:4n-6), l'acide margarique (C17:0), l'acide palmitique (C16:0), l'acide oléique (C18:1) et l'acide pentadécanoïque (C15:0) et la proportion d'un métabolite, l'acide myristoléique (C14:1), diminue. Les proportions des 33 métabolites semblent équilibrées à t6, indiquant que la différence métabolique observée entre t5 et t6 est due à la diminution des proportions des 5 métabolites cités précédemment. On observe donc principalement une augmentation des AG saturés ou mono-insaturés en C18 ainsi qu'un AG à longue chaîne et une diminution d'un AG de chaîne courte mono-insaturée.

La représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bécitiers de la deuxième expérience ayant subi uniquement un stress thermique, modéré pour les bécitiers du bac E et conséquent pour les bécitiers du bac F, permet de déterminer l'impact des variations de température et de l'amplitude du stress thermique. Comme dans le bac B (Figure 93) l'effet de l'augmentation de la température et l'effet de la durée du stress thermique sont observables. Les profils métaboliques des bécitiers prélevés à t4 sont semblables chez les bécitiers ayant subi un stress thermique modéré et conséquent, et sont très proches de ceux à t3. L'amplitude du stress thermique ne semble donc pas impacter la composition en acides gras des bécitiers (Figure 94).

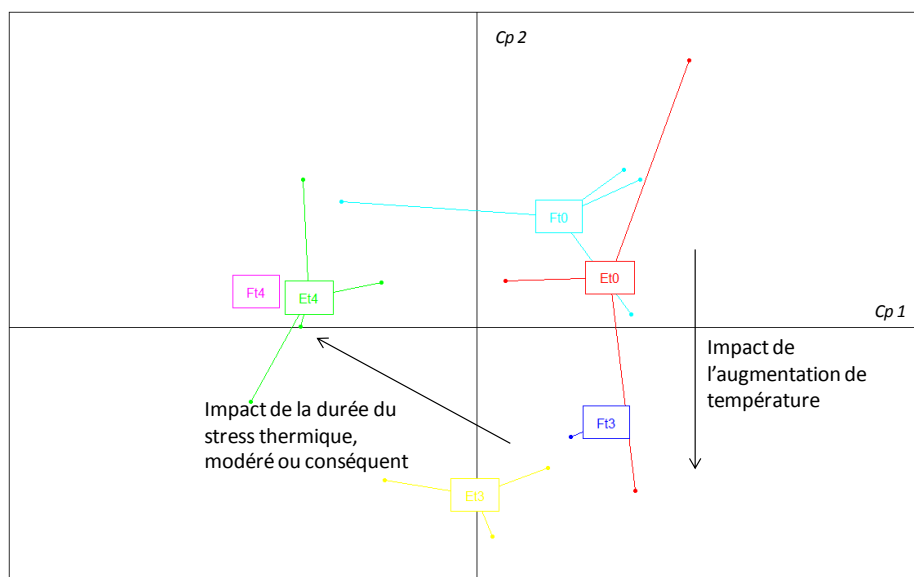


Figure 94. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bécitiers de la deuxième expérience ayant subi uniquement le stress thermique, obtenus en CG-SM. E : bécitiers ayant subi un stress thermique modéré (28°C), F : bécitiers ayant subi un stress thermique conséquent (32°C). T0, T3, T4 : temps de prélèvements. Les points représentent les individus, et le cadre dans lequel est indiqué le temps de prélèvement est situé au centre de l'aire délimitée par les points correspondant à ce point de prélèvement. Cp 1 : composante 1, Cp 2 : composante 2.

La proportion d'un métabolite, non identifié, a augmenté chez les bénitiers prélevés à T3 dans les bacs E et F. La proportion de trois métabolites, l'acide myristique (C14 :0), le cholestérol (C27) et l'eicosyne, a augmenté spécifiquement dans le bac E. La proportion de 4 métabolites, qui semblent être l'acide palmitique (C16:0), l'acide palmitoléique (C16:1n9), l'acide laurique (C12:0) et l'acide linoléique (C18:2n-6), a augmenté chez les bénitiers prélevés à T4, aussi bien pour un stress thermique modéré que conséquent (Figure 95). L'acide palmitique est le seul acide gras dont la proportion augmente de manière significative lors du stress thermique aussi bien dans la première expérience que dans la deuxième.

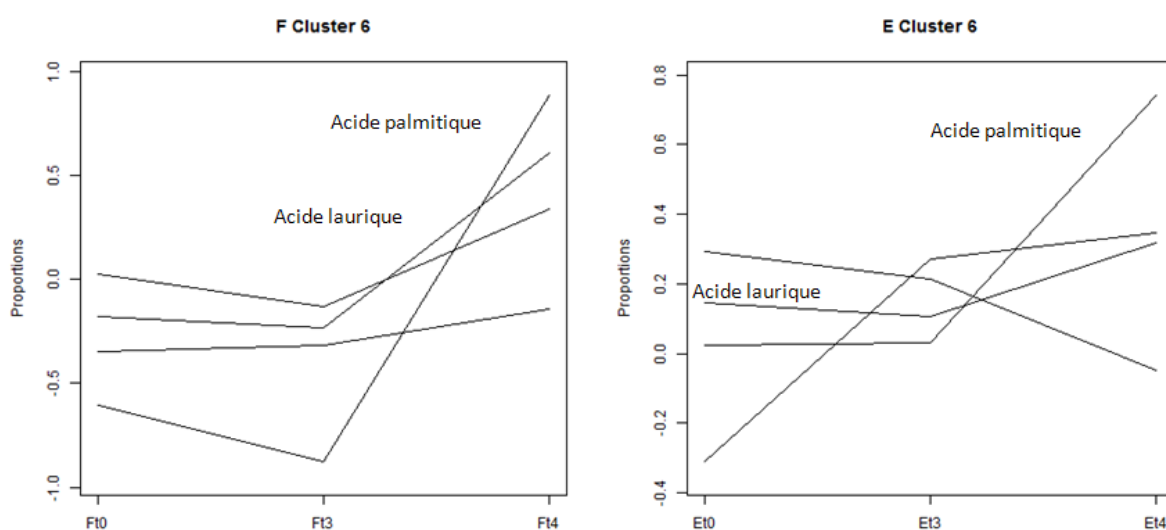


Figure 95. Variation des proportions des acides gras du groupe de métabolites N°6, comprenant les métabolites identifiés en tant que l'acide palmitique et l'acide laurique, au cours des expériences E et F. t0, t3 et t4 : temps de prélèvement.

III.2.2.3.2 Effet de la présence de coraux

La représentation en PLSDA-2D des profils métaboliques des bénitiers de la première expérience montre que la présence de coraux à proximité des bénitiers ne semble pas modifier la composition métabolique de ces derniers. Les profils métaboliques des bénitiers en présence (bac M) et en absence (bac B) de coraux sont très proches et varient de la même façon au cours du stress (Figure 96).

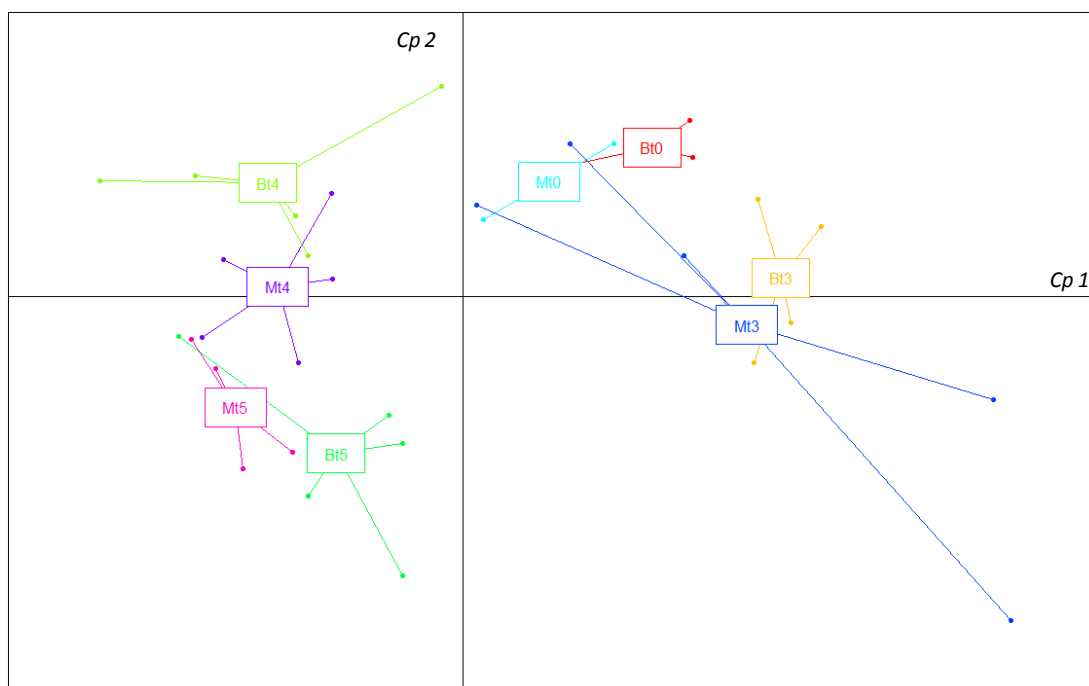


Figure 96. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des benthiques de la première expérience, obtenus en CG-SM. B : benthiques seuls dans les bacs, F : benthiques ayant subi un stress thermique conséquent (32°C). T0, T3, T4 : temps de prélèvements. Les points représentent les individus, et le cadre dans lequel est indiqué le temps de prélèvement est situé au centre de l'aire délimitée par les points correspondant à ce temps de prélèvement. Cp 1 : composante 1, Cp 2 : composante 2.

III.2.2.3.3 Effet de l'ajout d'un second type de stress

La représentation en PLSDA-2D des profils métaboliques des benthiques de l'expérience 2 ayant subi un stress thermique conséquent (bac F) plus un stress lumineux (bac G) ou hyperoxique (bac H) montre l'effet de l'ajout d'un second type de stress (Figure 97). L'ajout du stress hyperoxique ne semble pas avoir modifié la composition métabolique des benthiques lors de l'augmentation de température, contrairement à l'ajout du stress lumineux. En revanche, l'ajout d'un stress hyperoxique ou lumineux semble modifier la composition métabolique des benthiques lorsque le stress est plus long (augmentation de température plus plateau de 5 jours à 32°C).

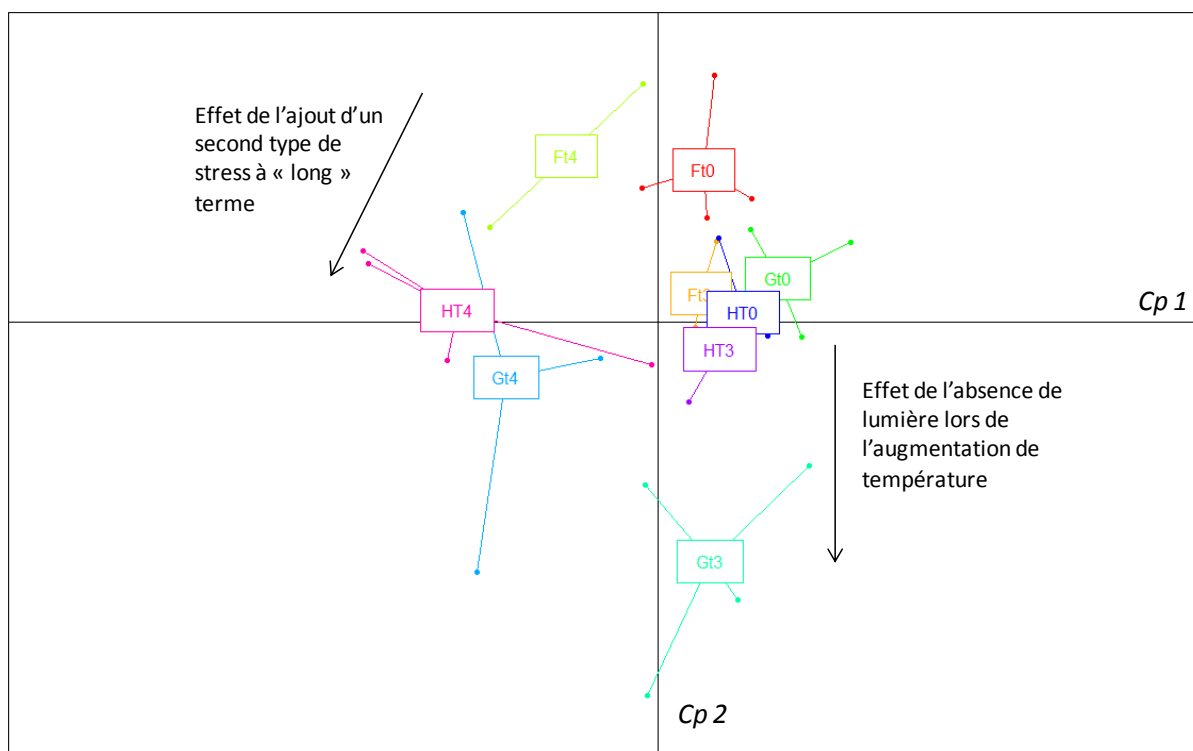


Figure 97. Représentation de la PLSDA-2D des profils métaboliques des bénitiers de la deuxième expérience, obtenus en CG-SM. T0, T3, T4 : temps de prélèvements. Les points représentent les individus, et le cadre dans lequel est indiqué le temps de prélèvement est situé au centre de l'aire délimitée par les points correspondant à ce temps de prélèvement. *Cp 1* : composante 1, *Cp 2* : composante 2.

La proportion de deux métabolites, qui semblent être l'acide stéaridonique (C18:4n-3) et l'acide eicosapentanoïque ou EPA (C20:5n-3), a augmenté chez les bénitiers prélevés à GT3, lorsque le blanchissement a été observé pour la première fois (Figure 98). La proportion de trois métabolites, qui semblent être l'eicosyne, l'acide hexadécadiénoïque (C16:2n-6) et l'acide pentadécanoïque (C15:0), a augmenté chez les bénitiers ayant subi deux types de stress et prélevés à la fin du plateau à 32°C (T4 : Figure 99).

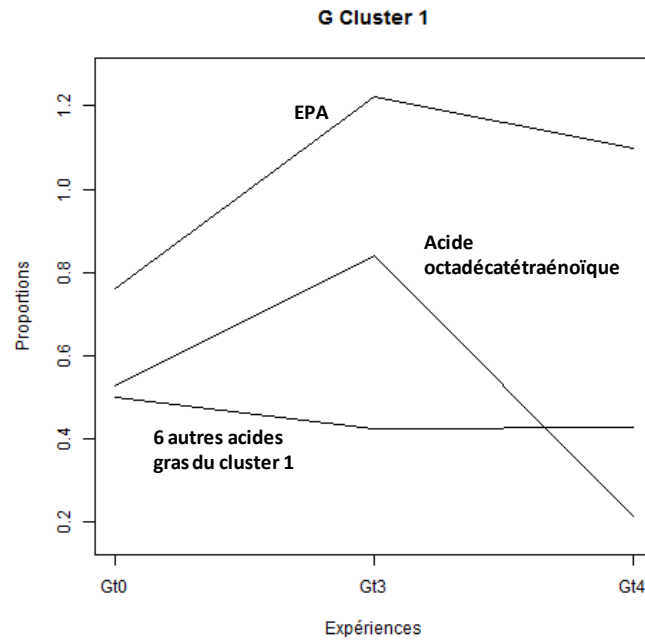


Figure 98. Variation des proportions des acides gras du groupe de métabolites N°1, comprenant les métabolites qui semblent être l'acide eicosapentanoïque ou EPA (C20 :5n-3) et l'acide octadécatétraénoïque (C20 :5n-3), au cours de l'expérience G. t0, t3 et t4 : temps de prélèvement.

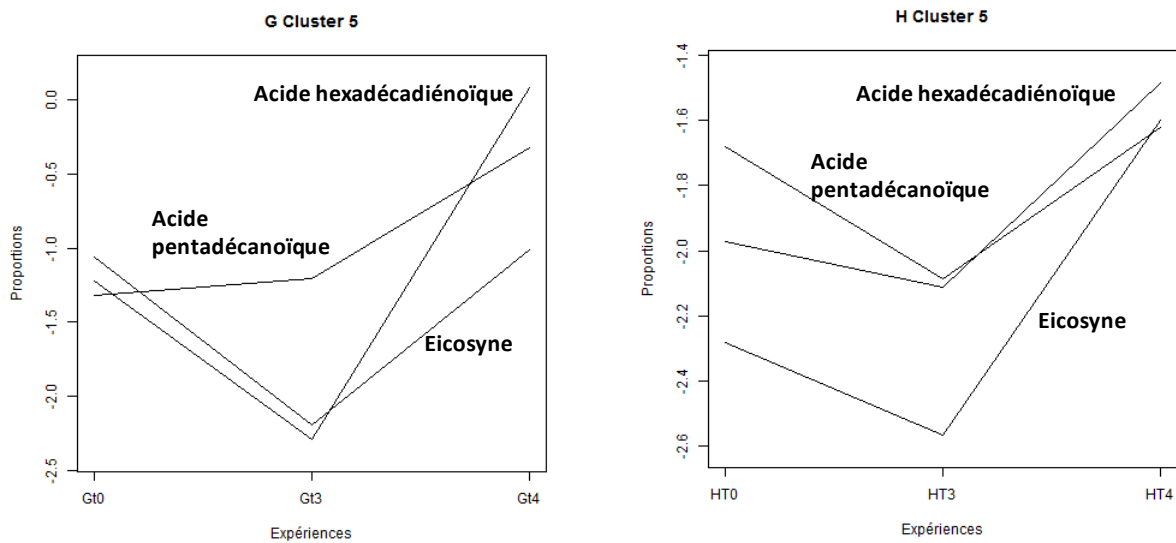


Figure 99. Variation des proportions des acides gras du groupe de métabolites N°5, comprenant les métabolites qui semblent être l'acide hexadécadiénoïque (C16:2n-6) et l'acide pentadécanoïque (C15 :0), au cours des expériences G et H. t0, t3 et t4 : temps de prélèvement.

III.2.2.3.4 Bilan

L'augmentation de la température de 2°C (bac E) entraîne l'augmentation des proportions d'un acide gras saturé à courte chaîne (C14 :0), d'eicosyne et de cholestérol (C27), qui confère un maintien de la fluidité membranaire malgré des fluctuations des conditions, alors que l'augmentation de la température de 6°C ne semble pas modifier la proportion des différents AG présents. En revanche, après le maintien de la température à 32°C pendant 5 jours, la proportion de 3 à 5 métabolites augmente en fonction des conditions de l'expérience. Tous les acides gras dont la proportion augmente présentent une chaîne carbonée courte saturée (C12 à C17) ou alors une chaîne plus longue (C18 ou C20) mais insaturée. La durée du stress influence donc la proportion des acides gras présents au sein des bécitiers, avec une augmentation des acides gras à chaîne courte ou des acides gras insaturés, qui semblerait liée à l'oxydation due à l'augmentation de la température. Une modification des profils métaboliques est observable 24h après le retour à la température initiale, avec une diminution de la proportion d'acides gras à chaîne courte ou à chaîne longue (C20) mais insaturée. Cependant les profils métaboliques des bécitiers revenus à 26°C après le stress thermique restent différents des profils métaboliques des bécitiers prélevés à 26°C et n'ayant pas subi le stress thermique. L'ajout d'un second stress augmente les proportions des acides gras à chaîne courte et insaturée (C16:2n-6 et C18:4n-3) qui n'étaient pas présents dans des proportions importantes chez les bécitiers n'ayant subi qu'un seul stress. Deux acides gras, l'acide stéaridonique (C18:4n-3) et l'acide eicosapentanoïque ou EPA (C20:5n-3), se retrouvent dans des proportions importantes lors d'un double stress incluant un stress lumineux, et semblent être caractéristiques du blanchissement des bécitiers. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de la proportion relative du rapport de l'acide eicosapentanoïque ou EPA/ acide arachidonique ou ARA, observée dans le cas de réponse au stress thermique de bivalves rapporté par d'autres auteurs (Farías, 2003).

III.3 L'activité anti-oxydante

En raison d'une augmentation probable des EAO lors du stress thermique, l'activité anti-oxydante de la fraction apolaire a été étudiée. Ainsi, une variation significative de la quantité de DPPH capté n'a été observée que pour Mt5 et Bt6 (Figure 100), avec des p-value de 0,017 et 8.10^{-4} respectivement. Plus le DPPH est capté plus l'activité antiradicalaire est importante. Cette activité a donc diminué dans les deux bacs ayant subi un stress thermique conséquent : dès le retour à 26°C dans le bac contenant des bécitiers et des coraux, et 24h après le retour dans le bac ne contenant que des bécitiers. Il n'y a pas de prélèvement au temps 6, T6, dans le bac contenant des bécitiers et des coraux, c'est à dire pas de point de mesure 24h après le retour à

la température initiale, il n'est donc pas possible de comparer l'activité antioxydante en présence et en absence de coraux à ce moment là. Il n'y a pas de prélèvement aux temps t5 et t6 dans les bacs E, F, G et H, on ne sait donc pas si l'activité antioxydante varie dans ces bacs après le retour à la température initiale. Concernant Gt4, les résultats semblent indiquer que la quantité de DPPH capté diminue au temps 4, or ce point a exceptionnellement été défini avec une seule mesure de DO, il n'est donc pas possible de savoir si il est représentatif de l'échantillon, ni de calculer si la variation observée est significative. Au vu de ces résultats il semble que l'activité antioxydante ne varie qu'à la fin de l'expérience, lors du retour à la température initiale, et la diminution de l'activité antioxydante semble plus rapide en présence de coraux.

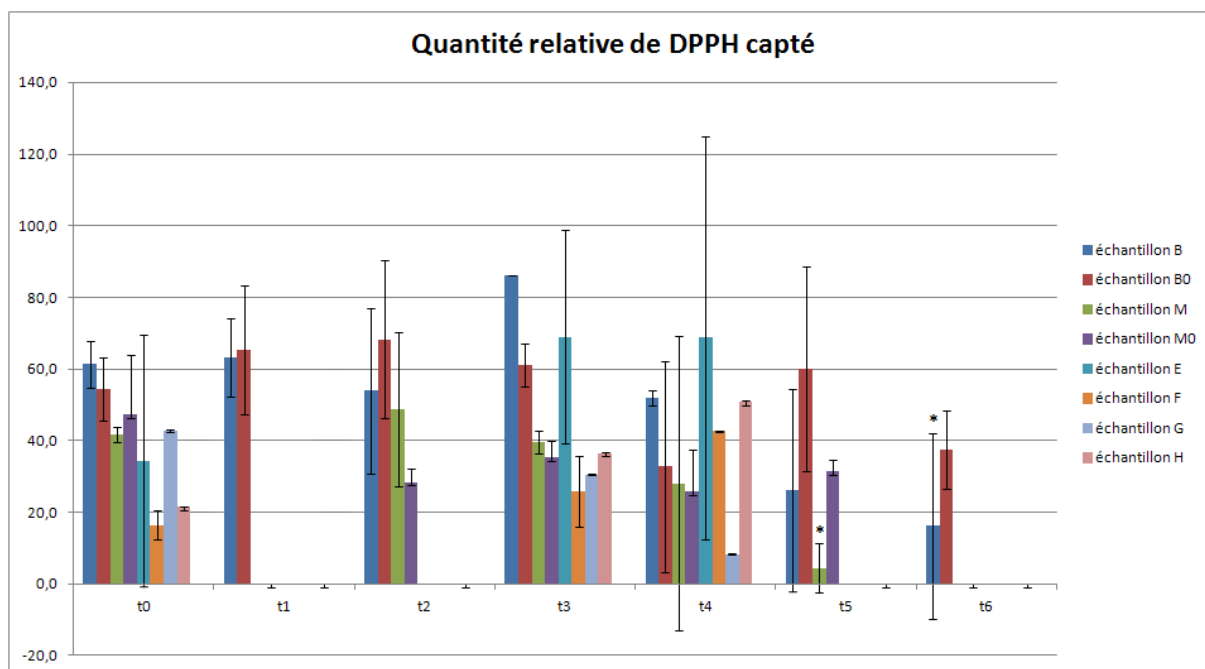


Figure 100. Histogramme représentant la quantité relative de DPPH capté pour les temps de prélèvement t0 à t6 et pour l'ensemble des échantillons des deux expériences.

IV. Caractérisation des communautés de *Symbiodinium* au cours du stress

IV.1 Densité et caractéristiques morphologiques

L'observation cytologique du manteau des bédouilles prélevés au cours de la première expérience permet de déterminer les caractéristiques morphologiques des communautés de *Symbiodinium* au cours du stress (Figure 101). Chez les bédouilles, en raison de l'épaisseur du tissu du manteau, l'observation cytologique ne permet pas, contrairement à l'observation des polypes des coraux, de statuer sur la densité de *Symbiodinium*. Alors que chez les bédouilles aucune mortalité et aucun signe de blanchissement n'ont été observés au cours de cette expérience, chez les coraux, dans les mêmes conditions de stress, un blanchissement a été observé à l'oeil nu dès 31°C (t2) et une mortalité de 90% des individus dès 32°C (t3). Au niveau cytologique, la densité de *Symbiodinium* présents au sein des coraux a diminué dès le début de l'augmentation de température (t1 = 29°C). De plus, l'apparition de granulations noires a également été observée dès 29°C (comm pers). Chez les bédouilles, des granulations noires (Figure 102), semblables à celles observées chez les coraux, apparaissent dès que la température de 32°C est atteinte (t3) et leur nombre augmente après 5 jours passés à 32°C (t4) puis reste stable après le retour rapide à 26°C (t5) (Figure 102), aussi bien en présence qu'en absence de coraux à proximité des bédouilles.

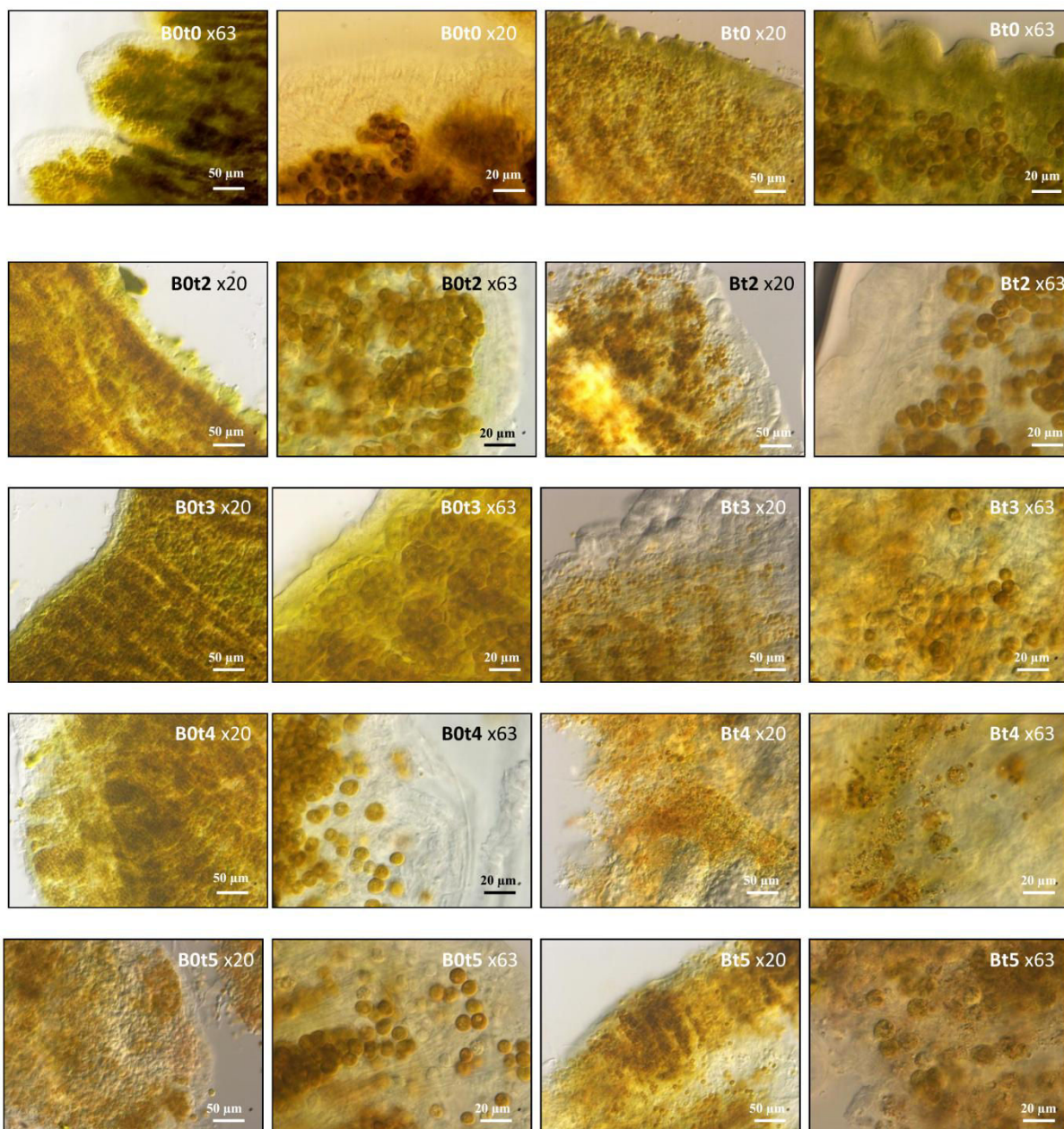


Figure 101. Photographies de manteau de bénytier prises au microscope optique. B0 : bacs témoin, B : bacs du stress thermique, t0 à t5 : temps de prélèvements. Les observations au grossissement 20 permettent d'observer la densité des *Symbiodinium* et les observations au grossissement 63 permettent d'observer l'allure de ces derniers.

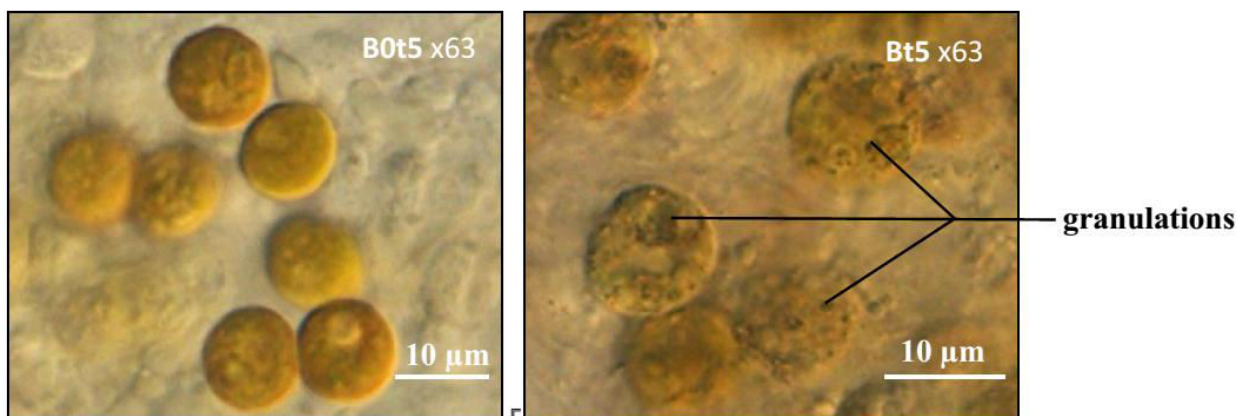


Figure 102. Photographies de manteau de bénitier prises au microscope optique au grossissement 63, mettant en évidence les granulations présentes dans certains *Symbiodinium*. B0 : bacs témoin, B : bacs du stress thermique, t5 : temps de prélèvement.

IV.2 Identification des clades et sous-clades

IV.2.1 Résultats de la PCR nichée

Afin d'identifier si les communautés de *Symbiodinium* hébergées par les bénitiers évoluaient au cours du stress thermique, une identification des clades a été menée sur quelques échantillons. Sur 49 échantillons de l'expérience de stress, analysés par la technique de PCR nichée, 48% possède les clades A et C, 36% ne possède que le clade A, 10% possède les clades A, C et D et 6 % possède les clades A et D (Tableau 25).

Tableau 25. Résultats de l'identification des clades de *Symbiodinium* présents au sein des bénitiers utilisés dans l'expérience de réchauffement pour différents types de stress, et obtenus par la technique de PCR nichée. En noir les échantillons témoins (non stressés), en rouge les échantillons ayant subi un stress thermique, en vert ceux qui ont subi un stress thermique et lumineux, et en bleu ceux qui ont subi un stress thermique et anoxique.

Echantillon	Clade amplifié						Combinaison obtenue			
	A	B	C	D	E	F	A	AC	ACD	AD
B t0 1	X	-	X	-	-	-		x		
B t0 4	X	-	X	X	-	-			x	
B t0 5	X	-	X	X	-	-			x	
B0 t0 3	X	-	-	-	-	-	x			
B t1 1	X	-	-	-	-	-	x			
B t1 2	X	-	-	-	-	-	x			
B t1 4	X	-	-	-	-	-	x			
B t1 5	X	-	X	-	-	-		x		

Echantillon	Clade amplifié						Combinaison obtenue			
B0 t1 2	X	-	-	-	-	-	x			
B0 t1 3	X	-	-	-	-	-	x			
B0 t1 4	X	-	X	-	-	-		x		
B0 t2 1	X	-	-	-	-	-	x			
B0 t2 5	X	-	-	X	-	-				x
B0 t3 1	X	-	X	-	-	-		x		
B t3 4	X	-	X	-	-	-		x		
B t4 2	X	-	X	X	-	-			x	
B t4 3	X	-	X	-	-	-		x		
B t4 4	X	-	X	-	-	-		x		
B t5 1	X	-	X	-	-	-		x		
B t5 3	X	-	X	-	-	-		x		
B0 t5 1	X	-	-	X	-	-				x
B0 t5 3	X	-	X	X	-	-			x	
M0t23	X	-	-	-	-	-	x			
M0t24	X	-	X	X	-	-			x	
M0t33	X	-	X	-	-	-		x		
M0t34	X	-	X	-	-	-		x		
M0t35	X	-	X	-	-	-		x		
Mt43	X	-	-	-	-	-	x			
Et04	X	-	-	-	-	-	x			
Et43	X	-	-	-	-	-	x			
Ft03	X	-	X	-	-	-		x		
Ft04	X	-	X	-	-	-		x		
Ft32	X	-	X	-	-	-		x		
Ft34	X	-	X	-	-	-		x		
Ft42	X	-	X	-	-	-		x		
Ft43	X	-	-	-	-	-	x			
Ft44	X	-	X	-	-	-		x		
Gt01	X	-	-	-	-	-	x			
Gt04	X	-	X	-	-	-		x		
Gt32	X	-	X	-	-	-		x		
Gt34	X	-	X	-	-	-		x		
Gt41	X	-	-	-	-	-	x			
Ht01	X	-	-	-	-	-	x			
Ht02	X	-	X	-	-	-		x		
Ht31	X	-	-	-	-	-	x			
Ht32	X	-	X	-	-	-		x		
Ht34	X	-	-	X	-	-				x
Ht44	X	-	-	-	-	-	x			
kt14	X	-	X	-	X	-				
Total	48	0	28	8	0	0	17	23	5	3
%	100%	0%	58%	16%	0%	0%	36%	48%	10%	6%

Les bénitiers hébergeant les clades de *Symbiodinium* A et C ensemble semblent être les plus fréquents quelque soit le stress (42% chez les échantillons témoins, 63% chez ceux qui ont subi le stress thermique). Le nombre d'échantillons ayant subi un multi-stress est insuffisant ici pour que les pourcentages ne soient représentatifs. Le clade D se retrouve plus chez les échantillons témoins (25%) que chez les échantillons stressés (6%) (Tableau 26).

Tableau 26. Proportions de chaque combinaison de clades de *Symbiodinium* présents dans les bénitiers ayant subi divers types de stress, obtenues par la technique de PCR nichée.

Clades	Témoin n = % des échantillons témoin	Stress thermique n = % des échantillons ayant subi le stress thermique	Multistress n = % des échantillons ayant subi un double stress
A	8 = 33%	5 = 31%	3 = 43%
A et C	10 = 42%	10 = 63%	3 = 43%
A, C et D	4 = 17%	1 = 6%	–
A et D	2 = 8%	–	1 = 14%
Total (% nb total d'échantillons)	24 = 51%	16 = 34%	7 = 15%

Ainsi, pas ou peu de variations en composition en clades ont été observées au cours des expériences de stress.

IV.2.2 Résultats obtenus grâce aux données transcriptomiques

Etant donné que la région 28S est une région exprimée chez les *Symbiodinium*, il a donc été possible d'identifier ces séquences parmi les données de transcriptomique et ainsi d'identifier, dans la mesure du possible, les clades et/ou sous-clades présents dans les échantillons. En effet, si la plupart des séquences d'ARNr 28S de *Symbiodinium* trouvées dans les bénitiers de l'expérience s'alignent avec 100 % d'identité à une séquence de *Symbiodinium*, comprenant la région de l'ARNr 28S, présente dans *GenBank*, le domaine aligné peut être un domaine conservé entre différents clades ou discriminant au niveau des clades voire sous clade. Dans ces conditions, il est alors possible de définir le sous-clade ou un groupe de sous-clades possédant le même domaine. Ainsi, pour le clade A, nos séquences correspondent au sous clade A3, qui certaines fois est commune aux séquences des sous clades A13, A2, A4 et plus rarement A6. Concernant le clade C, nos séquences correspondent la plupart du temps aux séquences du

sous-clade C15, souvent impossibles à discriminer des sous clades C90, C91 et C1, ou le groupe de sous clades C140, C40, C2. Concernant le clade D, nos séquences correspondent aux séquences des sous clades D1a et D1, souvent indissociables de celles des sous clades D15, D13 et D8. De plus, les clades identifiés par transcriptomique correspondent aux clades présents au sein d'un groupe de 5 individus à un temps donné, les clades identifiés au temps suivant correspondent aux clades présents chez un autre groupe d'individus dont on ignore la composition en symbiontes de départ. Les modifications des communautés symbiotiques correspondent donc ici à une tendance et non à une cinétique. Les combinaisons de clades obtenues dans les différentes conditions de stress sont regroupées dans le Tableau 27

Tableau 27 Clades identifiés au sein des groupes de bénitiers de l'expérience de réchauffement grâce aux analyses transcriptomiques

Groupe	A	C	D	Combinaison
Bt0	+	+	+	A C D
Bt1	+			A
Bt2	+	+		A C
Bt3	+	+		A C
Bt4	+		+	A D
Bt5	+	+		A C
Bt6	+			A
B0t0	+			A
B0t1	+	+		A C
B0t2	+	+		A C
B0t3	+	+	+	A C D
B0t4	+			A
B0t5	+	+	+	A C D
B0t6	+	+		A C
Mt0	+			A
Mt2	+	+	+	A C D
Mt3	+	+	+	A C D
Mt4	+	+	+	A C D
Mt5	+			A
M0t0	+			A
M0t2	+	+		A C
M0t3	+	+		A C
M0t4	+	+		A C
M0t5	+			A

Sur les 24 lots de 5 bénitiers analysés par transcriptomique, 8 lots (= 35 %) ne possèdent que le clade A, ce qui suggère que tous les bénitiers de ces lots ne possèdent ni le clade C ni le clade D. Ce pourcentage correspond à celui obtenu grâce à la PCR nichée (36%) sur des bénitiers de l'expérience analysés 1 par 1. La différence entre le groupe Bt1 au sein duquel le clade A seul a été trouvé grâce aux analyses transcriptomiques et la présence du clade C identifié avec la PCR nichée au sein du bénitier Bt15 s'explique par le fait que ce bénitier n'ait pas été inclus dans le groupe Bt1 analysé en transcriptomique car il appartenait au clade *T. maxima mapiko nord*. La combinaison de clades AC est la plus répandue (39%), mais elle comprend peut être, en plus des bénitiers avec la combinaison de clade AC, des bénitiers qui ne possèdent que le clade A. La combinaison de clades ACD est retrouvée chez 26% des groupes, et inclut certainement les combinaisons A, AC, ACD et peut être AD, ce qui expliquerait que cette combinaison soit bien plus retrouvée ici que dans les résultats de PCR nichée (10%). La combinaison AD retrouvée chez 6% des individus analysés grâce à la technique de PCR nichée est donc peut être présente au sein des groupes identifiés en transcriptomique avec la combinaison ACD.

Au cours de l'expérience, dans le bac témoin ne contenant que des bénitiers les clades de *Symbiodinium* A, C et D sont présents. Dans le bac témoin contenant des bénitiers et des coraux seuls les clades A et C sont présents. Dans les bacs stressés, à t0 (26°C) les clades A, C et D sont présents quand les bénitiers sont seuls (bac B), alors que seul le clade A est présent quand ils sont en présence de coraux (bac M). Lors du stress thermique les clades A, C et D ont été identifiés aussi bien en présence et en absence de coraux. Dans l'ensemble, la symbiose avec le clade D semble plus fréquente en absence de coraux à proximité des bénitiers.

Par ailleurs, parmi la population de séquences 28S analysées, certaines ont présenté de fortes similarités avec d'autres organismes que le bénitier ou *Symbiodinium*. Ainsi, une séquence correspondant à *Alexandrium* a été identifiée dans le groupe Bt4. Une séquence de diatomée (*Nitzschia* sp) et une séquence de cilié (*Paradiophys* sp) ont été identifiées dans le groupe M0t2. Des séquences de champignons, très fréquentes, ont été trouvées parmi les groupes Bt0 (*Guignardia* sp ou *Preussia* sp ou *Umbilicaria* sp), Bt2 (*Fergusobia* sp et *Fungus* sp et *Botryobasidium* sp), Bt4 (*Ricordea* sp ou *Corymactis* sp ou *Montastraea* sp) et Bt6 (*Rosupinatus* sp ou *Cyphellaceae* sp ou *Climacocystis* sp), B0t2 (*Fungus* sp), Mt0 (*Cladosporium* sp ou *Polycephalomyces* sp) et M0t4 (*Fergusobia* sp ou *Brachyalara* sp ou *Malassezia* sp). Des séquences de crustacés, *Thermocyclops* sp, ont également été trouvées parmi les groupes Bt6, Mt2, Mt3, Mt5 et M0t0, et une séquence de *Macrocyclops* sp a été identifiée dans le groupe B0t0. Une séquence de gastéropode marin (*Tubbreva* sp) a été trouvée dans le groupe Mt5.

V. Synthèse et discussion partielle

En ce qui concerne les *Symbiodinium*, les résultats obtenus au cours de ce travail ont révélé l'apparition de corps denses aux électrons à la périphérie de *Symbiodinium* au cours du stress thermique. Cette dégradation a été observée chez une anémone, suite également à un stress thermique (Dunn *et al.*, 2004; Dunn *et al.*, 2002). L'observation de ces corps denses au microscope électronique à transmission a montré qu'il s'agissait d'une agrégation de matériel cellulaire contenant certainement de la chromatine nucléaire, signe caractéristique de la mort cellulaire. Lorsque l'apparition de ces corps denses était accompagnée de la dégradation des organites et des membranes, comme ce que l'on a observé chez le bénitier lors du stress, ceci est signe de nécrose et non d'apoptose. L'apparition de ces corps denses noirs correspond également au blanchissement et à la mort des coraux. En revanche, les mêmes modifications cytologiques ne se manifestent ni par le blanchissement ni par la mort des bénitiers. Les *Symbiodinium* semblent donc jouer un rôle important dans la résistance au stress des coraux mais pas ou dans une moindre mesure pour les bénitiers. La résistance au stress des bénitiers semble donc, dans le cadre de notre étude avec un stress relativement court n'ayant pas amené au blanchissement des bénitiers, propre à des mécanismes mis en place par l'organisme hôte, et indépendants de la présence et de l'état physiologique des *Symbiodinium* qu'il héberge. Or des changements physiologiques profonds, liés à une modification de leur budget carbone et azote, ont été observés chez les bénitiers *T. gigas* dont le nombre de *Symbiodinium* avait été divisé par 30 lors du blanchissement (Leggat *et al.*, 2003). Des observations cytologiques du manteau des bénitiers présents dans les bacs G (absence de lumière), ainsi que le séquençage des transcrits présents au sein de ces bénitiers tout au long de l'expérience, devraient fournir des informations sur l'état des *Symbiodinium* et sur la réponse transcriptomique de *T. maxima* lors du blanchissement.

Concernant leur identification, les sous-clades, identifiés grâce aux analyses transcriptomiques et présents au sein des bénitiers ayant servi lors de l'expérience de réchauffement, sont les sous-clades A3, A3-2-4-6, C15, C15-90-91-1, C140-40-2, D1a, D1 et D1-15-13-8. Les sous-clades présents au sein des bénitiers de Tahiti, Moorea, Moruroa et Raivavae, identifiés grâce aux analyses génétiques, sont les sous-clades A3, A3-4-13, C57, C1-2-3-15-31-90-91 et D (*cf* I.2.3). La comparaison de ces résultats met en évidence des sous-clades communs : A3, A3-4, C15-90-91-1. Cela confirme l'identification du sous-clade A3, suggère que le clade D identifié à Tahiti (*cf* I.2.3) est certainement le sous-clade D1 ou D1a, que le clade C57 ne semble pas présent à Tahiti, et enfin que le clade C présent à Tahiti se trouve certainement être le sous-clade C15. Ces résultats,

d'identification des clades par la génétique (PCR nichée) et la transcriptomique, sont cohérents et ne mettent pas en évidence de lien entre le stress thermique et les communautés de *Symbiodinium* présents au sein des bénitiers. En revanche, il semblerait que le clade D, décrit comme thermorésistant, soit présent plus souvent au sein des bénitiers seuls dans les bacs qu'au sein des bénitiers placés à proximité des coraux. Il est ainsi possible qu'en présence de coraux, les interactions entre les bénitiers et les *Symbiodinium* de clade D soient altérées, rejetant ainsi dans l'environnement ces clades qui se retrouvent préférentiellement chez les coraux lors d'un stress thermique. Par ailleurs, plusieurs espèces de champignons ont été identifiées au sein des bénitiers prélevés à 26°C et lors du stress thermique. Aucune corrélation significative n'a pu être établie entre la présence de champignons et le stress thermique.

Concernant l'étude de l'expression différentielle, nos résultats de transcriptomique indiquent que l'expression de nombreux gènes varie chez les bénitiers dès le début du stress thermique (29°C = +3°C par rapport à la normale). Certains de ces gènes avaient déjà été repérés lors de l'exposition d'autres bivalves à divers stress. Ainsi, l'augmentation de l'expression de gènes des protéines chaperonnes dont certaines HSP a été observée lors du stress thermique chez la moule (Núñez-Acuña *et al.*, 2012) et l'huître (Ivanina *et al.*, 2009), et lors d'exposition à des polluants chez l'huître (Zhang et Zhang, 2012). La particularité de nos résultats vient du fait que les gènes mis en évidence concernent les protéines de choc thermique HSP40 et HSP100, qui n'avaient pas été repérés chez les autres bivalves. Une augmentation de la quantité de protéines G impliquées dans la modification du cytosquelette et d'éléments de structure du cytosquelette a été mise en évidence lors de stress environnementaux chez la moule (Tomanek, 2012). La régulation positive des gènes de protéines G ou de protéines de structure du cytosquelette mise en évidence dans notre étude, confirme que le cytosquelette est une cible du stress thermique, et que sa modification semble liée à une modification transcriptomique. La surexpression de gènes codant pour des protéines (les supresseurs de *cytokine-signaling 2*) qui bloquent la division cellulaire a été observée chez l'huître lors du stress thermique (Li *et al.*, 2013). Dans notre étude, un gène codant pour une protéine qui présente un rôle équivalent, la kinase polo-like, est également surexprimés en réponse au stress thermique. Comme dans notre étude sur le bénitier, la surexpression de gènes qui participent à l'adhésion cellulaire a été observée chez l'huître (Lang, 2009 ; Chapman *et al.*, 2011) lors d'un stress thermique. L'un des éléments marquants de cette étude transcriptomique est la différence de réponse des bénitiers en fonction de la présence ou non des coraux dans les bacs.

Enfin, l'étude métabolomique a révélé qu'il était possible de distinguer au moins 2 états métabolomiques lors du stress. Le premier en réponse immédiate à la montée en température au-delà de 29°C et le second plus tardif après maintien de la température sur plusieurs jours. Ces 2 états apparaissent aussi bien lors de l'étude des AG en CG-SM que l'analyse globale de la fraction apolaire en CLHP-SM. Ces résultats suggèrent la mise en route d'une réponse immédiate, d'urgence, permettant de faire face momentanément à la perturbation, suivie par un réajustement des voies cellulaires acclimatées. Ces états présentent un temps de latence puisqu'après 24h de retour à la température normale, l'état métabolomique des bécards est toujours différent de celui de l'état initial. Ainsi, au niveau des AG, il apparaît rapidement une augmentation des AG saturés de chaîne plutôt courte et une augmentation de la proportion relative des AG insaturés déjà présents en abondance. Cette augmentation pourrait être attribuée au rôle antioxydant de ces AG insaturés, notamment sous l'effet d'un multistress. L'augmentation observée de l'EPA est notable sachant que cet AG fait partie de ceux considérés comme essentiels à la survie des bivalves (Chetoui et Cafsi, 2010). L'augmentation de la proportion en AG à chaîne plus courte serait consécutive à des coupures oxydatives au niveau des doubles liaisons des AG initialement à chaîne plus longue, survenues au cours du stress thermique. En réaction à ce phénomène oxydatif au niveau des AG (ainsi écourtés), l'augmentation des protéines participant à la synthèse des AG et à leur élongation est suggérée par les résultats de la transcriptomique. L'ajout de petits acides gras dans des chaînes carbonées plus longues a déjà été observé chez *C. gigas* (Waldock et Holland, 1984), nos résultats indiquent qu'il peut donc s'agir d'une réaction transcriptionnelle. Dans un second temps, les AG à longue chaîne (C20, C22 et C24) se retrouvent en plus grande proportion. En ce qui concerne les résultats en CLHP-SM, une différence entre les compositions métaboliques des bécards des 2 expériences de réchauffement a été observée dès t0. Elle peut être due soit à l'échantillonnage malgré les précautions prises, soit à une différence des paramètres biotiques (microorganismes et métabolites présents dans l'eau) lors de l'acclimatation et de l'expérience qui ont eu lieu à 20 jours d'intervalle.

PARTIE V

Discussion générale et perspectives

I. Génétique

I.1 Deux nouveaux clades de *T. maxima* en Polynésie française et à Tonga : implications quand à leur origine

D'une manière générale, l'analyse combinée de l'histoire géologique et de la phylogénie moléculaire permet de retracer les événements démographiques passés qui ont influencé la répartition et la structure génétique actuelle des populations naturelles. L'analyse génétique réalisée lors de cette thèse, avec un échantillonnage de 392 bénitiers de l'espèce *T. maxima* en Polynésie française, a révélé qu'ils se répartissent en deux clades distincts. Les échantillons de Fidji forment un clade à part, proche du clade formé par les échantillons de l'Ouest du Pacifique. En revanche les deux clades identifiés en Polynésie française ont été retrouvés dans nos échantillons des Tonga qui sont géographiquement bien plus proches de Fidji que de la Polynésie française. Les courants de surface actuels dans le Pacifique (Martinez *et al.*, 2009) indiquent que l'hypothèse de la colonisation des Tonga par les bénitiers provenant de Polynésie française est la plus plausible (*cf* Partie II, II. Synthèse), même si la distance entre les îles dans cette région est trop importante et les courants trop faibles pour expliquer la colonisation par les stades larvaires, mobiles, de 10 jours. La divergence entre les deux clades trouvés en Polynésie française est estimée à $1,5 \pm 0,5$ Ma d'après nos calculs, il s'agit donc d'un événement récent sur l'échelle des temps géologiques. L'apparition des Tridacnidae a été estimée à 20 Ma, celle du genre *Tridacna* à 18 Ma, et plus précisément entre 6 et 10 Ma pour l'espèce *T. maxima*, avec un premier fossile datant de 4,8 Ma (Huelsen *et al.*, 2013; Schneider et O'Foighil, 1999). Cette période de plusieurs millions d'années est suffisante pour voir l'apparition de mutations, leur transmission et leur stabilisation, et induire ainsi une augmentation de la diversité génétique au sein de cette espèce, entraînant l'apparition de multiples clades dont les deux clades distincts observés dans notre étude en Polynésie française. Deux scénarios pourraient expliquer cette observation : soit les bénitiers ont divergé avant d'arriver en Polynésie française, soit ils ont divergé à partir d'un ancêtre commun arrivé en Polynésie française. Dans le cas où les deux clades soient arrivés en Polynésie française, la colonisation aurait eu lieu il y a moins d'1,5 Ma, et dans le cas où un seul clade pionnier soit arrivé en Polynésie française, elle aurait eu lieu entre 10 Ma (date d'apparition de l'espèce *T. maxima*) et 1,5 Ma (date de la divergence des deux lignées). Dans le cadre de l'hypothèse où deux clades seraient arrivés en Polynésie française, il y a moins d'1,5 Ma, ils ont pu arriver au niveau des 4 archipels, puisque toutes les îles (excepté Tahiti et Moorea) ainsi que leur lagon, étaient formées. Leur arrivée peut être décalée dans le

temps. Dans le cas où un seul clade soit arrivé en Polynésie française, si il est arrivé entre -10 et -5 Ma, il serait arrivé au niveau des Tuamotu ou des Australes, archipels dans lesquels les îles et leur lagon étaient formés à cette période, ou bien au niveau de Scilly et Bellinghausen, îles de la Société formées il y a 6,8 Ma. Si ce clade est arrivé entre -5 et -0,5 Ma, dans ce cas il a également pu arriver au niveau des Gambier et des îles les plus à l'ouest de la Société.

1.1.1 Hypothèse 1 Arrivée des deux clades de *T. maxima* en Polynésie française

La période comprise entre -1,5 Ma et aujourd'hui, date à laquelle les deux clades seraient arrivés en Polynésie française depuis le Pacifique ouest, correspond à la période du Pléistocène et de l'Holocène. Le Pléistocène (-2,6 Ma à -12 000 ans) est marqué par les derniers épisodes glaciaires, alors que l'Holocène (-12 000 à aujourd'hui) est une période inter-glaciaire, propice à la montée des eaux et formation des lagons. La régression marine engendrée par les glaciations lors du Pléistocène a modifié les courants marins présents dans le Pacifique Sud (Hall *et al.*, 2001). L'estimation des courants de surface présents lors de la dernière période glaciaire (Pollock, 1990) indique qu'à cette époque le courant d'est traversant le sud du Pacifique sud était bloqué par une chaîne sous-marine présente à l'est et remontait alors directement au niveau de la Polynésie française (Figure 103). Ces courants auraient pu permettre, dans le cas où les larves de bécards auraient résisté aux faibles températures de l'eau à cette période et ces latitudes, l'arrivée, depuis le Pacifique ouest, d'au moins deux clades de bécards au niveau des Australes.

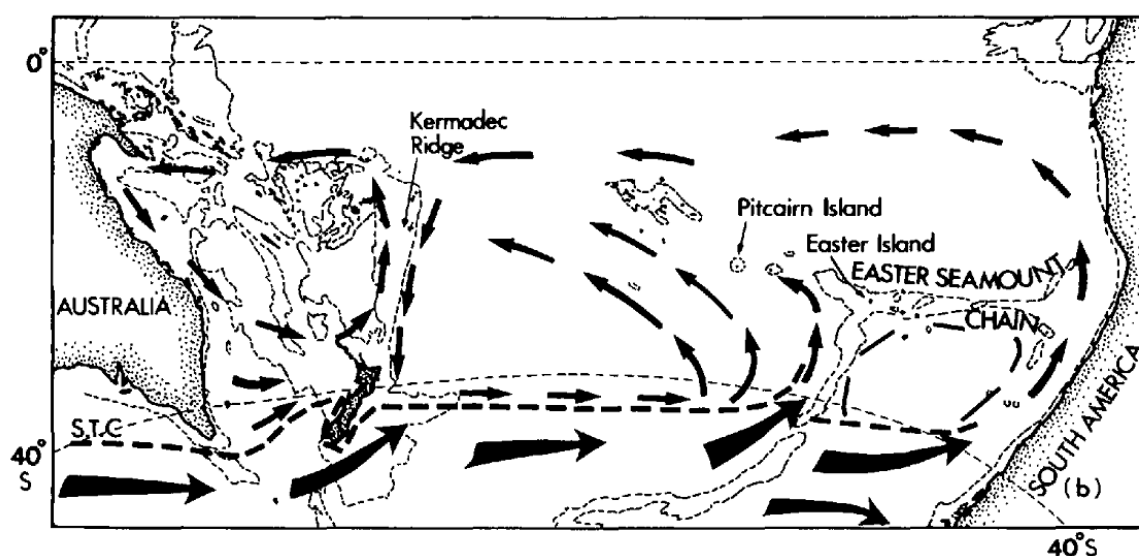


Figure 103. Carte des courants de surface du Pacifique sud estimés durant les périodes de régression marine du Pliocène et du Pléistocène (-3 Ma à -12000 ans). (D'après Pollock, 1990)

Ces courants de surface, qui étaient présents de -1,5 Ma à -12 000 ans, ont ensuite laissé place, durant l'Holocène, aux courants marins actuels, caractéristiques de la période interglaciaire. Le courant du Pacifique Sud ne remonte plus au niveau de la Polynésie française et le Contre Courant Equatorial Sud passe au-dessus de Fidji et Tonga et n'atteint pas la Polynésie française (Figure 104). Cette disposition des courants de surface ne permet pas d'expliquer la colonisation de la Polynésie française depuis la région Indo-Pacifique si elle s'est produite après -12 000 ans.

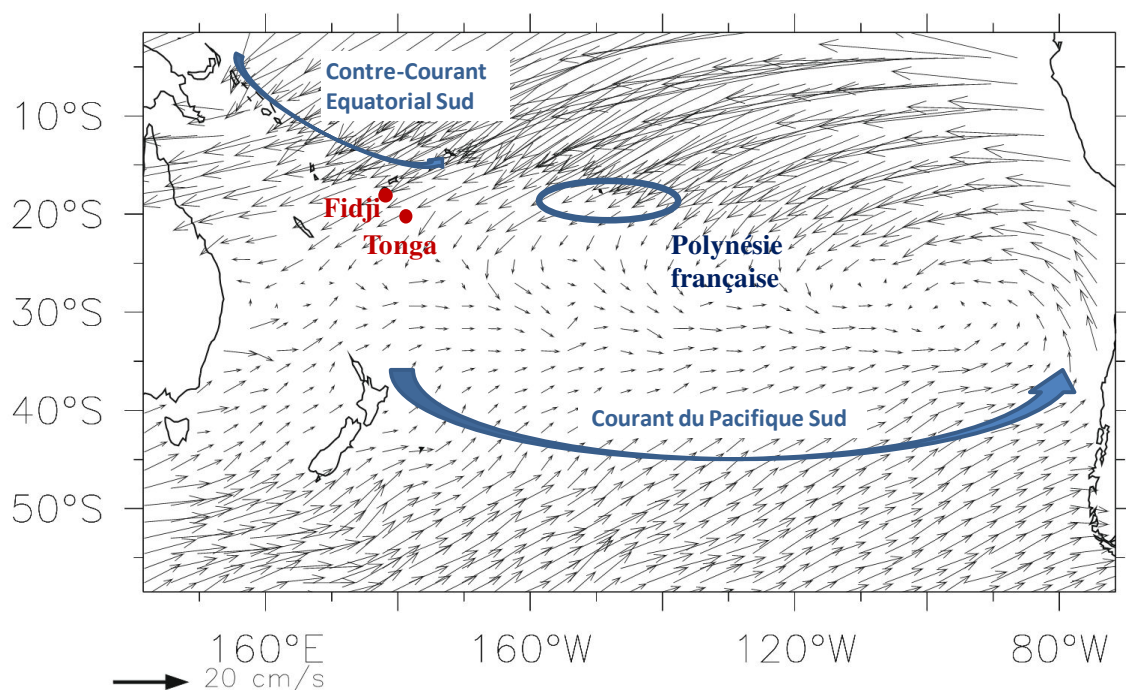


Figure 104. Carte des courants de surface moyens actuels dans le Pacifique Sud.

Cependant, le Contre Courant Equatorial Sud (CCES) se positionne saisonnièrement en février ou pendant les épisodes El Niño au niveau de l'archipel des Tuamotu (Martinez *et al.*, 2009). Ces phénomènes ponctuels ont lieu depuis l'holocène (Carre *et al.*, 2014) et sont semblables en magnitude et fréquence à celles que nous connaissons aujourd'hui (Donders *et al.*, 2008). Ils pourraient expliquer la colonisation de la Polynésie française (aux Tuamotu), entre -12 000 ans et aujourd'hui, par des individus provenant de la région Indo-Pacifique et du Pacifique ouest (Figure 105).

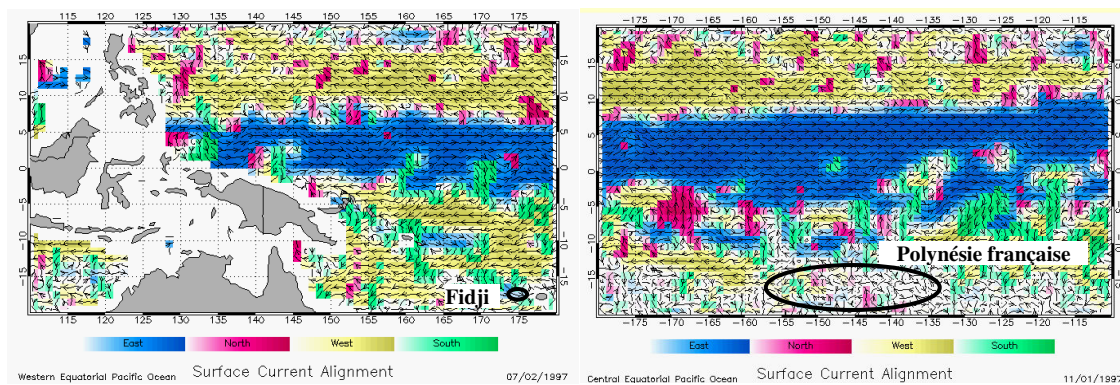


Figure 105. Carte des courants de surface lors des évènements climatiques exceptionnels tels qu'El Niño ou La Niña. (<http://bobtisdale.blogspot.com/2009/02/equatorial-currents-before-during-and.html>)

Les résultats génétiques obtenus avec nos échantillons de Fidji (génétiquement plus proches de l'Australie que de la Polynésie française) coïncident avec la trajectoire du CCES pendant les phénomènes climatiques El Niño. Cependant, même si un haut niveau d'échange de gènes sur de longues distances (jusqu'à 5000 km) a été observé chez *T. maxima* dans les chaînes d'îles du Pacifique centre et ouest (Benzie et Williams, 1997), la distance qui sépare les chaînes d'îles semble trop importante pour permettre la dispersion par les courants océaniques actuels des larves de bénitier à travers tout le Pacifique sud-ouest. La trajectoire et le sens des courants de surface présents pendant les épisodes El Niño coïncident donc avec le fait que la Polynésie française ait été colonisée par des bénitiers provenant de la région Indo-Pacifique, selon une trajectoire qui passerait au nord de Fidji, et que les bénitiers de Polynésie française auraient ensuite colonisé les Tonga. En revanche, la vitesse des courants océaniques actuels ne permet pas de confirmer cette hypothèse. L'hypothèse du déplacement des larves grâce au vent, bien plus rapide que les courants, a été énoncée (Benzie et Williams, 1997), et permettrait ainsi d'expliquer la colonisation d'îles très éloignées, mais cette hypothèse semble peu probable en dehors du cas particulier des cyclones pour lesquels la force déployée par le vent permettrait le déplacement des larves sur de longues distances. En effet, tous les cyclones qui ont touché la Polynésie française entre 1945 et 2009 présentaient une trajectoire nord-ouest/sud-est avec une vitesse moyenne des vents comprise entre 65 et 198 km/h (Larrue et Chiron, 2010). L'énergie cinétique développée par de tels phénomènes météorologiques serait à priori suffisante pour transporter des larves de quelques microgrammes, et ce sur de très longues distances, et permettre la colonisation de la Polynésie française par des bénitiers issus de la région Indo-Pacifique.

Si on considère que l'arrivée des 2 clades est conjointe (la probabilité qu'un évènement exceptionnel rare apporte des larves différentes est supérieure à la probabilité de 2 évènements de ce type), et d'après la trajectoire des cyclones et du CCEES lors des épisodes El Niño, les clades *mapiko sud* et *mapiko nord* seraient donc arrivés au niveau de l'archipel des Tuamotu, puis auraient colonisé la Société, les Australes et les Gambier (Figure 106). Dans ce cas, la distribution des deux clades observée aujourd'hui en Polynésie française pourrait s'expliquer par la sélection. En effet, la température de l'eau des lagons aux Tuamotu, situés au nord, est plus élevée que dans les autres archipels. Ces températures sont d'autant plus importantes que l'archipel des Tuamotu est constitué, contrairement aux autres archipels, d'atolls caractérisés par un système hydrodynamique fermé. Certaines zones des lagons très peu profondes, les « hoa », peuvent présenter des températures élevées (supérieures à 30°C) pendant de longues périodes (Addessi, 2001). Il est donc possible que le clade *mapiko nord* soit plus adapté aux conditions environnementales présentes au niveau de l'archipel des Tuamotu, et le clade *mapiko sud* aux conditions présentes au niveau de la Société, des Australes et des Gambier.

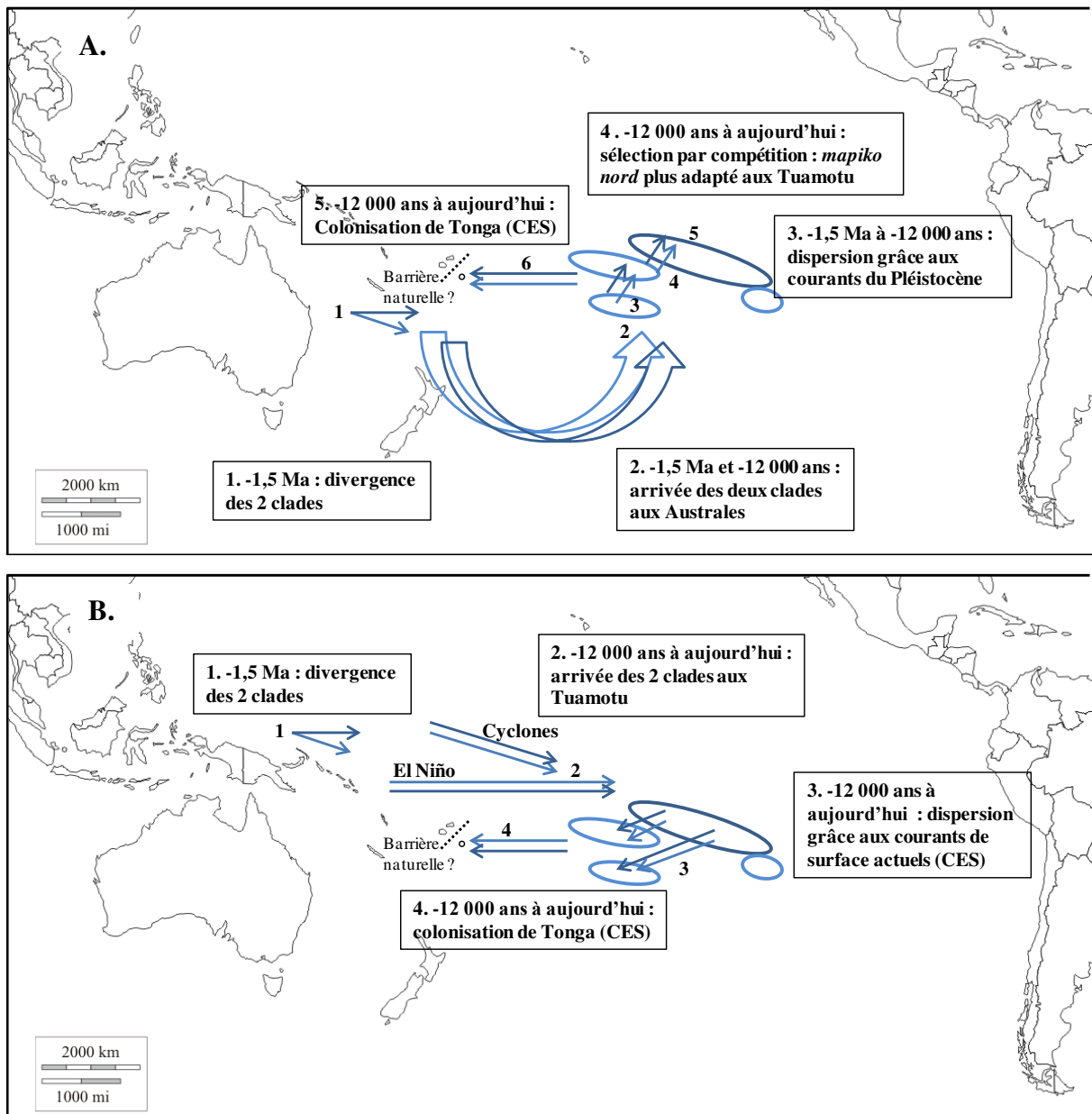


Figure 106. Schéma représentant l'hypothèse 1 de la colonisation de la Polynésie française par les deux clades de *T. maxima*. A. Colonisation entre -1,5 Ma et -12 000 ans. B. Colonisation entre -12 000 ans et aujourd'hui. En bleu clair : *mapiko sud*, en bleu foncé : *mapiko nord*.

Toutefois, on constate que la diversité génétique est plus importante dans le clade *mapiko sud* que dans le clade *mapiko nord*, indiquant soit qu'il diverge plus rapidement soit qu'il est en expansion démographique plus importante soit qu'il est arrivé avant le clade *mapiko nord*.

1.1.2 Hypothèse 2 : arrivée d'un haplotype fondateur unique en Polynésie française

L'espèce *T. maxima* est apparue il y a 10 Ma, certainement dans la région équivalente à l'Indo-Pacifique actuel, il a donc fallu du temps avant qu'elle arrive jusqu'en Polynésie française. Les courants marins liés aux épisodes de régression marine du Pliocène et du Pléistocène (Figure 103) ont pu permettre l'arrivée d'un haplotype fondateur unique au niveau des Australes, entre -3 et -1,5 Ma. Une activité volcanique intense était alors présente au niveau de la Société. Les éruptions volcaniques entraînent, entre autres, l'augmentation conséquente des températures de l'eau pendant de longues périodes, des dégagements de fumées et de soufre, entraînant de fortes perturbations de l'environnement. Ces perturbations localisées ont pu favoriser l'augmentation de la diversité génétique au sein des individus capables de survivre à de tels stress, expliquant ainsi l'apparition d'au moins un deuxième clade. Les deux clades auraient ensuite pu coloniser les autres archipels par le biais des courants de surface sud-nord présents à cette époque. Par la suite, les événements glaciaires, conduisant à la diminution du niveau de la mer (-100m par rapport à aujourd'hui) et à la perte des lagons, auraient décimé les populations lagunaires, entraînant un nœud d'étranglement où seul, les 2 clades actuels auraient pu survivre dans des niches distinctes ségrégeant les clades l'un au nord (Tuamotu) et l'autre au sud de la Polynésie française. La répartition actuelle serait donc le résultat de la recolonisation de ces 2 clades, l'un en partance du nord et l'autre du sud. Les deux clades auraient ensuite colonisé les îles Tonga, entre -12 000 ans et aujourd'hui, par le biais du Courant Equatorial Sud actuel (Figure 107).

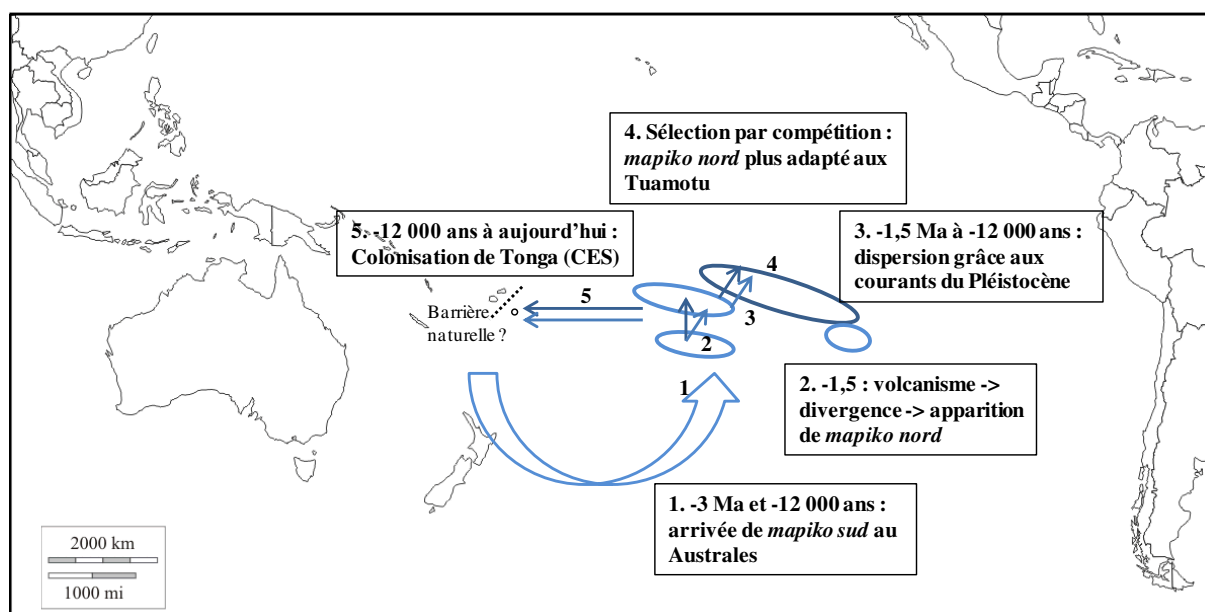


Figure 107. Schéma représentant l'hypothèse 2 de la colonisation de la Polynésie française par un clade de *T. maxima*. En bleu clair : *mapiko sud*, en bleu foncé : *mapiko nord*.

Des études sur la structure génétique des populations de *T. maxima* des îles situées à l'ouest de la Polynésie française (Cook Nord et Sud, Kiribati, Samoa, Wallis et Futuna, etc) devraient fournir des informations permettant de préciser si les bécotiers sont arrivés en Polynésie française par le nord (aux Tuamotu, cf 1.1.1 Hypothèse 1) ou par le sud (aux Australes, cf 1.1.2 Hypothèse 2). En effet, l'étude de séquences d'ADNm *COI* de bécotiers provenant de ces régions permettrait de savoir si les clades *mapiko sud* et *mapiko nord* y sont présents, fournissant ainsi des informations sur le chemin parcouru par les bécotiers jusqu'en Polynésie française, ainsi que sur le lieu de la divergence.

I.2 Faible structure génétique des bécotiers en PF

Les populations de bécotiers de Polynésie française présentent une faible structuration au regard de l'Indo-Pacifique, indiquant un flux de gènes important malgré une grande aire de répartition. Cependant, la connectivité mise en évidence lors de notre étude semble être en majorité perpendiculaire aux courants marins actuels, indiquant l'impact d'autres facteurs environnementaux permettant la dissémination des larves de bécotiers, ou bien l'influence d'évènements passés qui a définie la structure génétique observée aujourd'hui.

Durant le Pleistocène (de -2,6 Ma à -12 000 ans), la fréquence des variations du niveau marin a augmenté de façon significative (Woodruff, 2003). Lors des derniers pics de glaciation, il y a 21 000 ans, le niveau marin de la région Indo-Pacifique a diminué jusqu'à -120 m sous le niveau marin actuel (Bard *et al.*, 1996; Dickinson, 2004), et a entraîné l'assèchement partiel ou complet de la plupart des lagons. Dans l'Indo-Pacifique central la régression a fait émerger des bandes de terre, ce qui a entraîné un isolement de certaines populations pendant plusieurs années, créant un schéma génétique très contrasté encore observable aujourd'hui (Benzie, 1998). Des différences génétiques significatives observées chez la palourde *Ruditapes philippinarum* en mer de Chine ont été attribuée à l'isolement de mers marginales au nord ouest du Pacifique au Pleistocène (Mao *et al.*, 2011). Des signes d'extinctions locales ou des réductions de la taille des populations (Arnaud-Haond *et al.*, 2003) ainsi que des signes de goulots d'étranglement et d'effets fondateurs récents (Arnaud-Haond *et al.*, 2003) ont été observés chez *Pinctada margaritifera* en Polynésie française. La synchronicité de ces phénomènes avec les fluctuations du niveau marin lors de la dernière glaciation (Arnaud-Haond *et al.*, 2003) a été évoquée.

En Polynésie française, cet évènement a probablement entraîné des extinctions locales ou des réductions de la taille des populations de bécotiers. Il y a 11 500 ans, la fonte des glaces a

entraîné une augmentation du niveau de la mer jusqu'à plus d'un mètre par rapport au niveau actuel, puis le niveau de la mer a diminué pendant 1 500 ans, jusqu'à revenir au niveau actuel (Pirazzoli, 1986). Les signes de goulots d'étranglement récents et d'effets fondateurs chez les populations de *P. margaritifera* de Polynésie française ont été reliés aux fluctuations du niveau marin durant la dernière période glaciaire (Arnaud-Haond *et al.*, 2003). Comme pour cette espèce, la structure génétique des bénitiers peut aussi être expliquée par une importante diminution de populations, voire même une extinction, qui aurait eu lieu durant les derniers épisodes glaciaires, suivis par des réinvasions successives depuis le Pacifique ouest, une au nord et l'autre au sud de la Polynésie française, ou bien par la présence de deux « niches fondatrices » distinctes, une aux Tuamotu et l'autre aux Australes. Une étude plurispécifique (Fauvelot *et al.*, 2003) a montré l'importance d'intégrer la stabilité géologique des populations, en particulier pour les espèces vivant dans les espaces lagunaires qui ont été réduits ou ont disparu lors de la dernière période glaciaire. Même si contrairement à de nombreux bivalves qui peuplent les lagons de Polynésie française, le bénitier n'est pas exclusivement lagunaire, les individus retrouvés sur la pente externe sont à de très faible densité, montrant leur fragilité de persistance dans ces conditions.

La large répartition géographique des deux clades montre qu'ils ne sont pas inféodés à une zone géographique particulière puisqu'ils sont présents presque partout en Polynésie française, contrairement à ce qui a été observé dans la région Indo-Pacifique et à l'ouest du Pacifique (DeBoer *et al.*, 2014; Nuryanto et Kochzius, 2009). L'intégrité génétique des espèces vivant dans des habitats fractionnés dépend de nombreux facteurs, incluant leurs capacités de dispersion et les courants océaniques (Watson *et al.*, 2011). Ces derniers ont certainement grandement contribué à l'histoire génétique des bénitiers en Polynésie française. Dans notre étude, la fréquence de chacun des deux clades a montré un gradient Nord/Sud opposé, suggérant que des courants opposés peuvent être utilisés pour les migrations dans l'hypothèse des niches fondatrices, ou bien qu'un clade est en train de supplanter l'autre. Le groupe des Tuamotu de l'Est représente les îles génétiquement les plus isolées, connectées seulement avec le groupe d'îles Tuamotu nord. Ce dernier groupe présente une forte connectivité avec l'île de Moorea, qui correspond avec les courants marins de surface nord-est/sud-ouest (*cf* Partie III, I.1.4). Au vu de ces données, *T. maxima mapiko nord* pourrait s'étendre sur toute la Polynésie française, depuis le nord vers le sud. La forte connectivité observée entre les Australes et les Gambier peut également être expliquée par les courants de surface actuels. En revanche, la forte connectivité présente entre les archipels de la Société et des Gambier, les archipels de la Société et des

Australes, ne peut être expliquée par les courants marins. Ces flux de gènes perpendiculaires aux courants actuels ont déjà été observés dans le Pacifique centre et ouest, aussi bien chez *T. maxima* (Benzie et Williams, 1997) que chez *T. gigas*, *T. derasa* et *P. margaritifera*. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer une telle observation. La première serait que les modèles spatiaux de fréquence génique reflèteraient les épisodes de dispersion du passé, au moment où le niveau marin était au plus bas, et ces modèles n'auraient pas été modifiés par la dispersion ultérieure, engendrée par la circulation océanique actuelle. La seconde serait que l'inversion des courants durant les événements climatiques exceptionnels tels qu'El Niño ou La Niña (Martinez *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2011) permettrait d'expliquer cette connectivité. Enfin, la troisième implique les cyclones et des tempêtes tropicales qui ont balayé les îles de la Polynésie française, dont la fréquence est bien plus importantes au niveau des archipels de la Société, des Australes, et des Gambier qu'au niveau des Tuamotu (Figure 108). Cette dernière hypothèse permet d'avancer le rôle clé d'évènements climatiques exceptionnels et ponctuels sur la dissémination des larves, et donc sur la connectivité entre les populations de bécotiers des différents archipels (R. Canavesio *et al.*, in prep).

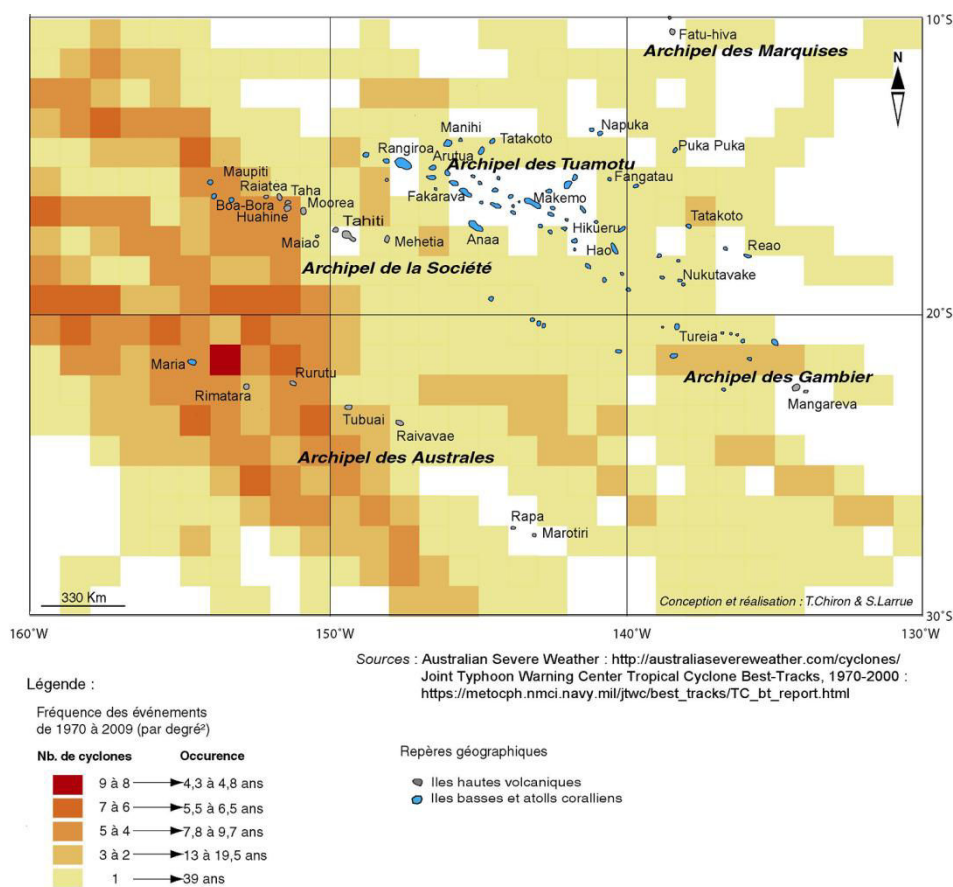


Figure 108. Carte de la fréquence de passage des tempêtes tropicales et des cyclones observés entre 1970 et 2009 en Polynésie française. (D'après Larrue et Charion, 2010)

I.3 Dispersion et plans de gestion de la ressource en bénitiers

La dispersion des espèces marines est de plus en plus étudiée dans le cadre du maintien de la biodiversité et dans un but de protection des espèces menacées (Bay *et al.*, 2008; Planes *et al.*, 2009; Saenz-Agudelo *et al.*, 2009). De plus, connaître la dynamique des populations et l'évolution de ces espèces dans leur environnement permet d'appréhender leur capacité à répondre face aux modifications naturelles ou anthropiques du milieu (Lemer, 2010). Les espèces vivant dans un habitat fragmenté, comme les bénitiers présents en Polynésie française, sont constituées d'entités interconnectées dont l'intégrité génétique dépend de leurs capacités de migration (Alleaume-Benharira *et al.*, 2006). Les habitats fragmentés amènent généralement à une dispersion limitée et une faible connectivité chez de nombreuses espèces (Coulon *et al.*, 2004; Haag *et al.*, 2010; Quéméré *et al.*, 2010; Vos *et al.*, 2001), ce qui est contraire à la forte connectivité mise en évidence dans notre étude entre les populations de bénitiers présentes en Polynésie française, malgré la surface océanique importante occupée par les 4 archipels qui possèdent des bénitiers.

La description et la mesure de la diversité génétique sont des préalables indispensables à la définition de stratégies de gestion des ressources. La connectivité inter-populations est importante pour la conservation. La diversité génétique intraspécifique dans les populations naturelles a été identifiée comme une priorité majeure pour la conservation (Desalle et Amato, 2004). Les informations fournies par nos résultats peuvent être utilisées par les institutions responsables de la gestion et protection de l'environnement marin, telle que la Direction des Ressources Marines et Minières de Polynésie française. Ainsi la mise en place et l'amélioration des plans de gestion de *T. maxima* en Polynésie française peuvent s'appuyer sur diverses études locales telles que l'état des stocks de bénitiers (Anonyme 2006; Salvat, 1972; Andréfouët *et al.* 2005; Gilbert *et al.* 2005, 2006, 2007), l'état des lieux de leur diversité génétique (cette thèse), l'analyse de la prédation en fonction de la teinte du bénitier et du substrat sur lequel il a été transplanté (Dubousquet, 2011) et la mise au point de modèles permettant d'évaluer les meilleures stratégies de gestion de la ressource (Van Wynsberge *et al.*, 2013). L'expérience de certains pays dans la transplantation de bénitiers (Gomez & Mingo-Licuanan, 2006) ainsi que les dernières avancées techniques, telles que la mise au point d'une méthode de recrutement réalisée directement sur le substrat naturel (Waters *et al.*, 2013), sont également à prendre en considération, notamment le danger lié aux transplantations de bénitiers d'un site à un autre. En effet, d'après nos résultats sur la distribution des clades *mapiko sud* et *mapiko nord* et la connectivité entre les populations de bénitiers des différents archipels (*cf* Partie III, I.1.4), il serait

préférable d'effectuer les transplantations au sein même de l'archipel des Tuamotu, ou entre les archipels de la Société, des Australes et des Gambier.

II. Réponse de *T. maxima* au stress thermique

II.1 Le rôle des *Symbiodinium* dans la réponse au stress thermique chez

T. maxima

La méthode utilisée pour observer les *Symbiodinium* du manteau n'a pas permis d'observer une diminution de ces symbiontes dans le manteau. Les *Symbiodinium* présentent par contre des signes de nécrose. Ils doivent donc nécessairement diminuer en nombre lors de l'augmentation de la température, comme c'est le cas chez les coraux. Les populations de *Symbiodinium* sont en mauvais état lorsque la température de 32°C est maintenue pendant 5 jours, alors que les bécitiers ne montrent pas de signe extérieur de stress. La résistance des bécitiers au stress thermique semble donc liée à une capacité d'adaptation intrinsèque à l'hôte, et indépendante des populations de *Symbiodinium* présentes. Des éléments de réponse quant au(x) facteur(s) intrinsèques aux bécitiers, liés à l'expression génique et aux modifications des métabolites présents, ont été mis en évidence lors de l'étude de la réponse transcriptomique et métabolomique de *T. maxima* au stress thermique, réalisée lors de cette thèse.

II.2 Réponses transcriptomique et métabolomique de *T. maxima* au stress thermique

L'augmentation de température entraîne une perturbation de la structure des constituants cellulaires. Les protéines peuvent être dénaturées et devenir non fonctionnelles. Les acides gras peuvent être modifiés suite à l'agitation engendrée par l'augmentation de la température, et perturber ainsi la structure membranaire (Los et Murata, 2004). De même, la structure de macromolécules telles que l'ADN ou l'ARN peut être modifiée, et perturber ainsi la transcription et la traduction. L'ensemble de ces modifications entraînerait une perturbation de la structure des cellules et des différentes voies métaboliques. Les EAOs augmentent et l'homéostasie est perturbée. L'ensemble de ces modifications entraîne des réactions des différents composants et compartiments de la cellule, qui peut amener à l'acclimatation ou à la mort si la situation perdure.

Les résultats obtenus lors de notre étude métabolomique font état d'une augmentation de la proportion des AG à courte chaîne carbonée et d'une augmentation des AG insaturés lors du

stress thermique (Figure 109). L'augmentation de la proportion en AG à chaîne plus courte serait consécutive à l'augmentation des EAOs survenue au cours du stress thermique. L'augmentation de la proportion d'AG insaturés semble liée à une désaturation accrue, comme celle observée chez l'huître (Waldock et Holland, 1984), des AG des bénitiers. Elle pourrait être attribuée au rôle antioxydant de ces AG, qui captent les EAOs et limitent leurs effets nocifs sur les constituants cellulaires. Cette modification constituerait ainsi une voie de réponse précoce au stress thermique. Les données de transcriptomique suggèrent qu'une voie de réponse plus tardive est mise en route, puisqu'une augmentation de l'expression de gènes qui codent des enzymes de biosynthèse des lipides et d'élongation des acides gras est observée. Cette synthèse *de novo* et cette élongation des AG permettraient d'augmenter les proportions d'AG à longues chaînes et, à terme, ces modifications permettraient de diminuer le point de fusion des triglycérides formés par les AG et de maintenir la fluidité membranaire lors du stress thermique. Les proportions de nombreux métabolites secondaires apolaires varient également au cours du stress. Ces métabolites comprennent certainement des caroténoïdes et des MAAs, qui jouent respectivement un rôle antioxydant et un rôle de photoprotection. La caractérisation des principaux métabolites mis à jour en CLPH-SM devrait ainsi apporter des informations sur les voies et activités perturbées (accumulation d'intermédiaire) et sur les voies non encore caractérisées (nouveaux métabolites).

De notre analyse transcriptomique, on peut faire ressortir quelques modifications majeures de l'expression des gènes lors du stress (Figure 109). Il est vraisemblable que la modification observée de l'expression de gènes qui entraînent la diminution de la prolifération cellulaire (telles certaines protéines kinases), inhibe la croissance et la reproduction, pour que l'énergie soit plus utilisée pour la réponse cellulaire au stress thermique. L'augmentation de l'instabilité des protéines, inhérente à l'augmentation de température, entraîne ici une augmentation des voies de stabilisation des protéines (par exemple, augmentation des protéines chaperonnes, augmentation des protéines de dé-ubiquitination) et de la voie de destruction des protéines. La première permet certainement aux protéines qui sont légèrement modifiées de rester fonctionnelles, la seconde de détruire les protéines dénaturées par la chaleur qui ne sont plus fonctionnelles. Cependant, une diminution de certaines protéines constitutives du protéasome est également observée, et permet peut être de limiter la quantité de protéines détruites, et ainsi de conserver un stock de protéines qui pourraient redevenir fonctionnelles dans le cas où le stress ne durerait pas. De même que pour les protéines, l'ARN semble être pris en charge par les protéines exosomales dont les gènes sont surexprimés lors du stress

thermique. La perturbation de l'homéostasie cellulaire semble également entraîner la mise en route des voies qui permettent d'augmenter les potentialités de maintenir des conditions viables pour la cellule comme celle de la régulation ionique. Enfin, l'augmentation d'EAOs au sein de la cellule semble entraîner la mise en route de plusieurs voies de détoxification (par exemple le cytochrome P450 et la voie des pentoses phosphate). De plus, afin de maintenir les voies de signalisation, essentielles pour les cellules car une absence de signal conduit à la mort cellulaire, la surexpression des gènes participant à la transduction de signaux (tel que les protéines G), observée lors de notre étude, pourrait également augmenter la résistance des cellules à l'augmentation de température, en préservant les capacités de communications perturbées.

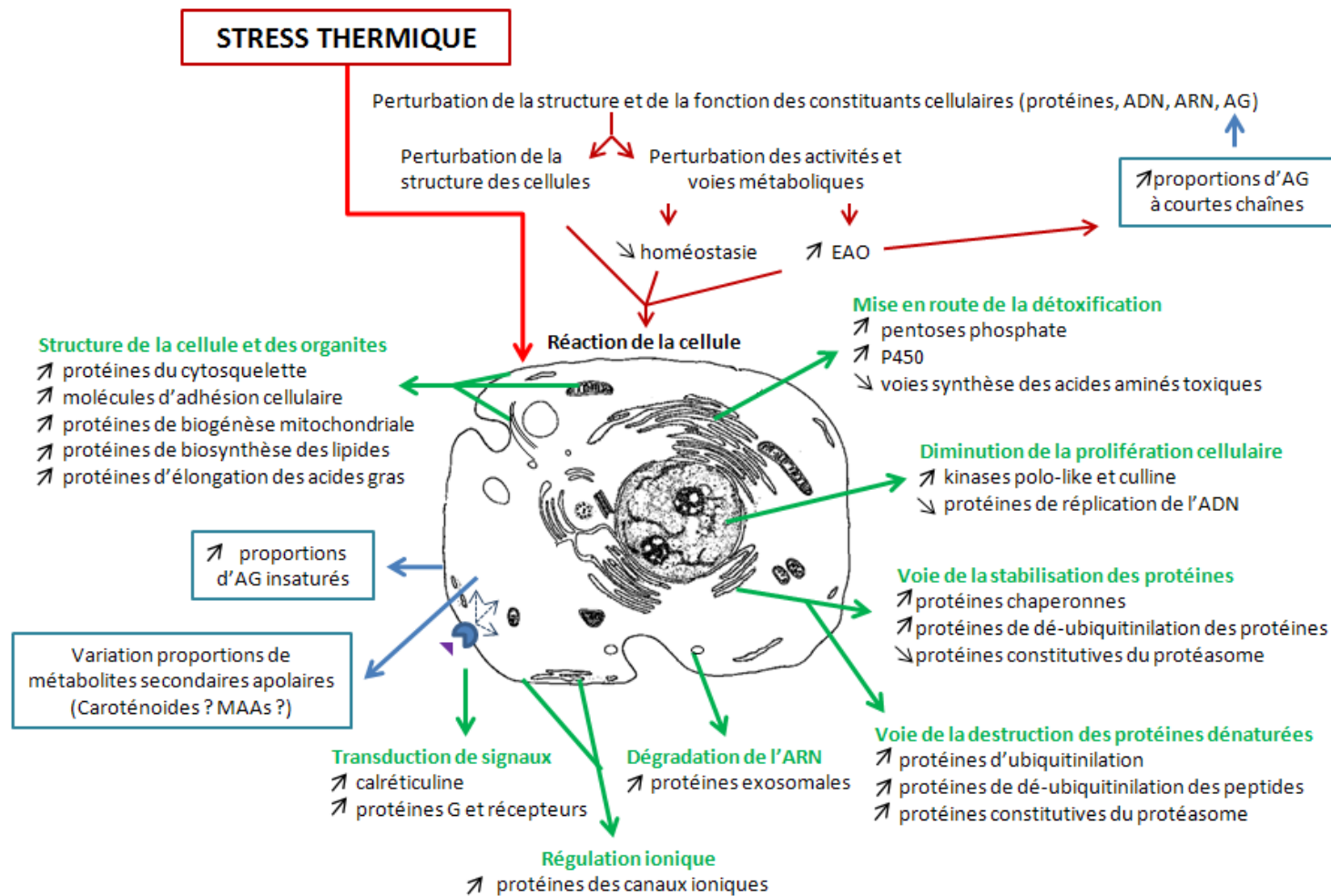


Figure 109. Schéma récapitulatif des voies cellulaires et protéines associées activées ou inhibées lors du stress thermique chez *Tridacna maxima*. En vert : résultats obtenus grâce aux données transcriptomiques, en bleu : résultats obtenus grâce aux données métabolomiques. EAO : Espèces actives d'oxygène, P450 : cytochrome P450, AG : acides gras, MAAs : acides aminés *mycosporine-like*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La résilience et la survie des écosystèmes dans leur ensemble est capitale pour la sauvegarde de la biodiversité. Des fonctions écologiques uniques, comme une acclimatation exceptionnelle à certaines modifications de l'environnement, sont particulièrement vulnérables à l'érosion de la biodiversité (Mouillot *et al.*, 2013). Ces fonctions pourraient s'avérer cruciales pour le fonctionnement des écosystèmes en cas de perturbations et changements environnementaux majeurs. Cette thèse apporte à la fois des données nouvelles sur la diversité génétique d'une espèce emblématique et en danger présente dans les lagons de Polynésie française, le bénitier, mais également des connaissances sur sa réaction à un stress environnemental actuel lié au réchauffement climatique. Elle s'inscrit donc dans une démarche de préservation de la biodiversité de nos lagons à plus ou moins long terme, et donc une gestion durable des ressources naturelles de la Polynésie française.

Les approches holistiques dites « omiques » ouvrent de nouvelles perspectives d'études biologiques et permettent de comprendre les règles fondamentales qui déterminent les mécanismes d'adaptation d'une cellule ou d'un organisme vivant aux changements environnementaux. L'utilisation d'approches intégrées incluant génomique, transcriptomique et métabolomique devrait aboutir à une meilleure connaissance d'organismes marins sentinelles tel le bénitier, et contribuer ainsi à une meilleure compréhension de : i/ leur système biologique, ii/ l'impact de facteurs anthropiques et environnementaux sur ces organismes, iii/ leurs capacités de résilience face à ces perturbations (Joyce & Palsson, 2006). Ceci est particulièrement important dans le cas d'organismes filtreurs où cette approche holistique fournit des outils permettant de déterminer avec précision les voies cellulaires perturbées par les stress environnementaux (Campos *et al.*, 2012). Une meilleure compréhension de ces processus devrait favoriser l'optimisation des réponses à donner aux préoccupations concernant les plans de gestion des ressources marines actuelles, ainsi que celles du futur. L'étude réalisée dans le contexte de cette thèse représente une des premières études métabolomiques réalisée chez un bivalve, et la première chez un bénitier. La caractérisation des métabolites mis en évidence dans cette étude est la suite indispensable à ce travail et fournira notamment des informations sur les métabolites impliqués dans la réponse au stress thermique chez les bivalves, dont certains pourraient servir de nouveaux biomarqueurs de stress. De plus, cette caractérisation aboutira certainement à la découverte de métabolites inconnus présentant des

propriétés intéressantes. Les métabolites purifiés et caractérisés seront donc utilisés pour effectuer des tests biologiques (cytotoxicité, effet sur la prolifération cellulaire, etc).

Nous avons pour la première fois chez le bénitier, mise en évidence un lien direct entre l'expression des gènes (augmentation des désaturases, augmentation des protéines d'élongation des acides gras, augmentation des protéines de biosynthèse des lipides) et les variations de certains métabolites (diminution des acides gras insaturés augmentation des AG à longue chaîne). La suite de ces travaux en métabolomique sera confrontée aux résultats obtenus grâce à la transcriptomique pour mieux appréhender les mécanismes mis en jeu au niveau moléculaire lors de la biosynthèse des métabolites produits sous l'impact du stress au réchauffement, et ceci sous l'impact des différentes expressions géniques recensées. Cette approche intégrée transcriptome/métabolome permet de faire un lien direct entre les métabolites produits lors du stress et l'expression génique modifiée lors de ce même stress et valide ainsi l'implication de ces voies dans la réponse au stress.

A terme, les résultats des réponses transcriptomiques et métabolomiques au stress thermique mis en évidence chez les bénitiers lors de ces travaux de thèse seront comparés aux résultats obtenus chez les coraux (Collaboration P. Wecker, Dr en biologie moléculaire en post-doc au CRIOBE). Les similarités de réponses valideront d'un degré supplémentaire l'universalité et le rôle de certaines voies cellulaires dans la réponse au stress thermique ; certaines voies de réponses au stress thermique, spécifiques des bénitiers ou des coraux, devraient permettre de préciser pourquoi les bénitiers sont plus résistants au stress thermique que les coraux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrego, D., Van Oppen, M. J. H., & Willis, B. L. (2009). Highly infectious symbiont dominates initial uptake in coral juveniles. *Molecular Ecology*, 18(16), 3518–31. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04275.x
- Ackman, R. G. (1989). *Marine Biogenic Lipids, Fats & Oils, Volume 1* (p. 472). CRC Press. Retrieved http://books.google.com/books/about/Marine_Biogenic_Lipids_Fats_Oils.html?id=6USkLHs_vwEC&pgis=1
- Ackman R.G. (1983). Fatty acid metabolism of bivalves. *World Mariculture Society*, 2, 358–376.
- Addessi, L. (2001). Giant clam bleaching in the lagoon of Takapoto atoll (French Polynesia). *Coral Reefs*, 19(3), 220–220. doi:10.1007/PL00006957
- Alleaume-Benharira, M., Pen, I. R., & Ronce, O. (2006). Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(1), 203–15. doi:10.1111/j.1420-9101.2005.00976.x
- Ambariyanto & Hoegh-Guldberg, O. (1999). Influence of field-based nutrient enrichment on the photobiology of the giant clam *Tridacna maxima*. *Marine biology*, 133(4), 659–664. Retrieved from http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=Refine&qid=27&SID=P2T92i9CxiM24EG8H3H&page=1&doc=1
- Andréfouët, S., Dutheil, C., Menkes, C. E., Bador, M., & Lengaigne, M. (2014). Mass mortality events in atoll lagoons : environmental control and increased future vulnerability. *Global Change Biology*. doi:10.1111/gcb.12699
- Andréfouët, S., Gilbert, A., Yan, L., Remoissenet, G., Payri, C., & Chancerelle, Y. (2005). The remarkable population size of the endangered clam *Tridacna maxima* assessed in Fangatau Atoll (Eastern Tuamotu, French Polynesia) using in situ and remote sensing data. *ICES Journal of Marine Science*, 62(6), 1037–1048. Retrieved from <http://www.documentation.ird.fr/hor/PAR00005232>
- Andréfouët, S., Van Wynsberge, S., Gaertner-Mazouni, N., Menkès, C., Gilbert, A., & Remoissenet, G. (2013). Climate variability and massive mortalities challenge giant clam conservation and management efforts in French Polynesia atolls. *Biological Conservation*, 160, 190–199. Retrieved from <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010060477>
- Andréfouët, S. Van Wynsberge, C. Fauvelot, A. W. B. & G. R. (2014). Significance of new records of *Tridacna squamosa* Lamarck, 1819, in the Tuamotu and Gambier Archipelagos (French Polynesia). *Molluscan Research*, 10.
- Anisimova, M., Bielawski, J. P., & Yang, Z. (2001). Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 18(8), 1585–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470850>
- Anonyme, 2002. Etude du marché local du bénitier. Rapport de synthèse – Pacific Consulting Tahiti Polynésie française. 42p.
- Anonyme, 2006. Te Ve'a Tautai. La lettre de la pêche N°19. 16p. http://www.peche.pf/IMG/pdf/Lettre_de_la_peche_no19bassedef-2.pdf

- Anonyme, 2010. Analyse écorégionale marine de Polynésie française. Composante I, Projet IAI. Planification de la conservation de la biodiversité marine. Agence des aires marines protégées. <http://www.aires-marines.fr/Documentation/AER-Polynesie-française>.
- Anonyme, 2013. Etude de marché sur l'exportation de bénitiers de culture de Polynésie française. Rapport de synthèse. Hambrey Consulting. <http://www.peche.pf/spip.php?rubrique213>
- Arif, C., Daniels, C., Bayer, T., Banguera-Hinestroza, E., Barbrook, A., Howe, C. J., Voolstra, C. R. (2014). Assessing *Symbiodinium* diversity in scleractinian corals via next-generation sequencing-based genotyping of the ITS2 rDNA region. *Molecular Ecology*. doi:10.1111/mec.12869
- Arnaud-Haond, S., Bonhomme, F., & Blanc, F. (2003). Large discrepancies in differentiation of allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3), 388–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635839>
- Awise, J. C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species* (p. 447). Harvard University Press. Retrieved from <http://books.google.com/books/about/Phylogeography.html?id=1A7YWH4M8FUC&pgis=1>
- Baillie, B. K., Belda-Baillie, C. A., Silvestre, V., Sison, M., Gomez, A. V., Gomez, E. D., & Monje, V. (2000). Genetic variation in *Symbiodinium* isolates from giant clams based on random-amplified-polymorphic DNA (RAPD) patterns. *Marine Biology*, 136(5), 829–836. doi:10.1007/s002270000290
- Baillie, B. K., Monje, V., Silvestre, V., Sison, M., & Belda-Baillie, C. A. (1998). Allozyme electrophoresis as a tool for distinguishing different zooxanthellae symbiotic with giant clams. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1409), 1949–1956. doi:10.1098/rspb.1998.0525
- Baker, A. C. (2003). Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 661–689. doi:10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132417
- Banaszak, T., A., LaJeunesse, T. C., & Trench, R. K. (2000). The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249(2), 219–233. doi:10.1016/S0022-0981(00)00192-1
- Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R. J., & Rosenberg, E. (2003). Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Current Microbiology*, 46(6), 418–22. doi:10.1007/s00284-002-3912-5
- Bard, E., Hamelin, B., Arnold, M., Montaggioni, L., Cabioch, G., Faure, G., & Rougerie, F. (1996). Deglacial sea-level record from Tahiti corals and the timing of global meltwater discharge. *Nature*, 382(6588), 241–244. doi:10.1038/382241a0
- Bay, L. K., Caley, M. J. M., & Crozier, R. H. (2008). Meta-population structure in a coral reef fish demonstrated by genetic data on patterns of migration, extinction and re-colonisation. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 248. doi:10.1186/1471-2148-8-248
- Belda-Baillie, C. a., Sison, M., Silvestre, V., Villamor, K., Monje, V., Gomez, E. D., & Baillie, B. K. (1999). Evidence for changing symbiotic algae in juvenile tridacnids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(2), 207–221. doi:10.1016/S0022-0981(99)00079-9

- Bell, J. D., Howell, B. R., Moskness, E., & Svasand, T. (1999). Restocking of giant clams: progress, problems and potential. In *Stock enhancement and sea ranching. Papers from the First International Symposium on Stock Enhancement and Sea Ranching, Bergen, Norway, 8-11 September 1997*. (pp. 437–452). Fishing News Books Ltd., Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20000105557.html;jsessionid=EFA3818298D4887B1DB22BDF69C29B78>
- Benzie, J. (JAH). (1998). *Genetic structure of marine organisms and SE Asian biogeography*. Backhuys Publishers. Retrieved from <http://epubs.aims.gov.au/handle/11068/1409>
- Benzie, J. (JAH), & Williams, S. (ST). (1997). Genetic structure of giant clam (*Tridacna maxima*) populations in the west Pacific is not consistent with dispersal by present-day ocean currents. Retrieved from <http://epubs.aims.gov.au/handle/11068/2866>
- Benzie, J. A. H., & Ballment, E. (1994). Genetic differences among black-lipped pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) populations in the western Pacific. *Aquaculture*, 127(2-3), 145–156. doi:10.1016/0044-8486(94)90421-9
- Benzie, J. A. H., & Williams, S. T. (1992). Genetic structure of giant clam (*Tridacna maxima*) populations from reefs in the Western Coral Sea. *Coral Reefs*, 11(3), 135–141. doi:10.1007/BF00255467
- Berge, J.-P., & Barnathan, G. (2005). *Marine Biotechnology I*. (R. Ulber & Y. Gal, Eds.) *Marine Biotechnology I* (Vol. 96, pp. 49–125). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. doi:10.1007/b135780
- Berkelmans, R., & van Oppen, M. J. H. (2006). The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a “nugget of hope” for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 273(1599), 2305–12. doi:10.1098/rspb.2006.3567
- Berteaux-Lecellier, V., Picard, M., Thompson-Coffe, C., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., & Simonet, J. M. (1995). A nonmammalian homolog of the PAF1 gene (Zellweger syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell*, 81(7), 1043–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600573>
- Birky, C. W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*, 35, 125–48. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090231
- Bjerkeng, B., Hertzberg, S., & Liaaen-Jensen, S. (1993). Carotenoids in food chain studies—V. Carotenoids of the bivalves *Modiolus modiolus* and *Pecten maximus*—structural, metabolic and food chain aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 106(2), 243–250. doi:10.1016/0305-0491(93)90295-G
- Bonhomme, F., & Planes, S. (2000). Some Evolutionary Arguments about what maintains the Pelagic Interval in Reef Fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 59(4), 365–383. doi:10.1023/A:1026508715631
- Bouchet, P., Rocroi, J.-P., Bieler, R., Carter, J. G., & Coan, E. V. (2010). Nomenclator of Bivalve Families with a Classification of Bivalve Families. *Malacologia*, 52(2), 1–184. doi:10.4002/040.052.0201
- Breton, S., Beaupré, H. D., Stewart, D. T., Hoeh, W. R., & Blier, P. U. (2007). The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *Trends in Genetics : TIG*, 23(9), 465–74. doi:10.1016/j.tig.2007.05.011

- Briggs, J. C. (2007). Marine longitudinal biodiversity: causes and conservation. *Diversity and Distributions*, 13(5), 544–555. doi:10.1111/j.1472-4642.2007.00362.x
- Brown, B., Dunne, R., Goodson, M., & Douglas, A. (2002). Experience shapes the susceptibility of a reef coral to bleaching. *Coral Reefs*, 21(2), 119–126. doi:10.1007/s00338-002-0215-z
- Buck, B. (2002). Effect of increased irradiance and thermal stress on the symbiosis of *Symbiodinium microadriaticum* and *Tridacna gigas*. *Aquatic Living Resources*, 15(2), 107–117. doi:10.1016/S0990-7440(02)01159-2
- Calum H.P. (1992). *The Giant Clam: an Ocean Culture Manual*.
- Campbell, C. A., Valentine, J. W., & Ayala, F. J. (1975). High genetic variability in a population of *Tridacna maxima* from the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 33(4), 341–345. doi:10.1007/BF00390572
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., & Cristobal, S. (2012). Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4346–59. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.027
- Canapa, a, Marota, I., Rollo, F., & Olmo, E. (1999). The small-subunit rRNA gene sequences of venerids and the phylogeny of bivalvia. *Journal of Molecular Evolution*, 48(4), 463–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079284>
- Carballeira, N. M. (2008). New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. *Progress in Lipid Research*, 47(1), 50–61. doi:10.1016/j.plipres.2007.10.002
- Carlos, A. A., Baillie, B. K., Kawachi, M., & Maruyama, T. (1999). Phylogenetic position of symbiodinium (dinophyceae) isolates from tridacnids (bivalvia), cardiids (bivalvia), a sponge (porifera), a soft coral (anthozoa), and a free-living strain. *Journal of Phycology*, 35(5), 1054–1062. doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3551054.x
- Carotenoids Handbook G. Britton, S. Liaaen-Jenson and H. Pfander (Eds), Compiled by A. Z. Mercadante and E. S. Egeland, Birkhauser Verlag, Basle, Switzerland, 2004. (2004). *Free Radical Research*, 38(8), 885–885. doi:10.1080/10715760410001727849
- Carre, M., Sachs, J. P., Purca, S., Schauer, A. J., Braconnot, P., Falcon, R. A., Lavallee, D. (2014). Holocene history of ENSO variance and asymmetry in the eastern tropical Pacific. *Science*, 345(6200), 1045–1048. doi:10.1126/science.1252220
- Chang, S. S., Prizelin, B. B., & Trench, R. K. (1983). Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. *Marine Biology*, 76(3), 219–229. doi:10.1007/BF00393021
- Chapman, R. W., Mancina, A., Beal, M., Veloso, A., Rathburn, C., Blair, A., Sanger, D. (2011). The transcriptomic responses of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to environmental conditions. *Molecular Ecology*, 20(7), 1431–49. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05018.x
- Chetoui, I., I. R., & Cafsi, and M. El. (2010). *Composition biochimique d'un mollusque bivalve : mactra corallina du golfe de tunis (KALAAT EL ANDALOUS)* (p. 475).
- Chioccare, F., Misuraca, G., Novellino, E. & Prota, G. (1979). Occurrence of two new mycosporine like amino acids mytilins A and B in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Tetrahedron Lett*, 34(3181), 2.

- Chu, F.-L. E., & Greaves, J. (1991). Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 110(2), 229–236. doi:10.1007/BF01313708
- CITES, 2004a. *Tridacna crocea*. AC22 Doc. 10.2 Annex 8c. URL: <http://www.cites.org/eng/com/AC/22/E22-10-2-A8c.pdf>.
- CITES, 2004b. *Tridacna derasa*. AC22 Doc. 10.2 Annex 8d. URL: <http://www.cites.org/eng/com/ac/22/E22-10-2-A8d.pdf>.
- CITES, 2004c. *Tridacna gigas*. AC22 Doc. 10.2 Annex 8e. URL: <http://www.cites.org/eng/com/aC/22/E22-10-2-A8e.pdf>.
- CITES, 2004d. *Tridacna squamosa*. AC22 Doc. 10.2 Annex 8g. URL: www.cites.org/eng/com/AC/22/E22-10-2-A8g.pdf.
- CITES, 2008. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora Appendices I, II and III. Pp.32. URL: www.cites.org/eng/app/E-Jul01.pdf.
- Clarke, P. J., Komatsu, T., Bell, J. D., Lasi, F., Oengpepa, C. P., & Leqata, J. (2003). Combined culture of *Trochus niloticus* and giant clams (Tridacnidae): benefits for restocking and farming. *Aquaculture*, 215(1-4), 123–144. doi:10.1016/S0044-8486(02)00222-3
- Correa, A. M. S., McDonald, M. D., & Baker, A. C. (2009). Development of clade-specific Symbiodinium primers for quantitative PCR (qPCR) and their application to detecting clade D symbionts in Caribbean corals. *Marine Biology*, 156(11), 2403–2411. doi:10.1007/s00227-009-1263-5
- Coulon, A., Cosson, J. F., Angibault, J. M., Cargnelutti, B., Galan, M., Morellet, N., Hewison, A. J. M. (2004). Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology*, 13(9), 2841–50. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02253.x
- Cowen, R. K., & Sponaugle, S. (2009). Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, 1, 443–66. doi:10.1146/annurev.marine.010908.163757
- Cuvier, G. L. C. F. D. (1795). Second mémoire sur l'organisation et les rapports des animaux à sang blanc, dans lequel on traite de la structure des Mollusques et de leur division en ordres, lu à la Société d'histoire naturelle de Paris, le 11 Prairial, an III.—Magazin Encyclopédique. ou *Journal des Sciences, des Lettres et des Arts*, 2, 433-449.
- Dahlhoff, E. P. (2004). Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annual Review of Physiology*, 66, 183–207. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.114509
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., & Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(2), 85–96. doi:10.1016/j.tibs.2008.11.002
- Dame, R. F. (2011). *Ecology of Marine Bivalves: An Ecosystem Approach, Second Edition* (Vol. 3, p. 283). CRC Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=98zeNrvTWuEC&pgis=1>
- Darius, H. T., Martin, P. M. V., Grimont, P. A. D., & Dauga, C. (2000). Small subunit rDNA sequence analysis of symbiotic dinoflagellates from seven scleractinian corals in a tahitian lagoon. *Journal of Phycology*, 36(5), 951–959. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99088.x

- De Moreno, J. E. A., Pollero, R. J., Moreno, V. J., & Brenner, R. R. (1980). Lipids and fatty acids of the mussel (*Mytilus Platensis* d'Orbigny) from South Atlantic waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 48(3), 263–276. doi:10.1016/0022-0981(80)90081-7
- De'ath, G., Fabricius, K. E., Sweatman, H., & Puotinen, M. (2012). The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), 17995–9. doi:10.1073/pnas.1208909109
- DeBoer, T., Baker, A., Erdmann, M., Jones, P., & Barber, P. (2012). Patterns of *Symbiodinium* distribution in three giant clam species across the biodiverse Bird's Head region of Indonesia. *Marine Ecology Progress Series*, 444(Baker 2003), 117–132. doi:10.3354/meps09413
- DeBoer, T. S., Naguit, M. R. A., Erdmann, M. V, Ablan-Lagman, M. C. a, Carpenter, K. E., Toha, A. H. a, & Barber, P. H. (2014a). Concordance between phylogeographic and biogeographic boundaries in the Coral Triangle: conservation implications based on comparative analyses of multiple giant clam species. *Bulletin of Marine Science*, 90(1), 277–300. doi:10.5343/bms.2013.1003
- DeBoer, T. S., Naguit, M. R. A., Erdmann, M. V, Ablan-Lagman, M. C. A., Carpenter, K. E., Toha, A. H. A., & Barber, P. H. (2014b). Concordant phylogenetic patterns inferred from mitochondrial and microsatellite DNA in the giant clam *Tridacna crocea*. *Bulletin of Marine Science*, 90(1), 301–329. doi:10.5343/bms.2013.1002
- DeBoer, T. S., Subia, M. D., Erdmann, M. V, Kovitvongsa, K., & Barber, P. H. (2008). Phylogeography and limited genetic connectivity in the endangered boring giant clam across the Coral Triangle. *Conservation Biology : The Journal of the Society for Conservation Biology*, 22(5), 1255–66. doi:10.1111/j.1523-1739.2008.00983.x
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y., & Samain, J.-F. (2005). Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 140(4), 460–70. doi:10.1016/j.cbpb.2005.02.009
- DeSalle R, Amato G. 2004. The expansion of conservation genetics. *Nat Rev Genet* 5(9):702-712
- Dickinson, W. R. (2004). Impacts of eustasy and hydro-isostasy on the evolution and landforms of Pacific atolls. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 213(3-4), 251–269. doi:10.1016/j.palaeo.2004.07.012
- Donders, T. H., Wagner-Cremer, F., & Visscher, H. (2008). Integration of proxy data and model scenarios for the mid-Holocene onset of modern ENSO variability. *Quaternary Science Reviews*, 27(5-6), 571–579. doi:10.1016/j.quascirev.2007.11.010
- Drevon B. & Schmit J., M. (1964). La réaction sulfophosphovanillique dans l'étude des lipides sériques, pp. 173–178.
- Dubinsky, Z., Stambler, N., Ben-Zion, M., McCloskey, L. R., Muscatine, L., & Falkowski, P. G. (1990). The Effect of External Nutrient Resources on the Optical Properties and Photosynthetic Efficiency of *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 239(1295), 231–246. doi:10.1098/rspb.1990.0015
- Dubousquet V. (2011). *Biodiversité du bénitier et de son symbiote en Polynésie française : approche écologique et génétique*. Rapport de Master 2, MNHN Paris.

- Dunn, S. R., Thomason, J. C., Le Tissier, M. D. A., & Bythell, J. C. (2004). Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration. *Cell Death and Differentiation*, *11*(11), 1213–22. doi:10.1038/sj.cdd.4401484
- Dunn, S., Thomason, D. J., Tissier, D. M. Le, & Bythell, P. J. (2002). Detection of cell death activity during experimentally induced bleaching of the symbiotic sea anemone *Aiptasia* sp. Retrieved from http://eprint.ncl.ac.uk/pub_details2.aspx?pub_id=6963
- Dupon J.-F., Bonvallot J., Vigneron, P., Gay J.-C., Morhange C., Ollier C. (1993). Atlas de la Polynésie française. 112 planches et notices. Orstom Edition
- Elder, D. (1998). *Personal report to earthwatch*. UNDP consultant, Maldives.
- Elfwing T., Plantman P., (2001). Responses to temperature, heavy metal and sediment stress by the giant clam *T. squamosa*. In *Vol 34* (pp. 239–248).
- Ellis, D. I., Dunn, W. B., Griffin, J. L., Allwood, J. W., & Goodacre, R. (2007). Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics*, *8*(9), 1243–66. doi:10.2217/14622416.8.9.1243
- Excoffier, L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, *13*(4), 853–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012760>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*(3), 564–7. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fabina, N. S., Putnam, H. M., Franklin, E. C., Stat, M., & Gates, R. D. (2012). Transmission mode predicts specificity and interaction patterns in coral-*Symbiodinium* networks. *PloS One*, *7*(9), e44970. doi:10.1371/journal.pone.0044970
- Fabbri, E., Franzellitti, S., & Valbonesi, P. (2008). HSP expression in bivalves. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AV20120131363>
- Fariás, A. (2003). Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. *Aquaculture*, *228*(1-4), 289–305. doi:10.1016/S0044-8486(03)00272-2
- Fauvelot, C., Bernardi, G., & Planes, S. (2003). Reductions in the mitochondrial DNA diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from Holocene sea-level change. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, *57*(7), 1571–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12940362>
- Fitt WK. (1985). Effect of different strains of the zooxanthella {*Symbiodinium*} {*microadriaticum*} on growth and survival of their Coelenterate and Molluscan hosts. In *Proc 5th Int Coral Reef Symp. Tahiti* (pp. 6:131–136).
- Fleischmann, E. M. (1989). The measurement and penetration of ultraviolet radiation into tropical marine water. *Limnology and Oceanography*, *34*(8), 1623–1629. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=5248235>

- Freites, L., Fernández-Reiriz, M. J., & Labarta, U. (2002). Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *132*(2), 453–461. doi:10.1016/S1096-4959(02)00057-X
- Fu, Y. X. (1997). Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, *147*(2), 915–925. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/147/2/915.abstract>
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, *18*(22), 4541–50. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x
- Gaquereel, E., Hervé, C., Labrière, C., Boyen, C., Potin, P., & Salaün, J.-P. (2007). Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* in response to methyljasmonate. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1771*(5), 565–75. doi:10.1016/j.bbaliip.2007.02.007
- Gardner, D., & Riley, J. P. (2009). The component fatty acids of the lipids of some species of marine and freshwater molluscs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *52*(04), 827. doi:10.1017/S0025315400040571
- Gardner, J., Boesche, C., Meyer, J., & Wood, A. (2012). Analyses of DNA obtained from shells and brine-preserved meat of the giant clam *Tridacna maxima* from the central Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, *453*, 297–301. doi:10.3354/meps09625
- Gilbert, A., Andréfouët, S., Yan, L., & Remoissenet, G. (2006). The giant clam *Tridacna maxima* communities of three French Polynesia islands: comparison of their population sizes and structures at early stages of their exploitation. *Ices Journal of Marine Science*, *63*(9), 1573–1589. Retrieved from <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010037737>
- Gilbert, A., Planes, S., Andréfouët, S., Friedman, K., & Remoissenet, G. (2007). First observation of the giant clam *Tridacna squamosa* in French Polynesia: a species range extension. *Coral Reefs*, *26*(2), 229–229. doi:10.1007/s00338-007-0218-x
- Gilbert, A., Yan, L., Remoissenet, G., Andrefouët, S., Payri, C., & Chancerelle, Y. (2005). Extraordinarily high giant clam density under protection in Tatakoto atoll (Eastern Tuamotu archipelago, French Polynesia). *Coral Reefs*, *24*(3). Retrieved from <http://www.documentation.ird.fr/hor/PAR00000646>
- Gillham, N. W. (1994). Transmission and compatibility of organelle genomes. *Organelle Genes and Genomes*, 147–268.
- Giribet, G., Okusu, A., Lindgren, A. R., Huff, S. W., Schrödl, M., & Nishiguchi, M. K. (2006). Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: monoplacophorans are related to chitons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(20), 7723–8. doi:10.1073/pnas.0602578103
- Giribet, G., & Wheeler, W. C. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data, *121 Invertebrate Biology* 271 – 324 (2002).
- Gomez, E. D., & Mingo-Licuanan, S. S. (2006). Achievements and lessons learned in restocking giant clams in the Philippines. *Fisheries Research*, *80*(1), 46–52. doi:10.1016/j.fishres.2006.03.017

- Gordon, B. R., & Leggat, W. (2010). *Symbiodinium*-invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Marine Drugs*, 8(10), 2546–68. doi:10.3390/md8102546
- Griffiths, D., Winsor, H., & Luongvan, T. (1992). Iridophores in the Mantle of Giant Clams. *Australian Journal of Zoology*, 40(3), 319. doi:10.1071/ZO9920319
- Guest, J. R., Todd, P. A., Goh, E., Sivalonganathan, B. S., & Reddy, K. P. (2008). Can giant clam (*Tridacna squamosa*) populations be restored on Singapore's heavily impacted coral reefs? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18(5), 570–579. doi:10.1002/aqc.888
- Haag, T., Santos, A. S., Sana, D. A., Morato, R. G., Cullen, L., Crawshaw, P. G., Eizirik, E. (2010). The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Molecular Ecology*, 19(22), 4906–21. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04856.x
- Hall, I. R., McCave, I. N., Shackleton, N. J., Weedon, G. P., & Harris, S. E. (2001). Intensified deep Pacific inflow and ventilation in Pleistocene glacial times. *Nature*, 412(6849), 809–12. doi:10.1038/35090552
- Harland, W.B., Armstrong, A.V., Cox, Craig L.E., Smith A.G., S. D. . (1990). A geologic time scale. *Cambridge University Press*.
- Harpending, H. C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66(4), 591–600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8088750>
- Harper, E. M., Dreyer, H., & Steiner, G. (2006). Reconstructing the Anomalodesmata (Mollusca: Bivalvia): morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 148(3), 395–420. doi:10.1111/j.1096-3642.2006.00260.x
- Harris, P. (1995). *Observations et mécanismes de la crise dystrophique de 1994 dans le lagon de l'atoll d'Hikueru (archipel des Tuamotu, Polynésie Française)* (p. 25). Centre ORSTOM de Tahiti. Retrieved from http://books.google.com/books/about/Observations_et_mécanismes_de_la_crise.html?id=L-raAAAAMAAJ&pgis=1
- Harzhauser, M., Mandic, O., Piller, W. E., Reuter, M., & Kroh, A. (2008). Tracing back the origin of the Indo-Pacific mollusc fauna: basal tridacninae from the oligocene and miocene of the sultanate of Oman. *Palaeontology*, 51(1), 199–213. doi:10.1111/j.1475-4983.2007.00742.x
- Hauser, L. (2001). Dispersal. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt and J. D. Nichols (eds). Oxford University Press. pp. 452. Price £24.95, paperback. ISBN: 0-19-850659-7. *Heredity*, 87(4), 508–508. doi:10.1046/j.1365-2540.2001.0963a.x
- Hay, M. E. (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200(1-2), 103–134. doi:10.1016/S0022-0981(96)02659-7
- Heled, J., & Drummond, A. J. (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27(3), 570–80. doi:10.1093/molbev/msp274
- Helmuth, B., Broitman, B., Blanchette, C., Gilman, S., Halpin, P., Harley, C., Strickland, D. Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal zone: implications for climate change, 76 *Ecological Monographs* (2006).

- Hennige, S. J., Suggett, D. J., Warner, M. E., McDougall, K. E., & Smith, D. J. (2009, March 1). Photobiology of *Symbiodinium* revisited: bio-physical and bio-optical signatures. *Coral Reefs*. Springer. Retrieved from <http://repository.essex.ac.uk/966/>
- Heuertz, M., Hausman, J.-F., Hardy, O. J., Vendramin, G. G., Frascaria-Lacoste, N., & Vekemans, X. (2004). Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 58(5), 976–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212379>
- Hieronymus, B., Rosenthal, H., & Saint-paul, U. (2002). Effect of increased irradiance and thermal stress on the symbiosis of *Symbiodinium microadriaticum* and *Tridacna gigas*, 15, 107–117.
- Hildenbrand, A. (2002, January 1). *Etude géologique de l'île volcanique de Tahiti-Nui (Polynésie française) : évolution morphostructurale, géochimique et hydrologique*. Paris 11, Orsay. Retrieved from <http://www.theses.fr/2002PA112303>
- Hoegh-Guldberg, O. (1996). Nutrient enrichment and the ultrastructure of zooxanthellae from the giant clam *Tridacna maxima*. *Marine Biology*, 125(2), 359–363. doi:10.1007/BF00346316
- Hoegh-Guldberg, O., & Smith, G. (1989). Influence of the population density of zooxanthellae and supply of ammonium on the biomass and metabolic characteristics of the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*. *Marine Ecology Progress Series*, 57(2), 173–186. doi:10.3354/meps057173
- Holmes, E., Wilson, I. D., & Nicholson, J. K. (2008). Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell*, 134(5), 714–7. doi:10.1016/j.cell.2008.08.026
- Huang, H., Dong, Z., Huang, L., Yang, J., Di, B., Li, Y., Zhang, C. (2011). Latitudinal variation in algal symbionts within the scleractinian coral *Galaxea fascicularis* in the South China Sea. *Marine Biology Research*, 7(2), 208–211. doi:10.1080/17451000.2010.489616
- Huang, X.-D., Zhao, M., Liu, W.-G., Guan, Y.-Y., Shi, Y., Wang, Q., He, M.-X. (2013). Gigabase-scale transcriptome analysis on four species of pearl oysters. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 15(3), 253–64. doi:10.1007/s10126-012-9484-x
- Huber, M., E. (2011). *Tridacna* (Chametrachea) *costata* Roa-quiaoit, Kochzius, Jantzen, Al-zibdah et Richter from the Red Sea, a junior synonym of *Tridacna squamosina* STURANY, 1899 (Bivalvia, Tridacnidae). *Ann. Naturhist. Mus. Wien*.
- Huelsken, T., Keyse, J., Liggins, L., Penny, S., Treml, E. A., & Riginos, C. (2013). A novel widespread cryptic species and phylogeographic patterns within several giant clam species (Cardiidae: *Tridacna*) from the Indo-Pacific Ocean. *PloS One*, 8(11), e80858. doi:10.1371/journal.pone.0080858
- Hughes, T. P., Baird, A. H., Bellwood, D. R., Card, M., Connolly, S. R., Folke, C., Roughgarden, J. (2003). Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5635), 929–33. doi:10.1126/science.1085046
- Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C., & Bonhomme, F. (2000). Variable microsatellites in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics*, 31(1), 71–72. doi:10.1111/j.1365-2052.2000.579-5.x
- Imhoff, J. F., Labes, A., & Wiese, J. (2011). Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnology Advances*, 29(5), 468–82. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.03.001

- Isay, S. V., & Busarova, N. G. (1984). Study on fatty acid composition of marine organisms—I. Unsaturated fatty acids of Japan Sea invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 77(4), 803–810. doi:10.1016/0305-0491(84)90316-X
- Ishikura, M., Kato, C., & Maruyama, T. (1997). UV-absorbing substances in zooxanthellate and azooxanthellate clams. *Marine Biology*, 128(4), 649–655. doi:10.1007/s002270050131
- IUCN (2014). The IUCN red list of threatened species. v.2004.3. www.iucnredlist.org
- Ivanina, A. V., Taylor, C., & Sokolova, I. M. (2009). Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 91(3), 245–54. doi:10.1016/j.aquatox.2008.11.016
- Ivanina, A. V., Kurochkin, I. O., Leamy, L., & Sokolova, I. M. (2012). Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation. *The Journal of Experimental Biology*, 215(Pt 18), 3142–54. doi:10.1242/jeb.071357
- Jameson, S. C. (1976, July 1). Early Life History of the Giant Clams *Tridacna crocea* Lamarck, *Tridacna maxima* (Roding), and *Hippopus hippopus* (Linnaeus). University of Hawaii Press. Retrieved from <http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/10783>
- Jarque, S., Prats, E., Olivares, A., Casado, M., Ramón, M., & Piña, B. (2014). Seasonal variations of gene expression biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* cultured populations: Temperature, oxidative stress and reproductive cycle as major modulators. *Science of The Total Environment*, 499, 363–372. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.064
- Jeong, H. J., Lee, S. Y., Kang, N. S., Yoo, Y. Du, Lim, A. S., Lee, M. J., LaJeunesse, T. C. (2014). Genetics and morphology characterize the dinoflagellate *Symbiodinium voratum*, n. sp., (Dinophyceae) as the sole representative of *Symbiodinium* Clade E. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61(1), 75–94. doi:10.1111/jeu.12088
- Johnston, M., Yellowlees, D., & Gilmour, I. (1995). Carbon Isotopic Analysis of the Free Fatty Acids in a Tridacnid-Algal Symbiosis: Interpretation and Implications for the Symbiotic Association. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 260(1359), 293–297. doi:10.1098/rspb.1995.0094
- Jones, G. P., Planes, S., & Thorrold, S. R. (2005). Coral reef fish larvae settle close to home. *Current Biology: CB*, 15(14), 1314–8. doi:10.1016/j.cub.2005.06.061
- Joseph, J. D. (1982). Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. *Progress in Lipid Research*, 21(2), 109–153. doi:10.1016/0163-7827(82)90002-9
- Joyce, A. R., & Palsson, B. Ø. (2006). The model organism as a system: integrating “omics” data sets. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(3), 198–210. doi:10.1038/nrm1857
- Karlson, R. H., Cornell, H. V., & Hughes, T. P. (2004). Coral communities are regionally enriched along an oceanic biodiversity gradient. *Nature*, 429(6994), 867–70. doi:10.1038/nature02685
- Kawashima, H., & Ohnishi, M. (2003). Fatty Acid Compositions of Various Tissue Lipids in the Marine Bivalves, *Megangulus venulosus* and *Megangulus zyonoensis*, from Coastal Waters of Hokkaido, Northern Japan. *Journal of Oleo Science*, 52(6), 309–315. doi:10.5650/jos.52.309

- Kell, D. B. (2004). Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 296–307. doi:10.1016/j.mib.2004.04.012
- Kenchington, E. L., Patwary, M. U., Zouros, E., & Bird, C. J. (2006). Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve mollusc (*Placopecten magellanicus*). *Molecular Ecology*, 15(7), 1781–96. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02915.x
- Kicklighter, C. E., Kamio, M., Nguyen, L., Germann, M. W., & Derby, C. D. (2011). Mycosporine-like amino acids are multifunctional molecules in sea hares and their marine community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11494–9. doi:10.1073/pnas.1103906108
- Kinzie, Robert A., I., Takayama, M., Santos, S. R., & Coffroth, M. A. (2001). The Adaptive Bleaching Hypothesis: Experimental Tests of Critical Assumptions. *Biol. Bull.*, 200(1), 51–58. Retrieved from <http://www.biolbull.org/content/200/1/51.abstract>
- Klumpp, D. W. & J. S. Lucas, 1994. Nutritional ecology of the giant clams, *Tridacna tevoroa* and *T. derasa* from Tonga: influence of light on filter-feeding and photosynthesis. *Marine Ecology Progress Series*, 107: 147–156.
- Kochzius, M., & Nuryanto, A. (2008). Strong genetic population structure in the boring giant clam, *Tridacna crocea*, across the Indo-Malay Archipelago: implications related to evolutionary processes and connectivity. *Molecular Ecology*, 17(17), 3775–87. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03803.x
- Kocot, K. M., Cannon, J. T., Todt, C., Citarella, M. R., Kohn, A. B., Meyer, A., Halanych, K. M. (2011). Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature*, 477(7365), 452–6. doi:10.1038/nature10382
- Kraffe, E., 2003. Etude de la spécificité du cardiolipide et des plasmalogènes chez les mollusques bivalves; apport des méthodes chromatographiques. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 243.
- Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, 67, 225–57. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635
- Kurihara, T., Yamashita, H., Yamada, H., Inoue, K., Iwai, K., & Koike, K. (2012). Probability of Symbiosis Establishment by Giant Clams with Fresh and Cultured *Symbiodinium* Isolated from Various Host Animals. *Journal of Shellfish Research*, 31(4), 977–987. doi:10.2983/035.031.0410
- Ladd, H. S. (1934). Geology of Viti Levu, Fiji. *Bulletin of the Bernice P. Bishop Museum*, 119(1-263), 185.
- Ladner, J. T., Barshis, D. J., & Palumbi, S. R. (2012). Protein evolution in two co-occurring types of *Symbiodinium*: an exploration into the genetic basis of thermal tolerance in *Symbiodinium* clade D. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 217. doi:10.1186/1471-2148-12-217
- Lajeunesse, T. (TC), Bhagooli, R. (R), Hidaka, M. (M), DeVantier, L. (LM), Done, T. (TJ), Schmidt, G. (GW), Hoegh-Guldberg, O. (O). (2004). Closely-related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance within coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. Retrieved from <http://epubs.aims.gov.au/handle/11068/6729>
- LaJeunesse, T. C. (2001). Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *symbiodinium* using the *ITS* region: in search of a “species” level marker. *Journal of Phycology*, 37(5), 866–880. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.01031.x

- Lajeunesse, T. C. (2005). “Species” radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3), 570–81. doi:10.1093/molbev/msi042
- LaJeunesse, T. C., Pettay, D. T., Sampayo, E. M., Phongsuwan, N., Brown, B., Obura, D. O., Fitt, W. K. (2010). Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host-symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Journal of Biogeography*, 37(5), 785–800. doi:10.1111/j.1365-2699.2010.02273.x
- LaJeunesse, T., Thornhill, D., Cox, E., Stanton, F., Fitt, W., & Schmidt, G. (2004). High diversity and host specificity observed among symbiotic dinoflagellates in reef coral communities from Hawaii. *Coral Reefs*. doi:10.1007/s00338-004-0428-4
- LaJeunesse TC, Loh WKW, van Woesik R, Hoegh-Guldberg O, Schmidt GW, and F. W. (2003). Low *symbiodinium* diversity in southern great barrier reef corals relativ to those of the Caribbean. *Limnology and Oceanography*, 48(5), 2046–2054. Retrieved from http://www.aslo.org/lo/toc/vol_48/issue_5/2046.html
- Lajeunesse, T.C. (2002). Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology*, 141(2), 387–400. doi:10.1007/s00227-002-0829-2
- Lang, R. P., Bayne, C. J., Camara, M. D., Cunningham, C., Jenny, M. J., & Langdon, C. J. (2009). Transcriptome profiling of selectively bred Pacific oyster *Crassostrea gigas* families that differ in tolerance of heat shock. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 11(5), 650–68. doi:10.1007/s10126-009-9181-6
- Larrue, S., & Chiron, T. (2010). Les îles de Polynésie française face à l’aléa cyclonique. *Vertigo*, (Volume 10 Numéro 3). doi:10.4000/vertigo.10558
- Laubarède, E. K. de. (2003). *Etude de la spécificité du cardiolipide et des plasmalogènes chez les mollusques bivalves: Apport des méthodes chromatographiques* (p. 243). Retrieved from http://books.google.com/books/about/Etude_de_la_spécificité_du_cardiolipid.html?id=xUhAXwAACAAJ&pgis=1
- Launey, S., Ledu, C., Boudry, P., Bonhomme, F., & Naciri-Graven, Y. (2002). Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by Microsatellite polymorphism. *The Journal of Heredity*, 93(5), 331–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12547921>
- Laurent, V., Planes, S., & Salvat, B. (2002). High variability of genetic pattern in giant clam (*Tridacna maxima*) populations within French Polynesia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77(2), 221–231. doi:10.1046/j.1095-8312.2002.00106.x
- Lecointre, G., Le Guyader, G. (2001). Classification phylogénétique du vivant. 544p. Belin. 3^{ème} édition.
- Lefebvre, C. (2011). La gestion intégrée côtière et marine : nouvelles perspectives. *Vertigo*, (Hors-série 9). doi:10.4000/vertigo.10985
- Leggat, W., Buck, B. H., Grice, A., & Yellowlees, D. (2003). The impact of bleaching on the metabolic contribution of dinoflagellate symbionts to their giant clam host. *Plant, Cell and Environment*, 26(12), 1951–1961. doi:10.1046/j.0016-8025.2003.01111.x

- Leggat, W., Marendy, E. M., Baillie, B., Whitney, S. M., Ludwig, M., Badger, M. R., & Yellowlees, D. (2002). Dinoflagellate symbioses: strategies and adaptations for the acquisition and fixation of inorganic carbon. *Functional Plant Biology*, 29(3), 309–322. doi:10.1071/PP01202
- Lemer, S. (2010). *Connectivité génétique et histoire démographique de populations fragmentées : outils pour évaluer l'impact de l'aquaculture sur les populations sauvages de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* en Polynésie française*. Thèse de Doctorat. Ecole pratique des hautes études (EPHE) - CRIOBE
- Levins, R. (1968). *Evolution in Changing Environments: Some Theoretical Explorations* (p. 120). Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=fr&lr=&id=ZSVJ8pA1RFIC&pgis=1>
- Li, Q., Zhao X. (2013). Transcriptomic response to stress in marine bivalves. *ISJ*, 10:84-93
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. In *Laurentius Salvius: Holmiae* (p. 824).
- Lockwood, B. L., Sanders, J. G., & Somero, G. N. (2010). Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. *The Journal of Experimental Biology*, 213(Pt 20), 3548–58. doi:10.1242/jeb.046094
- Loh, W., Carter, D., & Hoegh-Guldberg, O. (1998). Diversity of zooxanthellae from scleractinian corals of one tree island (The great barrier reef).. Retrieved August 08, 2014, from [http://www.reef.edu.au/ohg/hg/papers/loh et al.pdf](http://www.reef.edu.au/ohg/hg/papers/loh%20et%20al.pdf)
- Loh, W., Loi, T., Carter, D., & Hoegh-Guldberg, O. (2001). Genetic variability of the symbiotic dinoflagellates from the wide ranging coral species *Seriatopora hystrix* and *Acropora longicyathus* in the Indo-West Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 222, 97–107. doi:10.3354/meps222097
- Los, D. A., & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666(1-2), 142–57. doi:10.1016/j.bbamem.2004.08.002
- Lowe, W. H., & Allendorf, F. W. (2010). What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology*, 19(15), 3038–51. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04688.x
- Lucas, J. S. (1994). The biology, exploitation, and mariculture of giant clams (Tridacnidae). *Reviews in Fisheries Science*, 2(3), 181–223. doi:10.1080/10641269409388557
- Lucas J.S. (1991). A new species of giant clam (Tridacnidae) from Fiji and Tonga, 1–8.
- Lucas JS. (1988). Giant clams: description, distribution and life history. In L. J. Copland JW (Ed.), *Giant clam in Asia and the Pacific* (pp. 21–32). Canberra.
- Mao, Y., Gao, T., Yanagimoto, T., & Xiao, Y. (2011). Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2), 171–181. doi:10.1016/j.jembe.2011.06.002
- Maoka, T. (2009). Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 191–5. doi:10.1016/j.abb.2008.10.019
- Maoka, T. (2011). Carotenoids in marine animals. *Marine Drugs*, 9(2), 278–93. doi:10.3390/md9020278

- Maoka, T., Akimoto, N., Murakoshi, M., Sugiyama, K., & Nishino, H. (2010). Carotenoids in clams, *Ruditapes philippinarum* and *Meretrix petechialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5784–8. doi:10.1021/jf1006243
- Maoka, T., Akimoto, N., Tsushima, M., Komemushi, S., Mezaki, T., Iwase, F., Sakagami, Y. (2011). Carotenoids in marine invertebrates living along the Kuroshio current coast. *Marine Drugs*, 9(8), 1419–27. doi:10.3390/md9081419
- Maoka, T., Akimoto, N., Yim, M.-J., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2008). New C37 skeletal carotenoid from the clam, *Paphia amabilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 12069–72. doi:10.1021/jf802717b
- Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., & Akimoto, N. (2007). Characterization of fucoxanthin and fucoxanthinol esters in the Chinese surf clam, *Macra chinensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1563–7. doi:10.1021/jf063139n
- Martinez, E., Ganachaud, A., Lefevre, J., & Maamaatuaiahutapu, K. (2009). Central South Pacific thermocline water circulation from a high-resolution ocean model validated against satellite data: Seasonal variability and El Niño 1997–1998 influence. *Journal of Geophysical Research*, 114(C5), C05012. doi:10.1029/2008JC004824
- Martinez, E., Maamaatuaiahutapu, K., & Taillandier, V. (2009). Floating marine debris surface drift: convergence and accumulation toward the South Pacific subtropical gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 58(9), 1347–55. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.04.022
- Maruyama, T., & Heslinga, G. A. (1997). Fecal discharge of zooxanthellae in the giant clam *Tridacna derasa*, with reference to their in situ growth rate. *Marine Biology*, 127(3), 473–477. doi:10.1007/s002270050035
- Matsuno, T. (2001). Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Science*, 67(5), 771–783. doi:10.1046/j.1444-2906.2001.00323.x
- Mayer, A. M. S., Glaser, K. B., Cuevas, C., Jacobs, R. S., Kem, W., Little, R. D., Shuster, D. E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(6), 255–65. doi:10.1016/j.tips.2010.02.005
- McDonagh, B., Tyther, R., & Sheehan, D. (2005). Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 73(3), 315–26. doi:10.1016/j.aquatox.2005.03.020
- McDonagh, B., Tyther, R., & Sheehan, D. (2006). Redox proteomics in the mussel, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 62 Suppl, S101–4. doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.001
- Menge, B. A., Chan, F., & Lubchenco, J. (2008). Response of a rocky intertidal ecosystem engineer and community dominant to climate change. *Ecology Letters*, 11(2), 151–62. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01135.x
- Mieog, J. C., Olsen, J. L., Berkelmans, R., Bleuler-Martinez, S. a, Willis, B. L., & van Oppen, M. J. H. (2009). The roles and interactions of symbiont, host and environment in defining coral fitness. *PloS One*, 4(7), e6364. doi:10.1371/journal.pone.0006364
- Mieog, J. C., Oppen, M. J. H., Cantin, N. E., Stam, W. T., & Olsen, J. L. (2007). Real-time PCR reveals a high incidence of *Symbiodinium* clade D at low levels in four scleractinian corals across

- the Great Barrier Reef: implications for symbiont shuffling. *Coral Reefs*, 26(3), 449–457. doi:10.1007/s00338-007-0244-8
- Mikkelsen, P. M., Bieler, R., Kappner, I., & Rawlings, T. A. (2006). Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 148(3), 439–521. doi:10.1111/j.1096-3642.2006.00262.x
- Milan, M., Coppe, A., Reinhardt, R., Cancela, L. M., Leite, R. B., Saavedra, C., Bargelloni, L. (2011). Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. *BMC Genomics*, 12, 234. doi:10.1186/1471-2164-12-234
- Miura, D., Fujimura, Y., Yamato, M., Hyodo, F., Utsumi, H., Tachibana, H., & Wariishi, H. (2010). Ultrahighly sensitive in situ metabolomic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors. *Analytical Chemistry*, 82(23), 9789–96. doi:10.1021/ac101998z
- Moco, S., Vervoort, J., Bino, R. J., De Vos, R. C. H., & Bino, R. (2007). Metabolomics technologies and metabolite identification. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(9), 855–866. doi:10.1016/j.trac.2007.08.003
- Montaser, R., & Luesch, H. (2011). Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Medicinal Chemistry*, 3(12), 1475–89. doi:10.4155/fmc.11.118
- Muller-Parker G., D. C. (1997). Interactions between Corals and their Symbiotic Algae. *Life and Death of Coral Reefs*.
- Mumby, P. J., Chisholm, A., Edwards, C., Clark, E., Roark, S., Andrefouet, & J., Jaubert (2001). Unprecedented bleaching-induced mortality in *Porites* spp. at Rangiroa Atoll, French Polynesia. *Marine Biology*, 139(1), 183–189. doi:10.1007/s002270100575
- Muscatine, L. (1965). Symbiosis of hydra and algae—III. Extracellular products of the algae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 16(1), 77–92. doi:10.1016/0010-406X(65)90165-9
- Muscatine, L. (1967). Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and tridacna and its control by the host. *Science (New York, N.Y.)*, 156(3774), 516–9. doi:10.1126/science.156.3774.516
- Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Retrieved from <http://www.osti.gov/scitech/biblio/5943467>
- Neo, M., & Todd, P. (2012). Population density and genetic structure of the giant clams *Tridacna crocea* and *T. squamosa* on Singapore's reefs. *Aquatic Biology*, 14(3), 265–275. doi:10.3354/ab00400
- Nevo, E. (1978). Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theoretical Population Biology*, 13(1), 121–177. doi:10.1016/0040-5809(78)90039-4
- Newman, D. J., & Hill, R. T. (2006). New drugs from marine microbes: the tide is turning. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(7), 539–44. doi:10.1007/s10295-006-0115-2
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E. (1999). “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 29(11), 1181–9. doi:10.1080/004982599238047

- Nielsen, E. E., & Kenchington, E. (2001). A new approach to prioritizing marine fish and shellfish populations for conservation. *Fish and Fisheries*, 2(4), 328–343. doi:10.1046/j.1467-2960.2001.00055.x
- Norton, J. H., Prior, H. C., Baillie, B., & Yellowlees, D. (1995). Atrophy of the Zooxanthellal Tubular System in Bleached Giant Clams *Tridacna gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66(3), 307–310. doi:10.1006/jipa.1995.1106
- Norton, J. H., Shepherd, M. A., Long, H. M., & Fitt, W. K. (1992). The Zooxanthellal Tubular System in the Giant Clam. *Biol. Bull.*, 183(3), 503–506. Retrieved from <http://www.biolbull.org/content/183/3/503.short>
- Núñez-Acuña, G., Tapia, F. J., Haye, P. a., & Gallardo-Escárate, C. (2012). Gene expression analysis in *Mytilus chilensis* populations reveals local patterns associated with ocean environmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 420-421, 56–64. doi:10.1016/j.jembe.2012.03.024
- Nuryanto, a., & Kochzius, M. (2009). Highly restricted gene flow and deep evolutionary lineages in the giant clam *Tridacna maxima*. *Coral Reefs*, 28(3), 607–619. doi:10.1007/s00338-009-0483-y
- Olu-Le Roy, K., Cosel, R. von, Hourdez, S., Carney, S. L., & Jollivet, D. (2007). Amphi-Atlantic cold-seep Bathymodiolus species complexes across the equatorial belt. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 54(11), 1890–1911. doi:10.1016/j.dsr.2007.07.004
- Othman Ahmad Syukri Bin, Gideon H. S. Goh, P. A. T. (2010). The distribution and status of giant clams (family Tridacnidae) - a short review.pdf. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 58(1), 103–111. Retrieved from <http://rmbr.nus.edu.sg/rbz/biblio/58/58rbz103-111.pdf>
- Palumbi, S. R. (1992). Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology & Evolution*, 7(4), 114–8. doi:10.1016/0169-5347(92)90144-Z
- Palumbi, S. R. (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13(sp1), 146–158. doi:10.1890/1051-0761(2003)013[0146:PGDCAT]2.0.CO;2
- Paradis, M., & Ackman, R. G. (1977). Potential for employing the distribution of anomalous non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies. *Lipids*, 12(2), 170–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/846300>
- Passamonti, M., & Ghiselli, F. (2009). Doubly uniparental inheritance: two mitochondrial genomes, one precious model for organelle DNA inheritance and evolution. *DNA and Cell Biology*, 28(2), 79–89. doi:10.1089/dna.2008.0807
- Pawlowski, J., Holzmann, M., Fahrni, J. F., Pochon, X., & Lee, J. J. (2001). Molecular Identification of Algal Endosymbionts in Large Miliolid Foraminifera: 2. Dinoflagellates. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(3), 368–373. doi:10.1111/j.1550-7408.2001.tb00326.x
- Pernet, F., Gauthier-Clerc, S., & Mayrand, E. (2007). Change in lipid composition in eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) exposed to constant or fluctuating temperature regimes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 147(3), 557–65. doi:10.1016/j.cbpb.2007.03.009
- Pinzón, J. H., Devlin-Durante, M. K., Weber, M. X., Baums, I. B., & LaJeunesse, T. C. (2011). Microsatellite loci for *Symbiodinium* A3 (*S. fitti*) a common algal symbiont among Caribbean

- Acropora* (stony corals) and Indo-Pacific giant clams (*Tridacna*). *Conservation Genetics Resources*, 3(1), 45–47. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=23401576>
- Pirazzoli, P. A. (1986). Secular trends of relative sea-level (RSL) changes indicated by tide-gauge records. *J. Coast. Res.; (United States), SI:1*.
- Planes, S., Bonhomme, F., & Galzin, R. (1993). Genetic structure of *Dascyllus aruanus* populations in French Polynesia. *Marine Biology*, 117(4), 665–674. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=3963714>
- Planes, S., Chauvet, C., Baldwin, J., Bonvallot, J., Gabrie, C., Holthus, P., Galzin, R. (1993). Impact of tourism-related fishing on *Tridacna maxima* (Mollusca, Bivalvia) stocks in Bora-Bora lagoon (French Polynesia). *Atoll Research Bulletin*, 385, 1 – 13. Retrieved from <http://www.biodiversitylibrary.org/part/83149>
- Planes, S., & Fauvelot, C. (2002). Isolation by distance and vicariance drive genetic structure of a coral reef fish in the Pacific Ocean. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 56(2), 378–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11926506>
- Planes, S., Galzin, R., & Bonhomme, F. (1996). A genetic metapopulation model for reef fishes in oceanic islands: the case of the surgeonfish, *Acanthurus triostegus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 9(1), 103–117. doi:10.1046/j.1420-9101.1996.9010103.x
- Planes, S., Jones, G. P., & Thorrold, S. R. (2009). Larval dispersal connects fish populations in a network of marine protected areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5693–7. doi:10.1073/pnas.0808007106
- Planes, S. & Laurent, V. (2004). *Etude de la diversité génétique des bénitiers, Tridacna maxima, dans 7 îles de Polynésie française*. Rapport.
- Plazzi, F., & Passamonti, M. (2010). Towards a molecular phylogeny of Mollusks: bivalves' early evolution as revealed by mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 641–57. doi:10.1016/j.ympev.2010.08.032
- Plohl, M., Luchetti, A., Mestrović, N., & Mantovani, B. (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene*, 409(1-2), 72–82. doi:10.1016/j.gene.2007.11.013
- Pochon, X. (2001). *High Genetic Diversity and Relative Specificity Among Symbiodinium-like Endosymbiotic Dinoflagellates in Soritid Foraminiferans* (p. 160). Retrieved from http://books.google.com/books/about/High_Genetic_Diversity_and_Relative_Spec.html?id=8Wb_ZwEACAAJ&pgis=1
- Pochon, X., Garcia-Cuetos, L., Baker, A. C., Castella, E., & Pawlowski, J. (2007). One-year survey of a single Micronesian reef reveals extraordinarily rich diversity of *Symbiodinium* types in soritid foraminifera. *Coral Reefs*, 26(4), 867–882. doi:10.1007/s00338-007-0279-x
- Pochon, X., & Gates, R. D. (2010). A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 492–7. doi:10.1016/j.ympev.2010.03.040
- Pochon, X., Montoya-Burgos, J. I., Stadelmann, B., & Pawlowski, J. (2006). Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(1), 20–30. doi:10.1016/j.ympev.2005.04.028

- Pochon, X., Putnam, H. M., Burki, F., & Gates, R. D. (2012). Identifying and characterizing alternative molecular markers for the symbiotic and free-living dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *PLoS One*, 7(1), e29816. doi:10.1371/journal.pone.0029816
- Pollock, D. E. (1992). Palaeoceanography and Speciation in the Spiny Lobster Genus *Panulirus* in the Indo-Pacific. *Bulletin of Marine Science*, 51(2), 135–146. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1992/00000051/00000002/art00001>
- Putnam, H. M., Stat, M., Pochon, X., & Gates, R. D. (2012). Endosymbiotic flexibility associates with environmental sensitivity in scleractinian corals. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 279(1746), 4352–61. doi:10.1098/rspb.2012.1454
- Quéméré, E., Crouau-Roy, B., Rabarivola, C., Louis, E. E., & Chikhi, L. (2010). Landscape genetics of an endangered lemur (*Propithecus tattersalli*) within its entire fragmented range. *Molecular Ecology*, 19(8), 1606–21. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04581.x
- Reid, R. G., Fankboner, P., & Brand, D. (1984). Studies on the physiology of the giant clam *Tridacna gigas* linné—I. Feeding and digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 78(1), 95–101. doi:10.1016/0300-9629(84)90099-9
- Richard. (1982). *Mollusques lagunaires et récifaux de Polynésie française - Inventaire faunistique, Bionomie, Bilan quantitatif, Croissance, Production*.
- Richard Lydekker. (1896). A Geographical History of Mammals. *Cambridge University Press*, p. 400. Cambridge.
- Richter, C., Roa-Quiaoit, H., Jantzen, C., Al-Zibdah, M., & Kochzius, M. (2008a). Collapse of a new living species of giant clam in the Red Sea. *Current Biology : CB*, 18(17), 1349–54. doi:10.1016/j.cub.2008.07.060
- Roberts, C. M., McClean, C. J., Veron, J. E. N., Hawkins, J. P., Allen, G. R., McAllister, D. E., Werner, T. B. (2002). Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science*, 295(5558), 1280–4. doi:10.1126/science.1067728
- Rodriguez-Lanetty, M. (2003). Evolving lineages of Symbiodinium-like dinoflagellates based on ITS1 rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28(1), 152–168. doi:10.1016/S1055-7903(03)00033-2
- Rogers, A., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.*, 9(3), 552–569. Retrieved from <http://mbe.oxfordjournals.org/content/9/3/552>
- Rogers, A. R. (1995). Genetic Evidence for a Pleistocene Population Explosion. *Evolution*, 49(4), 608. doi:10.2307/2410314
- Rosen, B. R. (1988). Progress, problems and patterns in the biogeography of reef corals and other tropical marine organisms. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 42(2), 269–301. doi:10.1007/BF02366046
- Rosewater J. (1982). New species of *Hippopus* (Bivalvia: Tridacnidae). *Nautilus*, 3–6.
- Rougerie, F. (1995). Nature et fonctionnement des atolls des Tuamotu (Polynésie Française). *Océanologica Acta*, 18(1), 61–78. Retrieved from <http://archimer.ifremer.fr/doc/00097/20857/>

- Roux, A., Lison, D., Junot, C., & Heilier, J.-F. (2011). Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 119–35. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016
- Rouzé H. (2013). *Dynamique et flexibilité des clades de Symbiodinium associés aux coraux dans différents environnements, naturels et contrôlés*. Thèse de Doctorat, Université de la Polynésie française/CRIOBE.
- Rowan, R. (1998). Review-diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *Journal of Phycology*, 34(3), 407–417. doi:10.1046/j.1529-8817.1998.340407.x
- Rowan, R. (2004). Coral bleaching: thermal adaptation in reef coral symbionts. *Nature*, 430(7001), 742. doi:10.1038/430742a
- Rowan, R., & Knowlton, N. (1995). Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2850–3. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A., & Jara, J. (1997). Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Marine Ecology Progress Series*, 152(2-3), 265–269.
- Rowan, R., & Powers, D. (1991). Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Marine Ecology Progress Series*, 71, 65–73. doi:10.3354/meps071065
- Saenz-Agudelo, P., Jones, G. P., Thorrold, S. R., & Planes, S. (2009). Estimating connectivity in marine populations: an empirical evaluation of assignment tests and parentage analysis under different gene flow scenarios. *Molecular Ecology*, 18(8), 1765–76. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04109.x
- Salvat, B. (1967). Importance de la faune malacologique dans les atolls polynésiens. *Cahiers Du Pacifique*, (11), 7–49.
- Salvat, B. (1971). La faune benthique du lagon de l'atoll de Reao (Tuamotu, Polynésie). *Cahiers du Pacifique*, 16, 30 – 109.
- Sargent, J. R. (1978). The structure, metabolism and function of lipids in marine organisms. In *Biochemistry and biophysical perspectives in marine biology* (Academic Press, pp. 149–212). London.
- Sargent J., Henderson R.J. and Tocher, D. . (1988). The lipids. In *Fish Nutrition* (Academic Press). London.
- Saucedo, P., & Monteforte, M. (1997). In situ growth of pearl oysters *Pinctada mazatlanica* (Hanley 1856) and *Pteria sterna* (Gould 1851) under repopulation conditions at Bahia de La Paz, Baja California Sur, Mexico. *Aquaculture Research*, 28(5), 367–378. doi:10.1046/j.1365-2109.1997.t01-1-00868.x
- Savage, A., Goodson, M., Visram, S., Trapido-Rosenthal, H., Wiedenmann, J., & Douglas, A. (2002). Molecular diversity of symbiotic algae at the latitudinal margins of their distribution: dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* in corals and sea anemones. *Marine Ecology Progress Series*, 244, 17–26. doi:10.3354/meps244017

- Schmidt-Roach, S., Lundgren, P., Miller, K., Gerlach, G., Noreen, A., & Andreakis, N. (2012, October 24). Assessing hidden species diversity in the coral *Pocillopora damicornis* from Eastern Australia. *Coral Reefs*. Retrieved from [http://ecite.utas.edu.au/80181/1/Schmidt-Roach et al 2012_Pocillopora cryptic species.pdf](http://ecite.utas.edu.au/80181/1/Schmidt-Roach%20et%20al%202012_Pocillopora%20cryptic%20species.pdf)
- Schneider, J. a., & O'Foighil, D. O. (1999). Phylogeny of giant clams (Cardiidae: Tridacninae) based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *13*(1), 59–66. doi:10.1006/mpev.1999.0636
- Schneider, S., & Excoffier, L. (1999). Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics*, *152*(3), 1079–1089. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/152/3/1079.abstract>
- Schwartzmann, C., Durrieu, G., Sow, M., Ciret, P., Lazareth, C. E., & Massabuau, J. C. (2011). In situ giant clam growth rate behavior in relation to temperature : a one-year coupled study of high-frequency noninvasive valvometry and sclerochronology. *Limnology and Oceanography*, *56*(5), 1940–1951. Retrieved from <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010053834>
- Selander, R. K., & Kaufman, D. W. (1973). Genic Variability and Strategies of Adaptation in Animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(6), 1875–1877. doi:10.1073/pnas.70.6.1875
- Shepard, J. ., Olsson, B., Tedengren, M., & Bradley, B. (2000). Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Marine Environmental Research*, *50*(1-5), 337–340. doi:10.1016/S0141-1136(00)00065-9
- Shepard, J. L., & Bradley, B. P. (2000). Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. *Marine Environmental Research*, *50*(1-5), 457–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460734>
- Shumway, S. E. (1977). Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. *Marine Biology*, *41*(2), 153–177. doi:10.1007/BF00394023
- Silverstein, R. N., Correa, A. M. S., & Baker, A. C. (2012). Specificity is rarely absolute in coral-algal symbiosis: implications for coral response to climate change. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *279*(1738), 2609–18. doi:10.1098/rspb.2012.0055
- Sirenko BI. (1991). Unusual abundance of giant clams *Tridacna maxima* in the central Pacific. *La Conchiglia*, *22*(258), 2–7.
- Skjenstad, T., Haxo, F. T., & Liaaen-Jensen, S. (1984). Carotenoids of clam, coral and nudibranch zooxanthellae in aposymbiotic culture. *Biochemical Systematics and Ecology*, *12*(2), 149–153. doi:10.1016/0305-1978(84)90027-9
- Smith, S. A., Wilson, N. G., Goetz, F. E., Feehery, C., Andrade, S. C. S., Rouse, G. W., ... Dunn, C. W. (2011). Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature*, *480*(7377), 364–7. doi:10.1038/nature10526
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *The Journal of Experimental Biology*, *213*(6), 912–20. doi:10.1242/jeb.037473

- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., & Masski, H. (1998). Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 121(3), 279–288. doi:10.1016/S1095-6433(98)10130-7
- Spalding, M. D., Fox, H. E., Allen, G. R., Davidson, N., Ferdaña, Z. A., Finlayson, M., Robertson, J. (2007a). Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience*, 57(7), 573. doi:10.1641/B570707
- Stat, M., Carter, D., & Hoeghuldberg, O. (2006). The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts—Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8(1), 23–43. doi:10.1016/j.ppees.2006.04.001
- Stat, M., Morris, E., & Gates, R. D. (2008). Functional diversity in coral-dinoflagellate symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27), 9256–61. doi:10.1073/pnas.0801328105
- Sturany R. (1899). Expedition S.M. Schiff “Pola” in das Rothe Meer. *Zoologische Ergebnisse XIV Lamellibranchiaten Des Rothen Meeres*, (69), 255–295.
- Su Y., Hung J-H., Kubo H., L. L.-L. (2014). *Tridacna noae* (Röding, 1798) – a valid giant clam species separated from *T. maxima* (Röding, 1798) by morphological and genetic data. *Raffles Bulletin of Zoology*, (62), 124–135.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437–60. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1202167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/123/3/585.abstract>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–9. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tchernov, D., Gorbunov, M. Y., Vargas, C. De, Yadav, S. N., Milligan, A. J., Ha, M., & Falkowski, P. G. (2004). Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic, *101*(37), 13531–13535.
- Thamrongnavasawat, T., A. Saisaeng, N. Sittithaweepat, P. Limviriyakul, S. Worachananant and O. Patimanukasem, 2001. *Survey report in Mu Ko Surin Marine National Park Area presented to UNESCO Project*. URL: www.talaythai.com/English/unesco/index.php3.
- Tisdell, C. (1992). Giant clams in the sustainable development of the South Pacific: socioeconomic issues in mariculture and conservation. *ACIAR Monograph*, (18), 283.
- Toller, W. W., Rowan, R., & Knowlton, N. (2001). Zooxanthellae of the *Montastraea annularis* species complex: patterns of distribution of four taxa of *Symbiodinium* on different reefs and across depths. *The Biological Bulletin*, 201(3), 348–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751247>
- Tomanek, L. (2012). Environmental proteomics of the mussel *Mytilus*: implications for tolerance to stress and change in limits of biogeographic ranges in response to climate change. *Integrative and Comparative Biology*, 52(5), 648–64. doi:10.1093/icb/ics114

- Tomanek, L., Zuzow, M. J., Ivanina, A. V., Beniash, E., & Sokolova, I. M. (2011). Proteomic response to elevated PCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *The Journal of Experimental Biology*, 214(Pt 11), 1836–44. doi:10.1242/jeb.055475
- Trench, R. K. (1979). The Cell Biology of Plant-Animal Symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology*, 30(1), 485–531. doi:10.1146/annurev.pp.30.060179.002413
- Trench, R. K., Wethey, D. S., & Porter, J. W. (1981). Observations on the Symbiosis with Zooxanthellae among the Tridacnidae (Mollusca, Bivalvia). *Biological Bulletin*, 161(1), 180. doi:10.2307/1541117
- Ulstrup, K. E., & Van Oppen, M. J. H. (2003). Geographic and habitat partitioning of genetically distinct zooxanthellae (*Symbiodinium*) in *Acropora* corals on the Great Barrier Reef. *Molecular Ecology*, 12(12), 3477–3484. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01988.x
- Usher, G. F. (1984). Coral reefs invertebrates in Indonesia: their exploitation and conservation needs. IUCN/WWF Project Report no.1688. 97pp.
- Vale, P. (2010). Profiles of fatty acids and 7-O-acyl okadaic acid esters in bivalves: can bacteria be involved in acyl esterification of okadaic acid? *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 151(1), 18–24. doi:10.1016/j.cbpc.2009.08.001
- Van Oppen, M. J. H., Mieog, J. C., Sánchez, C. A., & Fabricius, K. E. (2005). Diversity of algal endosymbionts (zooxanthellae) in octocorals: the roles of geography and host relationships. *Molecular Ecology*, 14(8), 2403–17. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02545.x
- Van Oppen, M. J., Palstra, F. P., Piquet, A. M., & Miller, D. J. (2001). Patterns of coral-dinoflagellate associations in *Acropora*: significance of local availability and physiology of *Symbiodinium* strains and host-symbiont selectivity. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 268(1478), 1759–67. doi:10.1098/rspb.2001.1733
- Van Ravenzwaay, B., Cunha, G. C.-P., Leibold, E., Looser, R., Mellert, W., Prokoudine, A., Wiemer, J. (2007). The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect. *Toxicology Letters*, 172(1-2), 21–8. doi:10.1016/j.toxlet.2007.05.021
- Van Wynsberge, S., Andréfouët, S., Gilbert, A., Stein, A., & Remoissenet, G. (2013). Best management strategies for sustainable giant clam fishery in French Polynesia islands: answers from a spatial modeling approach. *PloS One*, 8(5), e64641. doi:10.1371/journal.pone.0064641
- Vasemagi, A., Gaffney, P. M., Pascal, C. M., Barnhart, J., Grant, W. S., & Seeb, J. E. (2010). Genetic homogeneity of weathervane scallops (*Patinopecten caurinus*) in the northeastern Pacific. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67(11), 1827–1839. doi:10.1139/F10-096
- Ventrella, V., Pirini, M., Pagliarani, A., Trombetti, F., Manuzzi, M. P., & Borgatti, A. R. (2008). Effect of temporal and geographical factors on fatty acid composition of *M. galloprovincialis* from the Adriatic sea. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 149(2), 241–50. doi:10.1016/j.cbpb.2007.09.012
- Veron, J. E. N. (2000). *Corals of the world, Volume 1* (p. 463). Australian Institute of Marine Science. Retrieved from http://books.google.com/books/about/Corals_of_the_world.html?id=A4sWAQAIAAJ&pgis=1
- Veron, J. E. N., Devantier, I. M., Turak, E., Green, A. L., Kininmonth, S., Stafford-smith, M., & Peterson, N. (2009). Delineating the Coral Triangle. *Galaxea, Journal of Coral Reef Studies*, 11(2), 91–100. doi:10.3755/galaxea.11.91

- Voet, D (2004). *Biochemistry* (Wiley Inte., p. 1591).
- Vos, C. C., Antonisse-De Jong, A. G., Goedhart, P. W., & Smulders, M. J. M. (2001). Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity*, 86(5), 598–608. doi:10.1046/j.1365-2540.2001.00865.x
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T. (2003). From Ocean to Aquarium.
- Waldock, M. J., & Holland, D. L. (1984). Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: Polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 19(5), 332–336. doi:10.1007/BF02534783
- Waples, R. S. (1998). Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, 89(5), 438–450. doi:10.1093/jhered/89.5.438
- Waples, R. S., & Gaggiotti, O. (2006). What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15(6), 1419–39. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02890.x
- Ward, R. D., Woodwark, M., & Skibinski, D. O. F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44(2), 213–232. doi:10.1111/j.1095-8649.1994.tb01200.x
- Waters, C. G., Story, R., & Costello, M. J. (2013). Short communication A methodology for recruiting a giant clam, *Tridacna maxima*, directly to natural substrata: A first step in reversing functional extinctions?, 160, 19–24.
- Watson, J. R., Hays, C. G., Raimondi, P. T., Mitarai, S., Dong, C., McWilliams, J. C., Siegel, D. A. (2011). Currents connecting communities: nearshore community similarity and ocean circulation. *Ecology*, 92(6), 1193–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21797147>
- Weber, M. (2009). The Biogeography and Evolution of *Symbiodinium* in Giant Clams (Tridacnidae). Retrieved from <http://escholarship.org/uc/item/4tw4n6dj#page-1>
- Wecker, P., Fournier, A., Bosserelle P., Debitus, C., Lecellier, G., Berteaux-Lecellier, V. (soumis). Dinoflagellate diversity among nudibranchs and sponges from French Polynesia: insights into associations and transfer
- Weckwerth, W., & Fiehn, O. (2002). Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), 156–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950569>
- Wei, L., Wang, Q., Wu, H., Ji, C., & Zhao, J. (2014). Proteomic and metabolomic responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* to elevated pCO₂ exposure. *Journal of Proteomics*. doi:10.1016/j.jprot.2014.08.010
- Wells, S. (1996) In: IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species. URL: www.iucnredlist.org.
- Wilcox, T. P. (1998). Large-subunit ribosomal RNA systematics of symbiotic dinoflagellates: morphology does not recapitulate phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10(3), 436–48. doi:10.1006/mpev.1998.0546

- Woodruff, D. S. (2003). Neogene marine transgressions, palaeogeography and biogeographic transitions on the Thai-Malay Peninsula. *Journal of Biogeography*, 30(4), 551–567. doi:10.1046/j.1365-2699.2003.00846.x
- Yamashita, H., Suzuki, G., & Hayashibara, T. (2011). Do corals select zooxanthellae by alternative discharge ?, 87–100. doi:10.1007/s00227-010-1544-z
- Yonge, C. (1975). Giant clams. *Scientific american*, 232(4), 96–105. Retrieved from http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=33&SID=P2T92i9CxiM24EG8H3H&page=1&doc=3
- Yu, E. T., Juinio-Meñez, M. a, & Monje, V. D. (2000). Sequence variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Tridacna crocea*. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 2(6), 511–6. doi:10.1007/s101260000033
- Zhang, D.-X., & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3), 563–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675814>
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490(7418), 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, Z., & Zhang, Q. (2012). Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu(2+) and malachite green. *Gene*, 497(2), 172–80. doi:10.1016/j.gene.2012.01.058

ANNEXES

1 **Annexe I : Article**

2 **Existence of two novel and non-sectorized clades of the giant clam *Tridacna***
3 ***maxima* in French Polynesia: implications for connectivity and origin**

4

5 **Vaimiti Dubousquet^{1,2,3}, Véronique Berteaux-Lecellier^{1,3}, Carmela Lopes⁴, Phila**
6 **Raharivelomanana², Gaël Lecellier^{1,3,*}**

7

8 ¹CRIOBE USR 3278 CNRS-EPHE-UPVD Papetoai Moorea Polynésie française

9 ²UMR EIO Université de la Polynésie française Faa'a Polynésie française

10 ³Laboratoire d'Excellence « CORAIL » Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de
11 l'Environnement, Moorea, Polynésie française

12 ⁴Université de la Polynésie française Faa'a Polynésie française

13

14 * Corresponding author

15 E-mail: gael.lecellier@uvsq.fr

16

17

18

19 **Abstract**

20 Giant clams are widely depleted with the exception of French Polynesia, where the dominant
21 species, *Tridacna maxima*, is still exploited. Herein, we report the first genetic structure
22 analysis of *T. maxima* samples, issued from 4 French Polynesian archipelagos and spread on a
23 surface of about 4 millions square kilometers. This study was based on both mitochondrial
24 (*COI* and *16S*) and nuclear (*18S*) sequences and led to the discovery of two new *T. maxima*
25 clades, which diverged 1.5 million years ago. French Polynesian clades cohabite over a large
26 area with a Northwestern Southeastern axis on either side of which, one of each clade is
27 dominant. Contrary to the strong genetic structuration observed in the *T. maxima* population
28 in Indo- and West Pacific, we show in the present work that the populations are
29 interconnected, except in Tuamotu archipelago. This is underlined by a high connectivity
30 between distant islands intra- and inter-archipelagos, which is independent from the direction
31 of the oceanic currents. Altogether our data bring growing evidences of a progression of both
32 clades in French Polynesia, one southern direction and a second northern one.

33 Introduction

34 Giant clams are represented by two genus, *Tridacna* and *Hippopus*, which diverged 15
35 million of years ago (HARZHAUSER et al., 2008; J. a Schneider & Foighil, 1999). While
36 *Hippopus* genus only consists of two species, *H. Hippopus* and *H. porcellanus*, *Tridacna*
37 genus has recently extended from eight to nine described species (Huelsenken et al., 2013).
38 Among these nine *Tridacna* species, except sparse *T. squamosa*, *T. maxima* is the unique
39 representative of the genus in French Polynesia (A. Gilbert et al., 2007), while both of them
40 are described to be widespread in the Indian Ocean, the Red Sea and notably in the West
41 Pacific (Ahmad Syukri Bin Othman, n.d.; Huelsenken et al., 2013; Richter, Roa-quiaoit, &
42 Jantzen, 2008). Only absent in Marquesas, *T. maxima* is spread in the four other Polynesian
43 archipelagos, where it harbors high densities, even if its quantity can strongly differ between
44 islands. Their highest densities are found in Tuamotu archipelago (Van Wynsberge et al.,
45 2013), especially in Fangatau (Andréfouët et al., 2005) and Reao (Salvat, 1971) atolls, where
46 the *T. maxima* clams grow and accumulate tightly against each other, giving rise to a
47 particular “mapiko” structure, specific to French Polynesia (Andréfouët et al., 2005; Antoine
48 Gilbert et al., 2005). High *T. maxima* densities are also found in other islands of French
49 Polynesia, such as in Tubuai island (Australes archipelago, (Antoine Gilbert et al., 2006)).

50 However, with the exception of French Polynesia, giant clam stocks are widely
51 depleted, and they are listed in the IUCN Redlist of threatened species since 1996. Many
52 phylogenetic studies of giant clams have now been conducted in different oceans. They were
53 performed with allozyme markers in the Pacific Region (J. (JAH) Benzie & Williams, 1997;
54 Laurent et al., 2002), as well as nuclear and/or mitochondrial markers in the Red Sea (Richter,
55 Roa-quiaoit, et al., 2008), in the Indo-Pacific region (T. S. DeBoer et al., 2008; Huelsenken et
56 al., 2013; Kochzius & Nuryanto, 2008; Neo & Todd, 2012; Nuryanto & Kochzius, 2009; Yu,
57 Juinio-Meñez, & Monje, 2000) and in the Pacific region (J. Gardner, Boesche, Meyer, &
58 Wood, 2012). Concerning *Tridacna maxima* species, the presence of four distinct lineages in

59 the Indo-Pacific region and Red Sea, both considered as high spot of biodiversity, has been
60 detected (Nuryanto & Kochzius, 2009). Regarding the East-Pacific region, considered as the
61 end of the biodiversity gradient, only few studies rely on the giant clam populations.

62 Because of its very high density in French Polynesia compared to the rest of the world
63 (Andréfouët et al., 2005; Antoine Gilbert et al., 2006; Salvat, 1971), *T. maxima* exploitation
64 for the local consumption and the exportation, as well as for the aquarium trade, is still
65 allowed. Nevertheless, this exploitation is subject to an international standard set by the
66 Washington Convention of March 3rd 1973, and to a local standard which prohibits the
67 exploitation of clams less than 12 cm long (Resolution No. 88-184/AT). Since 2001, different
68 studies on giant clams have been undertaken by the Direction of Marine Resource of French
69 Polynesia in partnership with the Research and Development Institute and the University of
70 French Polynesia (Van Wynsberge et al., 2013). These studies mainly concentrate on stock
71 assessment, with the objective to master the aquaculture of these bivalves. Associated
72 restocking projects, consisting in the reintroduction of *T. maxima* in depleted places, might
73 generate a risk of a genetic homogenization (Bell et al., 1999). Moreover, genetic studies on
74 *T. maxima* in French Polynesia are still in their infancy and, as far as we are concerned, except
75 for the work on *T. squamosa* (A. Gilbert et al., 2007), no genetic study with mitochondrial or
76 nuclear markers has been conducted on French Polynesian giant clams. Only one study, based
77 on allozyme diversity, was performed (Laurent et al., 2002). The authors used ten
78 polymorphic loci to study the genetic variation on nine populations from six French
79 Polynesian islands, in the Society and Tuamotu archipelagos. While the confined environment
80 provided by numerous lagoons of French Polynesia might provide a hot spot for genetic
81 differentiation, a significant genetic difference between populations was only detected at the
82 archipelago level, and according to only one locus of the ten tested.

83 French Polynesia is a naturally fragmented structure composed of a set of 118 remote
84 islands, distributed into five archipelagos, located on a 5.5 millions square kilometer surface

85 area and therefore provides a good area to go deeper in the understanding of the intraspecific
86 genetic divergence of *T. maxima* and of the origin of this divergence. To this purpose, we
87 used three different genetic markers, the cytochrome c oxidase I gene (*COI*), the
88 mitochondrial small ribosomal subunit *16S* RNA (*16S* rDNA) and the nuclear small ribosomal
89 subunit *18S* RNA (*18S* rDNA) to determine the genetic structure and connectivity between *T.*
90 *maxima* issued from 14 islands spread over the four archipelagos which possess giant clams,
91 collectively representing an area of about 4 millions square kilometers.

92

93 **Materials and Methods**

94 **Sample collection and DNA extraction**

95 Giant clams from *T. maxima* species (n = 304) were sampled between February 1st
96 2011 and November 2nd 2013, in 14 islands distributed in four out of the five archipelagos of
97 French Polynesia. The Australes archipelago is represented by Maria, Tubuai, Raivavae; the
98 Gambier by Mangareva; the Tuamotu by Reao, Tatakoto, Hao, Makemo, Kauehi, Tikehau,
99 Kaukura, Apataki and the Society by Tahiti and Moorea. In Tahiti, the biggest island of
100 French Polynesia, *T. maxima* giant clams have been sampled over three regions: North, West
101 and South.

102 Mantel samples were collected from *T. maxima* at 0.5-2 m depth, just by clipping a
103 piece of mantle tissue immediately stored in 70% ethanol. Total genomic DNA was extracted
104 from each mantle sample using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega),
105 according to the manufacturer's instructions.

106

107

108 **Amplification and sequencing**

109 The genetic structure of *T. maxima* was studied using one nuclear genetic marker, the
110 *18S* rDNA and two mitochondrial markers, the *16S* rDNA gene and the cytochrome c oxidase

111 subunit 1 gene (*COI*). All corresponding DNA regions were amplified by polymerase chain
112 reaction (PCR) using specific primers and the Promega GoTaq polymerase kit. DNA regions
113 of the *18S* rDNA (800 bp) and the *16S* rDNA (462 bp) were amplified with Canapa's specific
114 primers (Canapa, Marota, Rollo, & Olmo, 1999) and Schneider's primers (J. a Schneider &
115 Foighil, 1999) respectively and according to the following PCR conditions: 35 cycles of 94°C
116 (45 s), either 50°C (45 s) or 55°C (45 s) for the *18S* rDNA and the *16S* rDNA respectively,
117 and 72°C (45 s). For *COI* gene, the primers were designed and allowed the amplification of a
118 658 bp DNA region. The forward primer, *COI* F (5'-
119 cggtaaaacgacggccagtgggtgataattcgaacagaa-3'), was modified from Kochzius' *COI* forward
120 primer (Kochzius & Nuryanto, 2008) and the *COI* reverse primer (*COI* R: 5'-
121 ggagcggataacaatttcacacaggaacgaacgctgtaatacc-3') was designed from the highly conserved
122 regions within the published sequences of *T. maxima* *COI* gene. The PCR reaction consisted
123 of 7 cycles of 94°C (45 s), 40°C (45 s) and 72°C (45 s), followed by 30 cycles of 94°C (45 s),
124 50°C (45 s), and 72°C (45 s).

125 All PCR products were purified using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System
126 (Promega) and sequenced (Eurofin and GATC, Germany). Sequences were edited, assembled
127 and multi-alignment was performed using MEGA6 software (Tamura, Stecher, Peterson,
128 Filipski, & Kumar, 2013). Gene sequences were deposited in GenBank.

129

130 **DNA Sequences**

131 In addition to our *COI*, *16S* and *18S* new sequences issued from the 304 samples, 154
132 *COI* sequences, 15 *16S* sequences and 6 *18S* sequences of *Tridacna* species were extracted
133 from the NCBI repository of the nucleotide sequences, mainly associated to the works of
134 Huelsken *et al.* (Huelsken *et al.*, 2013), DeBoer *et al.* (T. S. DeBoer *et al.*, 2008) and
135 Nuryanto *et al.* (Kochzius & Nuryanto, 2008). Outgroups from other species were also
136 included (4 *COI* sequences, 3 *16S* sequences and 5 *18S* sequences). See Table S1.

137

138 **Phylogenetic analysis**

139 The phylogenetic analysis was realized using StarBeast v2.1.3 software (Heled &
140 Drummond, 2010). The general procedure, treatment of each gene region and Priors for nodes
141 defining species, was similar to the procedure mentioned by Huelsken et al. (Huelsken et al.,
142 2013). In addition to a general time reversible model, a Hasegawa-Kishino-Yano model with
143 gamma distributed and invariant sites (G + I) was also applied to each gene, with an
144 additional partitioning by codon position (1+2+3) for *COI*. Speciation was also modeled both
145 as birth-death and Yules processes with the same parameters as those described in Huelsken
146 et al. (Huelsken et al., 2013).

147 The phylogeographic patterns were assessed by examining an aggregation of 114
148 unique *COI* haplotypes (**Table S1**) after manually alignment and a heuristic maximum
149 parsimony search, conducted in MEGA6.06 (Tamura et al., 2013).

150 The software Figtree was used for graphics preparation of the trees (Rambaut:
151 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

152

153 **Population genetic statistics**

154 Molecular diversity measures for all populations were evaluated in Arlequin v3.5.1.2
155 (Excoffier & Lischer, 2010), including haplotype diversity (Nei, 1987), nucleotide diversity
156 (Nei, 1987; Tajima, 1983) and pairwise sequence divergence, genetic signal of population
157 equilibrium (Tajima's *D*-test statistic (Tajima, 1989), Fu's *F*-test (Fu, 1997) and mismatch
158 distribution for assessment of the demographic status of populations by sum of squared
159 deviations (SSD; (Excoffier, 2004; A. Rogers & Harpending, 1992; A. R. Rogers, 1995; S.
160 Schneider & Excoffier, 1999)) and Harpending's Raggedness Index (HRI; (Harpending,
161 1994)). AMOVA were also performed in Arlequin v3.5.1.2.

162 A classical Multidimensional Scaling and hierarchical clustering with the Ward
163 method were performed from the Fst pairwise differences of population with R version 3.1.1
164 (R Core Team 2014 <http://www.R-project.org/>).

165

166 **Results**

167 **DNA Sequences**

168 304 *T. maxima* were sampled over 14 islands spread on 4 out of 5 French Polynesian
169 archipelagos (**Table 1**). Some of them were sequenced at three loci; 2 mitochondrial regions
170 (*COI* n=304 and *16S* n=124) and 1 nuclear region (*18S* n=88). Alignment of these sequences
171 allowed the identification of 59 distinct haplotypes for *COI*, 6 for the *16S* and 6 for the *18S*.
172 All of them were novel haplotypes of *T. maxima*. The resulting alignment of *COI* sequences
173 was 461 bp length. No double peaks nor in-frame stop codons were observed, indicating no
174 evidence of heteroplasmy or nuclear copies of mitochondrial DNA. Amino acid translation of
175 the sequences yielded to 153 amino acids and showed 9 non-synonymous substitutions among
176 the 54 polymorphic sites and 58 base substitutions. These 9 substitutions were conservative
177 changes and therefore didn't alter the characteristics of the protein domain. The resulting
178 alignment of the *16S* sequences was 392 bp length and disclosed 5 base substitutions on 5
179 sites. The sequence alignment of the *18S* was 604 bp length with 7 base substitutions on 7
180 sites.

181

182 **Phylogenetic analyses**

183 As expected, the tree topologies for single *COI*, *16S* and *18S* gene datasets (**Fig. 1**)
184 were strongly similar to the tree topologies published by Huelsken et al. (Huelsken et al.,
185 2013). The only significant difference is the appearance of 2 new clades in the *T. maxima*
186 taxon. The similarity between the trees supports a consistent phylogenetic signal. These novel
187 clade sequences were distinct from the other species with an average pairwise *COI* sequence

188 divergence (uncorrected pairwise distances) of 13.7% with *T. crocea*, 16.8% with *T. derasa*,
189 16.2% with *T. sp*, 14.3% with *T. squamosa* and 9.0% with *T. maxima* as compared to 10.4%
190 between *T. squamosa* and *T. crocea*. Between both clades, the average pairwise distance is
191 3.3%.

192 Time calibrated gene trees for *COI* and *16S* also showed similar estimations of the
193 ages of nodes in agreement with the fossil dates. The divergence date for *T. squamosa* is
194 estimated at 1.06 million years ago (My BP) with *COI* tree and 1.28 My BP with *16S*. For *T.*
195 *crocea*, the estimations are 1.99 and 1.3 My BP respectively. The divergent date for the new
196 clades are estimated at 1.5 My BP (0.66 – 2.77, 95% HPD).

197 Intraspecific phylogeographic patterns with *COI* region of *T. maxima* was explored
198 with French Polynesia new clades (**Fig. 2**). The pattern highlighted two monophyletic “East
199 Pacific” clades, configuring a third expansion between Indo-pacific region, “Wallacea”, and
200 “West Pacific” clades.

201

202 **Genetic diversity**

203 Because of the low number of the *16S* and *18S* haplotypes, only *COI* region was
204 analyzed. Genetic diversity (**Table 1**) showed that the lower haplotypic and nucleotidic
205 diversity was observed in Hao island ($h=0.20$ and $\pi=0.04$) and in South Tahiti ($h=0.46$ and
206 $\pi=0.43$) while the h and π values were about 0.80 and 0.65 respectively for the others
207 populations. The Tajima’s D test and Fu’s F_s test for each sample did not reject the null
208 hypothesis of neutral evolution for the majority of the samples. Only Raivavae, Makemo and
209 South Tahiti have a significant negative Tajima’s D value and West Tahiti for Fu’s F_s . This
210 suggested a population size expansion or selection within these populations. The population
211 expansion hypothesis was supported by non significant SSD and HRI in Makemo population.
212 Concerning the two remaining populations South Tahiti and Raivavae, there is a significant
213 deviation from the expected SSD or HRI distribution. These values suggest that the

214 demographic expansion model does not provide a particularly good fit to these data. However,
215 we observed that the mismatch distributions were multimodal, consistent with old stationary
216 populations. As a result, the agreement with neutrality could not be rejected.

217 **Spatial Structure of genetic variation**

219 To determine the partition of the genetic variation into regions, we analyzed the
220 population pairwise F_{st} differences in a first time. The first axis of a multi-dimensional
221 scaling from these evaluated differences discriminated the islands of Tuamotu from the other
222 islands (**Fig. 3**). Furthermore, a strong amalgamation of Society, Australes and Gambier islands
223 was observed (low F_{st} differences, **Table S2**). Among this group, Moorea was discriminated
224 with a lower F_{st} difference with the North Tuamotu islands. On the contrary, the West Tahiti
225 site was significantly isolated from the other sites. In the Tuamotu archipelago, two distinct
226 groups were observed: Northwestern Tuamotu and East Tuamotu.

227 Using AMOVA, we found a significant genetic structure into the different regions (**Table S3**).
228 There was a significant structure between geographic archipelagos ($F_{CT} = 0.3404$, p -value =
229 0.005) and the level of structure was maximized when Tuamotu populations were split into
230 two (North and East) or three groups: Northwestern, Middle and East, and the other
231 populations were grouped ($F_{CT} = 0.47293$ and 0.47327 respectively, p -value=0).

232

233 **Genetic population structure and gene flow**

234 The proportion of the two French Polynesian clades at each sample site and principal
235 gene flows between geographic groups were studied (**Fig. 4**). We clearly observed an
236 opposition between the proportions of the two clades on either side of a
237 Northwestern/Southeastern axis, North Society-Gambier archipelagos. At the North of this
238 axis, the frequency of one clade highly prevails over the other clade, up to 100% in some
239 sites. Conversely, the inverse proportions were observed at the South of this axis. This
240 geographic discrimination led to name these clades North Mapiko and South Mapiko.

241 The estimated migrant values led to the same geographic groups as those previously
242 obtained with the population pairwise F_{st} , providing a robust connectivity network (**Table**
243 **S4**). They exhibited a strong relationship between islands within each geographic group of the
244 North and East Tuamotu, Society, Australes and Gambier archipelagos. Moorea island also
245 displayed a relationship with the islands of the North of the Tuamotu archipelago. At the
246 geographic group level, the East Tuamotu group displayed only relationship with the North
247 Tuamotu group whereas the three other groups (Society, Australes, Gambier) are
248 interconnected. The study of shared haplotypes consolidated these different geographic
249 groups. Two of the 59 haplotypes were largely distributed all over French Polynesia. One
250 haplotype was only absent from the East group of Tuamotu island (Hao, Tatakoto and Reao)
251 and the second one was absent from both the East Tuamotu and the Australes archipelagos. It
252 was interesting to note that the first haplotype, also shared with Australes, was present only in
253 the three Islands at the North of the Northwestern Tuamotu group (Tikehau, Apataki and
254 Kaukura) whereas the second haplotype, absent in Australes, was shared between all Islands
255 of the Northwestern Tuamotu group. In the East Tuamotu group, only 2 of 8 haplotypes were
256 shared with the North Tuamotu group. In the Australes group, 11 of 14 haplotypes were only
257 present within this group, 3 shared with the Society group among which one is shared with the
258 Gambier group corresponding to the largely shared haplotype.

259 The directions intra- or inter-groups of these relationships did not systematically follow the
260 flow direction of the present oceanic currents, which are mainly perpendicular.

261

262 **Discussion**

263 Our study, conducted in French Polynesia, disclosed two novel clades of *T. maxima*.
264 These two clades, which do not extend towards the West Pacific, represent a novel *T. maxima*
265 genetic break, between the middle of South Pacific and the West Pacific. This is in line with
266 the strong genetic population structure of *T. maxima* and other sessile marine species

267 observed across the Indo-Pacific Ocean, even on small areas, and associated with a highly
268 restricted gene flow (T. S. DeBoer et al., 2014a, 2008; Nuryanto & Kochzius, 2009). These
269 two clades seem to be restricted to French Polynesia and do not extend into the West Pacific.

270 Our data allow to estimate the age of the divergence of the giant clam populations of
271 French Polynesia, at 1.5 ± 0.5 My BP. At least two hypotheses can account for these
272 observations: either these two clades existed before their arrival in French Polynesia or they
273 diverged from a common ancestor after their arrival. During Pleistocene (2 My BP), the
274 frequency of sea level variation increased significantly (Woodruff, 2003). In course of the last
275 glaciations peaks (21 000 years BP), the sea level of the Indo-Pacific region decreased to -120
276 m under the actual sea level (Bard et al., 1996; Dickinson, 2004), and led to a complete or
277 partial dry for most of the lagoons. In French Polynesia this event probably led to local
278 extinctions or reductions of giant clams population size, as proposed for *Pinctada*
279 *margaritifera* (Arnaud-Haond et al., 2003). 11 500 years BP, the melting of the ice led to the
280 increase of sea level until more than 1 m above the present sea level, and for 1 500 years, the
281 sea level decreased until the present sea level (Pirazzoli, 1986). Nuclear and mitochondrial
282 markers have shown signs of recent bottlenecks and founder effects in *P. margaritifera*
283 populations in Tuamotu, Gambier and Society archipelagos, which have been related to sea
284 level fluctuations during the last glaciation period (Arnaud-Haond et al., 2003). As *P.*
285 *margaritifera*, giant clam genetic structure can also be explained by an important population
286 decrease, or maybe extinction, which occurred during the last glaciations, following by either
287 their successive reinvasions, from the Pacific region, one at the North of French Polynesia and
288 another one at the South, or by the presence of two distinct founder niches, one in Tuamotu
289 and the other one in Australes. Studies of the genetic structure of *T. maxima*, issued from the
290 insular surroundings of French Polynesia (Fiji, Samoa, Tonga, Cooks islands), should allow to
291 discriminate between these two hypotheses.

292 Surprisingly, our results also show that both clades are not segregated but distributed
293 nearly all over French Polynesia, contrary to what it is observed in the other regions of the
294 Indo-Pacific and West Pacific (T. S. DeBoer et al., 2014a; Nuryanto & Kochzius, 2009). The
295 genetic integrity of species living in fragmented habitats depends on many factors, including
296 their dispersal abilities and the oceanic currents (Watson et al., 2011). Giant clams have a
297 pelagic phase of 9 days during their larval stage. Therefore, the flow has certainly highly
298 contributed to their genetic history in French Polynesia. The frequencies of each of the two
299 clades show an inverse gradient from North to South, suggesting that opposite flows can be
300 used for migration in the founder niches hypothesis or that a clade overruns French Polynesia
301 at the expense to the other clade. East Tuamotu group is the more isolated one, only
302 connected with Northeastern Tuamotu group. A privileged relationship between Northwestern
303 Tuamotu and Moorea island in the Society Archipelago is also observed. This relationship can
304 be consistent with the surface oceanic current which goes from Northeastern to Southwestern.
305 In this consideration, North Mapiko could have invaded French Polynesia from North to
306 South. However, the presence of a strong connectivity between Society and Gambier
307 archipelagos, Society and Australes archipelagos cannot be explained by the present surface
308 streams. The observed connectivity can be in the same direction and also perpendicular to the
309 present currents. Such a configuration was also described in West Pacific (J. (JAH) Benzie &
310 Williams, 1997). However, during exceptional events as El Niño or La Niña, flows are
311 changed and can be inversed (Martinez, Ganachaud, et al., 2009; Watson et al., 2011). Thus,
312 we suggest that in French Polynesia such changes are responsible for the high connectivity
313 observed between the different islands.

314 Our results also provide information to improve the management plan of giant clams
315 established by the Marine Resource Direction since 2001, and can thus contribute to the
316 preservation of this important resource. As both clades already cohabit in numerous islands in
317 the four archipelagos, transplantations from an island to the other one do not seem to present a

318 dramatic genetic hazard. The high connectivity observed between Society islands, Australes
319 and Gambier confer a natural mixing independently of the human manipulation.

320

321 **Acknowledgments**

322 We are grateful for a long list of giant clams samplers, Pauline Bosserelle, Yannick
323 Chancerelle, Loïc Charpy, Laura Dufranc, Jose Antonio Fernandez-Perez, Dominique
324 Laurent, Marcel Le Pennec, Maria Esperanza Martinez-Lopez, Maël Nicolas, Mélanie Roué,
325 Denis Saulnier, Benoit Tchepidjian and Florent Tintiller. Thanks to the Marine Resource
326 Direction for its confidence and its collaboration in this work.

327

328 **Author Contributions**

329 Conceived and designed the experiments: VD, VBL, CL, PR, GL. Performed the
330 experiments: VD, CL, GL. Analyzed the data: VD, VBL, GL. Contributed reagents/
331 materials/analysis tools: VD, VBL, CL, PR, GL. Wrote the manuscript: VD, VBL, PR, GL.

332

333 **References**

- 334 Schneider J a, Foighil DO (1999) Phylogeny of giant clams (Cardiidae: Tridacninae) based on partial
335 mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 13: 59–66. Available:
336 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508539>.
- 337 2. Harzhauser M, Mandic O, Piller WE, Reuter M, Kroh A (2008) Tracing back the origin of the
338 indo-pacific mollusc fauna: basal tridacninae from the oligocene and miocene of the sultanate of
339 Oman. *Palaeontology* 51: 199–213. Available: [http://doi.wiley.com/10.1111/j.1475-](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1475-4983.2007.00742.x)
340 [4983.2007.00742.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1475-4983.2007.00742.x). Accessed 21 August 2014.
- 341 3. Huelsken T, Keyse J, Liggins L, Penny S, Treml EA, et al. (2013) A novel widespread cryptic
342 species and phylogeographic patterns within several giant clam species (Cardiidae: Tridacna)
343 from the Indo-Pacific Ocean. *PLoS One* 8: e80858. Available:
344 <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0080858>. Accessed 8 August 2014.
- 345 4. Gilbert A, Planes S, Andréfouët S, Friedman K, Remoissenet G (2007) First observation of the
346 giant clam *Tridacna squamosa* in French Polynesia: a species range extension. *Coral Reefs* 26:
347 229–229. Available:<http://link.springer.com/10.1007/s00338-007-0218-x>. Accessed 7 August
348 2014.

- 349 5. Richter C, Roa-quiaoit H, Jantzen C (2008) Report Collapse of a New Living Species of Giant
350 Clam in the Red Sea: 1349–1354. doi:10.1016/j.cub.2008.07.060.
- 351 6. Ahmad Syukri Bin Othman GHSGPAT (2010) The distribution and status of giant clams (family
352 tridacnidae) – a short review. Available:
353 <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.318.5671>. Accessed 24 September
354 2014.
- 355 7. Van Wynsberge S, Andréfouët S, Gilbert A, Stein A, Remoissenet G (2013) Best management
356 strategies for sustainable giant clam fishery in French Polynesia islands: answers from a spatial
357 modeling approach. PLoS One 8: e64641. Available:
358 <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0064641>. Accessed 25 August 2014.
- 359 8. Andréfouët S, Gilbert A, Yan L, Remoissenet G, Payri C, et al. (2005) The remarkable population
360 size of the endangered clam *Tridacna maxima* assessed in Fangatau Atoll (Eastern Tuamotu,
361 French Polynesia) using in situ and remote sensing data. ICES J Mar Sci 62: 1037–1048.
362 Available:<http://www.documentation.ird.fr/hor/PAR00005232>. Accessed 11 August 2014.
- 363 9. Salvat B (1971) La faune benthique du lagon de l’atoll de Reao (Tuamotu, Polynésie). Cah du
364 Pacifique 16: 30 – 109.
- 365 10. Gilbert A, Yan L, Remoissenet G, Andréfouët S, Payri C, et al. (2005) Extraordinarily high giant
366 clam density under protection in Tatakoto atoll (Eastern Tuamotu archipelago, French
367 Polynesia). Coral Reefs 24. Available:
368 <http://www.documentation.ird.fr/hor/PAR00000646>. Accessed 11 August 2014.
- 369 11. Gilbert A, Andréfouët S, Yan L, Remoissenet G (2006) The giant clam *Tridacna maxima*
370 communities of three French Polynesia islands: comparison of their population sizes and
371 structures at early stages of their exploitation. Ices J Mar Sci 63: 1573–1589. Available:
372 <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010037737>. Accessed 11 August 2014.
- 373 12. Benzie J (JAH), Williams S (ST) (1997) Genetic structure of giant clam (*Tridacna maxima*)
374 populations in the west Pacific is not consistent with dispersal by present-day ocean currents.
375 Available: <http://epubs.aims.gov.au/handle/11068/2866>. Accessed 19 August 2014.
- 376 13. Laurent V, Planes S, Salvat B (2002) High variability of genetic pattern in giant clam (*Tridacna*
377 *maxima*) populations within French Polynesia. Biol J Linn Soc 77: 221–231. Available:
378 <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1095-8312.2002.00106.x>.
- 379 14. Yu ET, Juinio-Meñez M a, Monje VD (2000) Sequence variation in the ribosomal DNA internal
380 transcribed spacer of *Tridacna crocea*. Mar Biotechnol (NY) 2: 511–516. Available:
381 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961174>. Accessed 3 April 2014.
- 382 15. DeBoer TS, Subia MD, Erdmann M V, Kovitvongsa K, Barber PH (2008) Phylogeography and
383 limited genetic connectivity in the endangered boring giant clam across the Coral Triangle.
384 Conserv Biol 22: 1255–1266. Available:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637905>.
385 Accessed 20 March 2014.
- 386 16. Kochzius M, Nuryanto A (2008) Strong genetic population structure in the boring giant clam,
387 *Tridacna crocea*, across the Indo-Malay Archipelago: implications related to evolutionary
388 processes and connectivity. Mol Ecol 17: 3775–3787. Available:
389 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18662232>. Accessed 3 April 2014.

- 390 17. Nuryanto a., Kochzius M (2009) Highly restricted gene flow and deep evolutionary lineages in
391 the giant clam *Tridacna maxima*. *Coral Reefs* 28: 607–619.
392 Available:<http://link.springer.com/10.1007/s00338-009-0483-y>. Accessed 3 April 2014.
- 393 18. Neo M, Todd P (2012) Population density and genetic structure of the giant clams *Tridacna*
394 *crocea* and *T. squamosa* on Singapore’s reefs. *Aquat Biol* 14: 265–275. Available:
395 <http://www.int-res.com/abstracts/ab/v14/n3/p265-275/>. Accessed 3 April 2014.
- 396 19. Gardner J, Boesche C, Meyer J, Wood A (2012) Analyses of DNA obtained from shells and
397 brine-preserved meat of the giant clam *Tridacna maxima* from the central Pacific Ocean. *Mar*
398 *Ecol Prog Ser* 453: 297–301. Available: <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v453/p297-301/>.
399 Accessed 3 April 2014. 397
- 400 20. Bell JD, Howell BR, Moskness E, Svasand T (1999) Restocking of giant clams: progress,
401 problems and potential. Stock enhancement and sea ranching. Papers from the First International
402 Symposium on Stock Enhancement and Sea Ranching, Bergen, Norway, 8-11 September 1997.
403 Fishing News Books Ltd., pp. 437–452. Available:
404 [http://www.cabdirect.org/abstracts/20000105557.html;jsessionid=EFA3818298D488B1DB22BD](http://www.cabdirect.org/abstracts/20000105557.html;jsessionid=EFA3818298D488B1DB22BDF69C29B78)
405 [F69C29B78](http://www.cabdirect.org/abstracts/20000105557.html;jsessionid=EFA3818298D488B1DB22BDF69C29B78). Accessed 15 August 2014.
- 406 21. Canapa a, Marota I, Rollo F, Olmo E (1999) The small-subunit rRNA gene sequences of venerids
407 and the phylogeny of bivalvia. *J Mol Evol* 48: 463–468. Available:
408 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079284>.
- 409 22. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary
410 Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729. Available:
411 <http://mbe.oxfordjournals.org/content/30/12/2725.short>. Accessed 9 July 2014.
- 412 23. Heled J, Drummond AJ (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol*
413 *Biol Evol* 27: 570–580. Available: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/27/3/570>. Accessed 11
414 July 2014.
- 415 24. Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform
416 population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564–567.
417 Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565059>. Accessed 15 July 2014.
- 418 25. Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Available:
419 <http://www.osti.gov/scitech/biblio/5943467>. Accessed 24 September 2014.
- 420 26. Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:
421 437–460. Available:
422 [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1202167&tool=pmcentrez](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1202167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
423 [&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1202167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract). Accessed 24 September 2014.
- 424 27. Tajima F (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA
425 Polymorphism. *Genetics* 123: 585–595. Available:
426 <http://www.genetics.org/content/123/3/585.abstract>. Accessed 24 September 2014.
- 427 28. Fu YX (1997) Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth,
428 Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147: 915–925. Available:
429 <http://www.genetics.org/content/147/2/915.abstract>. Accessed 24 September 2014.
- 430 29. Rogers A, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise
431 genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552–569. Available:
432 <http://mbe.oxfordjournals.org/content/9/3/552>. Accessed 24 September 2014.

- 433 30. Rogers AR (1995) Genetic Evidence for a Pleistocene Population Explosion. *Evolution*
 434 (N Y) 49: 608. Available: <http://www.readcube.com/articles/10.2307/2410314>. Accessed 24 September
 435 2014.
- 436 31. Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of Past Demographic Parameters From the
 437 Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to
 438 Human Mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079–1089. Available:
 439 <http://www.genetics.org/content/152/3/1079.abstract>. Accessed 24 September 2014.
- 440 32. Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range
 441 expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol Ecol* 13: 853–864.
 442 Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012760>. Accessed 24 September 2014.
- 443 33. Harpending HC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial
 444 DNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66: 591–600.
 445 Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8088750>. Accessed 10 September 2014.
- 446 34. DeBoer TS, Naguit MRA, Erdmann M V, Ablan-Lagman MC a, Carpenter KE, et al. (2014)
 447 Concordance between phylogeographic and biogeographic boundaries in the Coral Triangle:
 448 conservation implications based on comparative analyses of multiple giant clam species. *Bull*
 449 *Mar Sci* 90: 277–300. Available:
 450 <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=00074977&volume=90&issue=1&page=277>
 451 <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=00074977&volume=90&issue=1&page=277>
- 452 35. Woodruff DS (2003) Neogene marine transgressions, palaeogeography and biogeographic
 453 transitions on the Thai-Malay Peninsula. *J Biogeogr* 30: 551–567. Available:
 454 <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2699.2003.00846.x>. Accessed 13 August 2014.
- 455 36. Bard E, Hamelin B, Arnold M, Montaggioni L, Cabioch G, et al. (1996) Deglacial sea- level
 456 record from Tahiti corals and the timing of global meltwater discharge. *Nature* 382: 241–244.
 457 Available: <http://dx.doi.org/10.1038/382241a0>. Accessed 13 August 2014.
- 458 37. Dickinson WR (2004) Impacts of eustasy and hydro-isostasy on the evolution and landforms of
 459 Pacific atolls. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 213: 251–269. Available:
 460 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031018204003827>. Accessed 31 July 2014.
- 461 38. Arnaud-Haond S, Bonhomme F, Blanc F (2003) Large discrepancies in differentiation of
 462 allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the
 463 pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *J Evol Biol* 16: 388–398. Available:
 464 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635839>.
- 465 39. Pirazzoli PA (1986) Secular trends of relative sea-level (RSL) changes indicated by tide-gauge
 466 records. *J Coast Res; (United States)* SI:1.
- 467 40. Watson JR, Hays CG, Raimondi PT, Mitarai S, Dong C, et al. (2011) Currents connecting
 468 communities: nearshore community similarity and ocean circulation. *Ecology* 92: 1193–1200.
 469 Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21797147>. Accessed 26 September 2014.
- 470 41. Martinez E, Ganachaud A, Lefevre J, Maamaatuaiahutapu K (2009) Central South Pacific
 471 thermocline water circulation from a high-resolution ocean model validated against satellite data:
 472 Seasonal variability and El Niño 1997–1998 influence. *J Geophys Res* 114: C05012. Available:
 473 <http://doi.wiley.com/10.1029/2008JC004824>. Accessed 10 August 2014

474 **Figure Legends**

475 **Figure 1. Species relationships within *Tridacna* based on Bayesian phylogenetic trees for**
476 **mitochondrial *COI*, *16S* and *18S*.** The topology is a time calibrated maximum clade credibility
477 tree under a birth-death model. Bayesian posterior probabilities are above the branches. The 95%
478 heights of nodes are drawn in blue rectangle on significant nodes.

479

480 **Figure 2. Unrooted parsimony tree for mitochondrial *COI* of *Tridacna maxima* according to**
481 **the sampling locations.** Major lineages are colored: turquoise for South Mapiko, green for North
482 Mapiko, dark blue for West Pacific, red for Red Sea, orange for Sunda Strait and black for
483 Indonesia, Singapore, western New Guinea and Taiwan (Wallacea).

484

485 **Figure 3. Multi-dimensional scaling associated to the hierarchical clustering of the**
486 **population pairwise *Fst* differences.** The topology of the tree is an ascending hierarchical
487 clustering of the population pairwise *Fst* differences between the different sites. Axis 1 and 2 of
488 the MDS represent 68.7% and 24.1% of the total variance respectively. The geographic groups are
489 symbolized by colors (branches of the tree and points for MDS), red for West Tuamotu, orange
490 for East Tuamotu, pink for Gambier, green for Society and blue for Australes. The legend of the
491 plots indicates the corresponding island or site of the samplings. For Tahiti Island, sites of
492 samplings are noted: N for North, S for South and W for West.

493

494 **Figure 4. Map of French Polynesia showing the frequencies between the 2 Mapiko *COI***
495 **clades and the connectivity between 5 geographic locations.** Geographic groups are represented
496 by ellipses. For Tahiti Island, a zoom picture is included at the bottom left of the map.
497 Frequencies are illustrated in light grey for North Mapiko and strong grey for South Mapiko.
498 Solid line arrows indicate significant migration values (>2) between the corresponding geographic
499 groups and dotted line arrows between two sites. Open arrows indicate the present oceanic surface
500 currents and the swirling currents.

501 Supporting Information Legends

502 Table S1. Genbank accession numbers (XLS)

503 Table S2. Pairwise population FST differences and significant levels (XLS)

504 Table S3. AMOVA with Fst and Fct values (XLS)

505 Table S4. Migrant values (XLS)

506

507 Tables

508 Table 1. *Tridacna maxima* sampling information and genetic indexes based on
509 mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences.

510

Site	Geographic regions	n	Genetic diversity		Neutrality tests			Mismatch distribution	
			N _{hp}	h	π (percentage)	Tajima's D	Fu's FS	SSD	HRI
Maria	Australes	5	3	0.70 +/- 0.22	0.43 +/- 0.34	-1.12 ^{NS}	0.64 ^{NS}	0.09 ^{NS}	0.29 ^{NS}
Tubuai		5	4	0.90 +/- 0.16	0.65 +/- 0.48	-0.75 ^{NS}	-0.33 ^{NS}	0.17 ^{NS}	0.67*
Raivavae		27	11	0.70 +/- 0.10	0.61 +/- 0.37	-2.12**	-2.92 ^{NS}	0.55***	0.06 ^{NS}
Mangareva	Gambier	8	3	0.61 +/- 0.16	0.71 +/- 0.46	0.26 ^{NS}	2.75 ^{NS}	0.16 ^{NS}	0.29 ^{NS}
Reao	East Tuamotu	10	6	0.84 +/- 0.10	0.88 +/- 0.54	0.21 ^{NS}	-0.10 ^{NS}	0.10 ^{NS}	0.15 ^{NS}
Tatakoto		10	5	0.82 +/- 0.10	0.50 +/- 0.34	-1.53 ^{NS}	-0.27 ^{NS}	0.05 ^{NS}	0.19 ^{NS}
Hao		10	2	0.20 +/- 0.15	0.04 +/- 0.07	-1.11 ^{NS}	-0.34 ^{NS}	0.33 ^{NS}	0.4 ^{NS}
Makemo	West Tuamotu	11	4	0.67 +/- 0.12	0.49 +/- 0.33	-1.72*	1.05 ^{NS}	0.023 ^{NS}	0.07 ^{NS}
Kauehi		5	3	0.80 +/- 0.16	0.52 +/- 0.39	0 ^{NS}	0.95 ^{NS}	0.11 ^{NS}	0.36 ^{NS}
Tikehau		6	3	0.80 +/- 0.12	0.93 +/- 0.62	1.28 ^{NS}	2.58 ^{NS}	0.14 ^{NS}	0.22 ^{NS}
Kaukura		4	3	0.83 +/- 0.22	0.87 +/- 0.65	-0.82 ^{NS}	1.16 ^{NS}	0.16 ^{NS}	0.31 ^{NS}
Apataki		5	5	1.00 +/- 0.13	1.01 +/- 0.74	1.19 ^{NS}	-1.17 ^{NS}	0.12 ^{NS}	0.20 ^{NS}
Moorea	Society	7	3	0.67 +/- 0.16	1.18 +/- 0.74	1.77 ^{NS}	3.76 ^{NS}	0.21*	0.49*
West Tahiti		181	31	0.77 +/- 0.03	0.69 +/- 0.40	-1.18 ^{NS}	-13.96***	0.70 ^{NS}	0.18*
South Tahiti		8	3	0.46 +/- 0.20	0.43 +/- 0.31	-1.70*	1.57 ^{NS}	0.31***	0.23 ^{NS}
North Tahiti		12	5	0.58 +/- 0.16	0.63 +/- 0.40	-0.84 ^{NS}	0.69 ^{NS}	0.12 ^{NS}	0.34 ^{NS}

511 Samples sites, geographic region, number of sequences (n), number of haplotypes (N_{hp}),
512 haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π), Tajima's D, Fu's FS, sum of square deviation
513 (SSD) and Harpending's Raggedness index (HRI)

514 *0,05 \geq P \geq 0,01; **0,01>P \geq 0,001; ***P<0,001; NS, not significant.

Figures

Figure 1

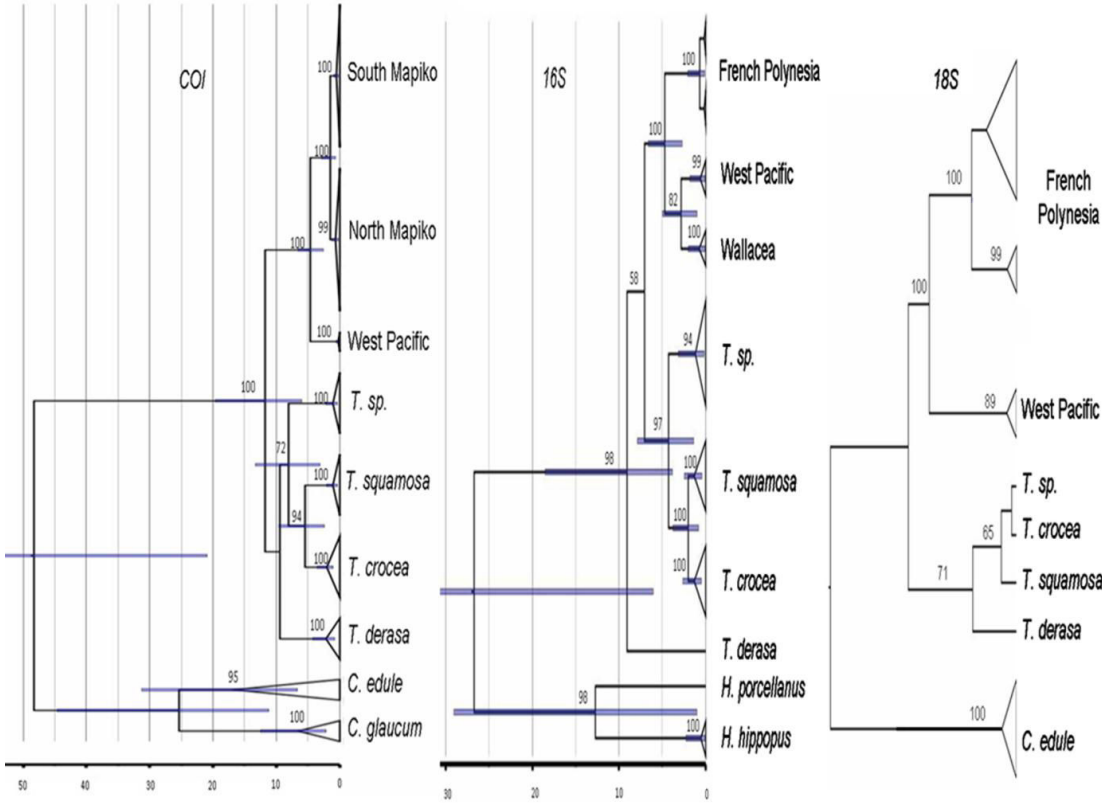


Figure 2

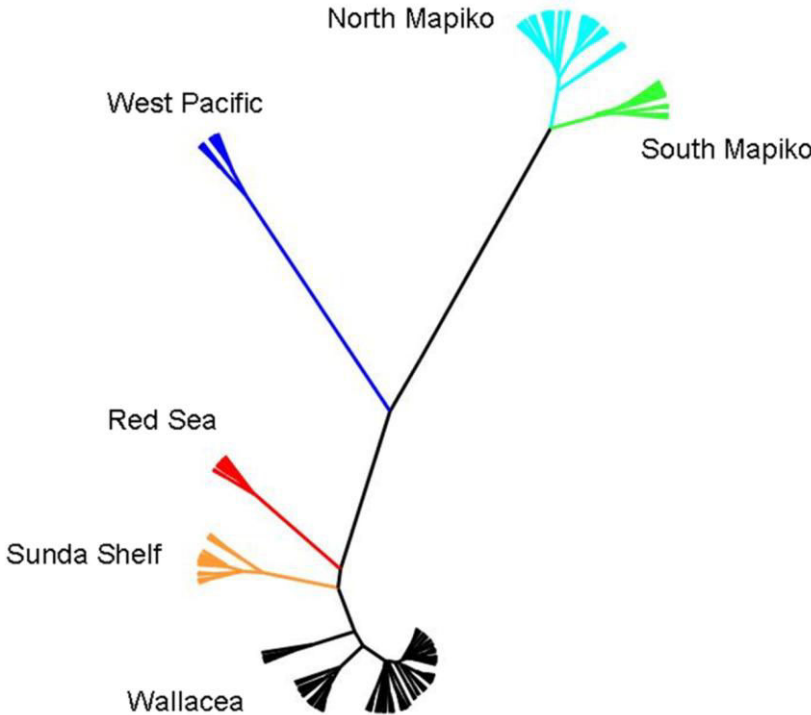


Figure 3

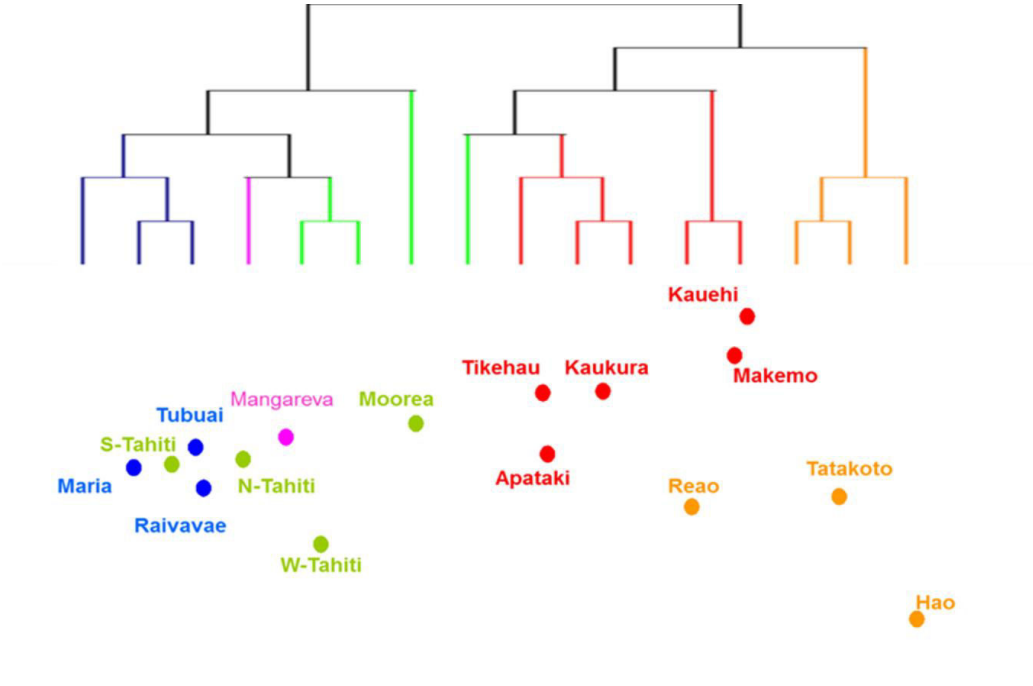
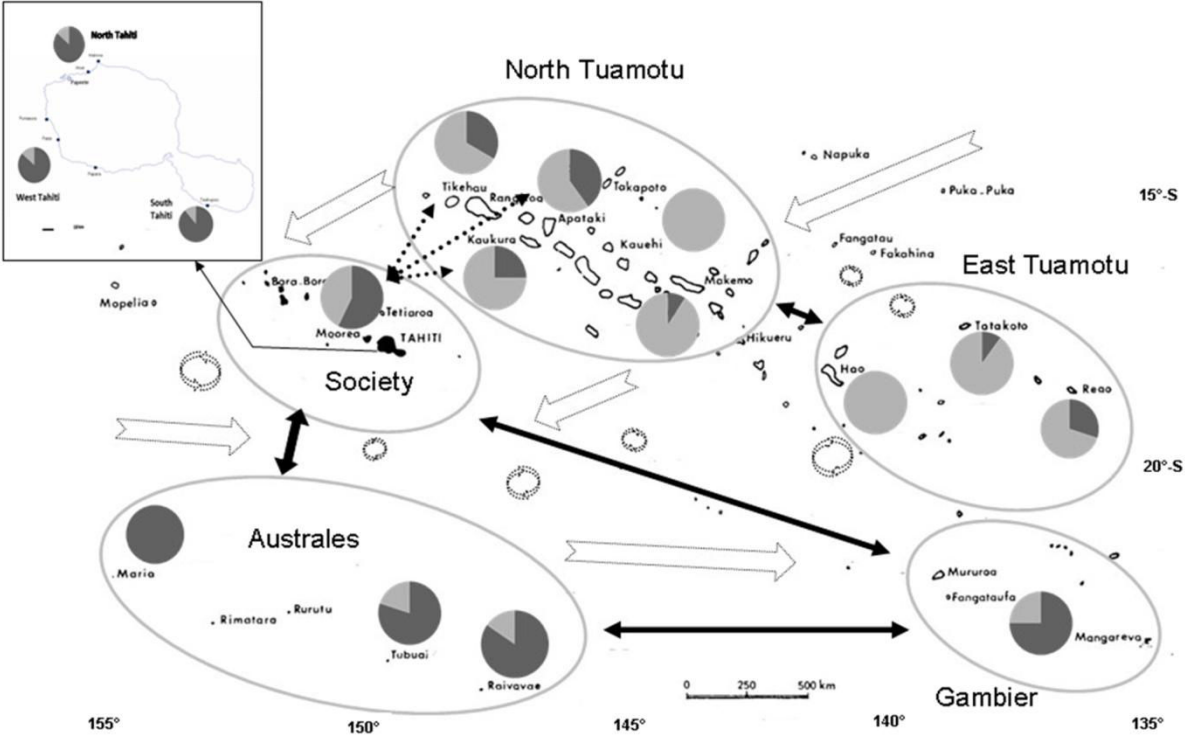


Figure 4



Annexe II : Tableau des caractéristiques des 392 échantillons de bénitiers de notre étude : nomenclature, lieu et date de récolte.

Archipel	île	Site	Echantillon	Données GPS corrigées		Date récolte
				Sud	Ouest	
Société	Tahiti	Punaauia	O1-O5	17°39' 16.73"S	149°36'3.05"O	15/02/2011
Société	Tahiti	Paea	120 échantillons 1ère expérience	17°42'13.64"S	149°35'8.99"O	23/09/2012
Société	Tahiti	Paea	48 échantillons 2ème expérience	17°42'13.64"S	149°35'8.99"O	15/10/2012
Société	Tahiti	Arue IRD	A1	17°31'3.47"S	149°32'26.71"O	01/03/2011
Société	Tahiti	Arue Lafayette	LF1-LF4	17°31'25.06"S	149°31'16.52"O	14/02/2013
Société	Tahiti	Mahina Pte Vénus	PV1-PV15	17°31'5.04"S	149°30'34.05"O	14/02/2013
Société	Moorea	Beachcomber	B1-B6	17°29'04.27"S	149°53'059"O	25/02/2011
Société	Moorea	Hilton	H1	17°28'9.75"S	149°50'5.71"O	25/02/2011
Tuamotu	Moruroa	Jeanne	J1-J8	21°48'38.35"S	138°49'28.67"O	08/02/2011
Tuamotu	Moruroa	Mouche	M1-M7	21°51'14.50"S	138°48'52.56"O	08/02/2011
Tuamotu	Moruroa	Requin	R1-R2	21°51'45.29"S	138°49'30.26"O	08/02/2011
Tuamotu	Moruroa	Telsite	T1-T8	21°48'32.62"S	138°50'04.10"O	08/02/2011
Tuamotu	Makemo	Marae Tefano	K1-K11	16°37'3.22"S	143°36'2.98"O	31/03/2011
Tuamotu	Apataki	Motu Ruahine	AP1-AP5	15°33'13,40"S	146°22'14,30"O	21.02.2013
Tuamotu	Kauehi		KH1-KH5	15°49'5,60"S	145°6'54,64"O	08/05/2013
Tuamotu	Kaukura		GPS8	15°38'5.56"S	146°49'5.07"O	04/11/2012
Tuamotu	Kaukura		GPS9	15°42'6.46"S	146°39'7.16"O	04/11/2012
Tuamotu	Kaukura		GPSBill	15°38'3.56"S	146°49'6.14"O	04/11/2012
Tuamotu	Kaukura		GPS11	15°39'7.06"S	146°46'5.27"O	04/11/2012
Tuamotu	Tikehau		TIK1-TIK6	15°6'19.47"S	148°12'0.09"O	01/05/2013
Tuamotu	Hao		HAO1-HAO10	18°12'21,70"S	140°58'48,30"O	28/01/2014
Tuamotu	Reao		REAO1-REAO10	18°28'57,26"S	136°26'25,49"O	28/01/2014
Tuamotu	Tatakoto		TKT1-TKT10	17°20'28,07"S	138°26'6,83"O	28/01/2014
Australes	Raivavae		RV1-RV3	23°51'1,18"S	147°35'21,10"O	01/04/2011
Australes	Raivavae	Rairua	RR1-RR10	23°51'56,9"S	147°41'06,8"O	07/06/2012
Australes	Raivavae	Motu Mano	MM1-MM5	23°53'47,2"S	147°41'06,5"O	07/06/2012
Australes	Raivavae	Rocher de femme	MF1-MF5	23°51'23,9" S	147°37'00,9"O	07/06/2012
Australes	Raivavae	Motu Piscine	MP1-MP5	23°52'51,6"S	147°37'29,3"O	07/06/2012
Australes	Raivavae	Motu One	MO1-MO6	23°52'32,74"S	147°36'40,64"O	21/03/2013
Gambiers	Mangareva	Motu Tenoko	G1-G6	23° 04' 34,6"S	135° 00' 43,8"O	06/05/2012
Gambiers	Mangareva	Baie de gatavake	GA1-GA4	23° 06' 51,3"S	134° 59' 32,2"O	03/05/2012
Australes	Raivavae	Frangeant	RAI 1-RAI3	23°51'5.50"S	147°41'0.46"O	11/04/2013
Australes	Raivavae	Barriere	RAI 4-RAI5	23°53'3.76"S	147°42'5.37"O	12/04/2013
Australes	Tubuai	Barriere	TUB 1-TUB5	23°24'7.89"S	149°27'2.19"O	14/04/2013
Australes	Maria		MAR 1-MAR5	21°48'7.76"S	154°41'3.45"O	20/04/2013
Fidji	Viti Levu		F1	18°8'47.79"S	178°20'57.77"O	21/03/2013
Fidji	Viti Levu		F2	18°8'50.53"S	178°20'52.79"O	21/03/2013
Fidji	Viti Levu		F3	18°9'37.08"S	178°21'12.38"O	21/03/2013
Fidji	Viti Levu		F4	18°8'36.72"S	178°22'39.30"O	21/03/2013

Fidji	Viti Levu		F5	18°8'35.69"S	178°22'41.32"O	21/03/2013
Fidji	Viti Levu		F6	18°9'54.63"S	178°20'17.44"O	21/03/2013
Fidji	Viti Levu	Navakavu	F7	18°8'23.00"S	178°23'26.69"O	2013
Fidji	Viti Levu	Navakavu	F8	18°8'23.00"S	178°23'26.69"O	2013
Fidji	Viti Levu	Navakavu	F9	18°8'23.00"S	178°23'26.69"O	2013
Fidji	Viti Levu	Navakavu	F10	18°8'23.00"S	178°23'26.69"O	2013
Fidji	Viti Levu	Navakavu	F11	18°8'23.00"S	178°23'26.69"O	2013
Tonga			TG1-TG13	21°5'5.42"S	175°21'5.79"O	07/11/2013

Annexe III : Tableau bilan sur l'identification des clades de *Symbiodinium* présents au sein des échantillons de bénitiers. Seuls les échantillons dont la combinaison de clades a pu être déterminée sont présents dans ce tableau.

île	Echantillon	PCR nichée			28S	Amplification avec amorces hétérogènes			Bilan combinaison clades	Clade de bénitier
		A	C	D		A	C	D		
										Ind
Moruroa	J1	x	-	-	A3 ?				A3	Ind
Moruroa	J3	x	-	-					A	Ind
Moruroa	J4	x	x	-	C1-2-15-90-91				A C1-2-15-90-91	Ind
Moruroa	J5	x	x	-					A C	Ind
Moruroa	J6	x	x	-	C1-2-15-90-91				A C1-2-15-90-91	Ind
Moruroa	J7	x	x	-					A C	Ind
Moruroa	J8	x	x	-	C1-2-15-90-91				A C1-2-15-90-91	Ind
Moruroa	M1	x	x	-	A3				A3 C	Ind
Moruroa	M3	x	x	-					A C	Ind
Moruroa	M4	x	x	-					A C	Ind
Moruroa	M5	x	x	-	A Ind				A C	Ind
Moruroa	M6	x	-	-	A3				A3	Ind
Moruroa	M7	x	-	-	A3				A3	Ind
Moruroa	T1	x	x	-	A3 ?				A3	Ind
Moruroa	T2	x	x	-	A3-4-13				A3-4-13 C	Ind
Moruroa	T3	x	x	-					A C	Ind
Moruroa	T4	x	x	-	C1-2-15-90-91				A C1-2-15-90-91	Ind
Moruroa	T5	x	x	-	C Ind				A C	Ind
Moruroa	T6	x	x	-					A C	Ind
Moruroa	T7	x	x	-					A C	Ind
Moruroa	T8	x	-	-	A3				A3	Ind
Tahiti	O1	x	x	-	C1-2-15-90-91				A C1-2-15-90-91	Sud
Tahiti	O2	x	x	-	C1-2-15-90-91				A C1-2-15-90-91	Sud
Tahiti	O3	x	x	x	A3			D	A3 C D	Sud
Tahiti	O4	x	x	-	A3				A3 C	Sud
Tahiti	P1	x	x	-	A3				A3 C	Sud
Tahiti	P2	x	x	-	A3-4-13				A3-4-13 C	Sud

île	Echantillon	PCR nichée			28S	Amplification avec amorces hétérogènes			Bilan combinaison clades	Clade de bénytier
Tahiti	P3	x	x	-	A3				A3 C	Sud
Tahiti	P4	x	x	-					A C	Sud
Tahiti	P5	x	x	-	A3				A3 C	Sud
Tahiti	P6	x	x	-					A C	Sud
Tahiti	P7					A3	C1-2-90		A3 C1-2-90	Ind
Tahiti	P8					A3	C Ind		A3 C	Sud
Tahiti	TEA1	x	x	-					A C	Sud
Tahiti	TEA2	x	x	-	A3 ?				A C	Sud
Tahiti	TEA3	x	x	-					A C	Sud
Tahiti	TEA4	x	x	-	C Ind				A C	Sud
Tahiti	TEA5	x	x	-					A C	Nord
Tahiti	A1	x	-	-					A	Sud
Moorea	B1	x	x	-					A C	Sud
Moorea	B2	x	-		A3				A3	Nord
Moorea	B3	x	x	-	A3				A3 C	Nord
Moorea	B5	x	x	-	C1-2-15-90-91				A C1-2-15-90-91	Sud
Raivavae	RR4					A3	C57		A3 C57	Ind
Raivavae	MM4					A3	C57		A3 C57	Sud
Raivavae	MF4					A3	C57		A3 C57	Ind
Raivavae	MP1					A3	C57		A3 C57	Sud
Raivavae	MP5					A3	C57		A3 C57	Sud

Annexe IV : Tableau des caractéristiques des échantillons de bénitiers utilisés pour réaliser le transcriptome global de *T. maxima*. a/ premier séquençage, b/ second séquençage

a/

Echantillon	Origine	Taille	Couleur	Organe	Stress
PV13visc3	Pointe Vénus	10	Marron	V	T° 30'
PV14mant2	Pointe Vénus	5	Mauve	M	Mécanique
PV14visc3	Pointe Vénus	5	Mauve	V	Mécanique
PV15mant3	Pointe Vénus	5	Gris	M	Lumière 30'
PV15visc3	Pointe Vénus	5	Gris	V	Lumière 30'
PPT2	Taaone	7	Marron	M	-
L1 : mant	Tuamotu	13	Bleu	M	-
L3 : mant	Tuamotu	13	Bleu	M	-
L8 : visc	Tuamotu	13	Bleu	V : foie	-
L9 : mant	Tuamotu	13	Bleu	M	-
PV6 : visc	Pointe Vénus	8	Beige-vert	V	(Bcp épiphytes)
PV7' : visc	Pointe Vénus	8	Marron	V	Salin

b/

Echantillon	Origine	Taille	Couleur	Organe	Stress
1C	Papara	7	Beige/marron	Coeur	Lumière 30'
2C	Papara	6	Bleu/violet	Branchies	Salin 30'
3C	Papara	8	Beige/marron	Muscle adducteur	Dessication
4C	Papara	4	Bleu/violet	Muscle + branchies	-
6C	Punaauia	13	Marron/orange	Muscle adducteur	-
7C	Punaauia	8 3	Beige/vert beige	Muscle adducteur Muscle adducteur	Salin 30' -
9C	Punaauia	13	Marron/orange	Muscle adducteur	-
10C	Punaauia	8	Beige/vert	Branchies	Salin 30'
1B	Papara	7	Beige/marron	Branchies	Lumière 30'
2B	Papara	6	Bleu/violet	Branchies	Salin 30'
3B	Papara	8	Beige/marron	Muscle adducteur	Dessication
4B	Papara	4	Bleu/violet	Muscle + branchies	-
5B	Papara	4	Marron/beige/bleu	Muscle + branchies	-
6B	Punaauia	13	Marron/orange	Coeur	-
7B	Punaauia	8 3	Beige/vert Beige	Muscle adducteur Muscle adducteur	Salin 30' -
9B	Punaauia	13	Marron/orange	Branchies	-
10B	Punaauia	8	Beige/vert	Branchies	Salin 30'

Résumé : Les bénitiers font partie des espèces protégées, mais l'espèce *Tridacna maxima* reste encore très présente en Polynésie française. L'étude de sa structure génétique a permis de caractériser pour la première fois une lignée monophylétique de bénitiers en Polynésie Française, composée de deux clades distincts répartis de part et d'autre d'un axe nord-ouest/sud-est séparant majoritairement les populations des Tuamotu (*mapiko nord*) de celles des autres archipels (*mapiko sud*). La connectivité entre les populations des différentes îles n'est pas cohérente avec les courants océaniques de surface actuels en Polynésie française. Ces résultats, et ceux obtenus sur des bénitiers provenant de Fidji et de Tonga, ont permis d'émettre des hypothèses sur la colonisation de la Polynésie française par les bénitiers et les facteurs qui ont influencé la connectivité actuelle. Présentant une plus faible diversité génétique que les populations de *T. maxima* de la région Indo-Pacifique, celles de Polynésie française pourraient être plus vulnérables aux changements environnementaux. La capacité d'adaptation au stress des bénitiers a été étudiée par une étude intégrée des variations de la composition en métabolites et de l'expression génique lors d'expériences de réchauffement. La composition en acides gras des bénitiers a notamment été établie pour la première fois lors de nos travaux, et sa variation évaluée au cours du stress. Les données de transcriptomiques ont pour la première fois mise à jour les voies de réponses au stress thermique chez les bénitiers dont certaines semblent corrélées aux variations observées de la composition en acide gras. L'effet de la proximité des bénitiers avec les coraux dans le milieu et l'impact d'un second type de stress supplémentaire ont également été évalués. L'étude des *Symbiodinium* des bénitiers a permis de montrer que leur résistance et leur capacité d'adaptation au stress d'une durée de 15 jours seraient indépendantes des communautés symbiotiques.

Mots clé : *Tridacna maxima*, bénitier, Polynésie française, diversité génétique, stress thermique, étude intégrée, transcriptomique, métabolomique, *Symbiodinium*.

Abstract: Giant clams are endangered species but *Tridacna maxima* is still well represented in French Polynesia. Firstly, the genetic structure assessment has led to the discovery of a monophyletic group composed of two new *T. maxima* clades in French Polynesia which cohabite over a large area with a North-West South-East axis on either side of which, one of each clade is dominant: "North Mapiko" (Tuamotu group) and "South Mapiko" (other archipelagos group). Interconnectivity between different island giant clam populations is not consistent with the present flow of oceanic currents. These results, along with those obtained for Tongian and Fijian samples, allowed us to suggest hypothesis regarding the giant clam colonization of French Polynesia and the factors which may have influenced the present connectivity. French Polynesian *T. maxima* was found to have a lower genetic diversity compared to those from Indo-Pacific region, and so considered to be relatively more vulnerable to environmental global changes. Stress adaptation capacity of giant clam was assessed by the follow-up of the metabolite composition and gene expression variations during a thermal time course experiment. Giant clam fatty acid composition was established for the first time and its variation was evaluated along the stress experiment. Impact of the thermal stress on the metabolite composition and gene expression were disclosed. Variation in fatty acids compositions was observed and linked to variation in some specific gene expression. Impact of giant clam proximity with corals and impact of a second supplementary applied stress were also assessed. Study of *Symbiodinium* symbiosis with giant clam showed that giant clam resistance and adaptation capacity observed for 15 days was independent of symbiotic community behavior.

Key words : *Tridacna maxima*, giant clam, French Polynesia, genetic diversity, thermal stress, integrative approach, transcriptomic, metabolomic, *Symbiodinium*.