



HAL
open science

**Étude de la diversité neutre et adaptative chez
l'anémone de mer symbiotique *Anemonia viridis*: apport
de techniques de type Next-Generation Sequencing dans
les questions de délimitation d'espèces et d'adaptation
locale**

Cédric Mallien

► **To cite this version:**

Cédric Mallien. Étude de la diversité neutre et adaptative chez l'anémone de mer symbiotique *Anemonia viridis*: apport de techniques de type Next-Generation Sequencing dans les questions de délimitation d'espèces et d'adaptation locale. *Ecologie, Environnement*. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT: 2017AZUR4111 . tel-01852571

HAL Id: tel-01852571

<https://theses.hal.science/tel-01852571v1>

Submitted on 2 Aug 2018

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.



École doctorale Sciences Fondamentales et Appliquées
Unité de recherche : Symbiose Marine

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en

Sciences de l'Environnement

de l'Université Côte d'Azur

par

Cédric Mallien

Etude de la diversité neutre et adaptative chez l'anémone de mer symbiotique *Anemonia viridis*

*Apport de techniques de type Next-Generation Sequencing
dans les questions de délimitation d'espèces
et d'adaptation locale*

Dirigée par Paola Furla et co-dirigée par Didier Forcioli

Soutenue le **04 décembre 2017**

Devant le jury composé de :

Denis ALLEMAND	Pr., Centre Scientifique de Monaco	Rapporteur
Jean-François FLOT	Dr., Université Libre de Bruxelles	Rapporteur
Pierre-Alexandre GAGNAIRE	CR CNRS, Institut des Sciences de l'évolution de Montpellier	Examineur
Dominique HIGUET	Pr., Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Jörg WIEDENMANN	Pr., Coral Reef Laboratory, Université Southampton	Examineur
Paola FURLA	Pr., Symbiose Marine, Université Côte d'azur	Directrice de thèse
Didier FORCIOLI	Dr., Symbiose Marine, Université Côte d'azur	Co-Directeur de thèse

L'étude des capacités d'acclimatation et d'adaptation, en réponse aux variations environnementales est un enjeu central en biologie évolutive, notamment chez les Cnidaires. La mesure du potentiel d'adaptation des Cnidaires, par l'étude de l'adaptation locale, peut permettre de mieux appréhender la manière dont ceux-ci vont être impactés par le changement climatique. Toutefois, l'étude du potentiel d'adaptation d'une espèce doit d'abord passer par une phase de clarification de son statut taxonomique, les espèces cryptiques étant particulièrement fréquentes chez les Cnidaires. L'anémone de mer symbiotique *Anemonia viridis* se développe dans des environnements particulièrement contrastés, faisant d'elle un modèle d'étude idéal pour l'étude de l'adaptation locale chez les Cnidaires. Nous nous sommes tout d'abord consacrés au statut taxonomique de trois des morphes d'*A. viridis* (var. *rufescens*, *rustica* et *smaragdina*) à l'aide de marqueurs moléculaires basés sur des gènes de stress et des marqueurs RAD. Nous avons pu déterminer que les morphes ne formaient pas des espèces séparées et mis en évidence quatre lignées génétiques indépendantes sur base de la géographie (trois en mer Méditerranée, une dans la Manche). Par l'utilisation des variations des séquences ITS2, nous n'avons pu détecter aucune implication du symbiote (*Symbiodinium* sp.) dans la différenciation des morphes, mais nous avons révélé une composition en symbiotes divergente entre les lignées génétiques indépendantes de l'hôte animal. L'adaptation locale chez *A. viridis* a été testée en comparant des populations venant de sites aux conditions environnementales contrastées (surface vs. profondeur et lagune vs. mer). Une recherche de loci outliers sur des marqueurs RAD et des marqueurs de gènes de stress n'a toutefois révélé aucun gène candidat dans l'adaptation locale par rapport aux conditions environnementales testées. Ce travail a donc permis de définir *A. viridis* comme un organisme extrêmement plastique capable de posséder un fort polymorphisme intrinsèque et de s'acclimater à des habitats contrastés.

Mots clés : Cnidaires symbiotiques, Changement climatique, NGS, RADseq, Taxonomie, Plasticité phénotypique, Adaptation locale.

The study of the acclimation/adaptation balance in the response to environmental variations is a fundamental question in evolutionary biology. In the face of climate change, the cnidarian phylum is particularly impacted. A study of its adaptive potential, through the study of local adaptation, could help apprehend how this phylum will be impacted in the future. However, deficient species delimitation frequent in cnidarians that harbour many cryptic species could result in poorly efficient protection plan for this species. Thus, the study of the adaptive potential of a species must start with a clarification of its taxonomical status. The symbiotic sea anemone *Anemonia viridis* highly contrasted environments, making it an ideal species to study local adaptation. First, the taxonomical status of three of the morphs of *A. viridis* (var. *rufescens*, *rustica* and *smaragdina*) was studied using stress gene markers and RAD markers. We revealed that the morphs were not different species, but that *A. viridis* was split into four polymorphic independent genetic lineages based on geographical origin (three in the Mediterranean Sea, one in the English Channel). Using ITS2 sequence variation, we could not detect any implication of the symbiont (*Symbiodinium* sp) in the morph differentiation, but we revealed a divergence in symbiont composition among the geographic independent lineages of the animal host. If no effect of the symbiont was detected, a variable distribution of the ITS2 variants based on geography was revealed. Local adaptation was tested on *A. viridis* by comparing populations coming from contrasted environments (shallow vs. deep and lagoon vs. sea). Using RAD and stress genes markers in a search for outlier loci, we revealed no candidate adaptive genes under our environmental conditions. In conclusion, *Anemonia viridis* seems to be a very plastic organism, with a high intrinsic polymorphism and a high acclimation potential.

Keywords: Symbiotic cnidarians, Climate change, NGS, RADseq, Taxonomy, Phenotypic plasticity, Local adaptation.

Remerciements

Une thèse, c'est finalement le travail d'une équipe. Elle ne se fait pas sans mal, mais la charge que cette thèse représente est facilement allégée par les personnes qui nous entourent, tant au niveau du lieu de travail qu'à la maison. Alors je voudrais dire à tous ces gens, qui m'ont côtoyé pendant ces quatre années de thèse, un grand merci !

Tout d'abord merci à Paola et Didier, qui m'ont accueilli si généreusement dans ce labo après le mémoire de Master 2 que j'avais déjà passé à leur côté. La confiance que vous m'avez attribuée m'a toujours poussé à aller de l'avant. Merci à vous deux pour votre contribution à mon épanouissement scientifique et personnel. Plus particulièrement, Paola, pour ton indéniabte attitude positive en toute circonstance et ton humeur tellement expressive que cela finissait toujours par contaminer les autres. Merci à toi aussi Didier, pour m'avoir expliqué avec une grande patience les différents concepts que je ne maîtrisais que très peu. Et merci aussi d'avoir été présent dans les moments difficiles, comme lors des derniers jours de la rédaction d'une thèse !

Par extension, je souhaite aussi remercier le Pr. Dominique Higuët pour les opportunités qu'il nous a données de faire connaître nos travaux parmi les confrères parisiens. Merci d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Merci aussi aux autres membres du jury, Pr. Denis Allemand, Dr. Jean-François Flot, Dr. Pierre-Alexandre Gagnaire et Pr. Jörg Wiedenmann de prendre de leur temps pour lire ce manuscrit et participer à la défense.

Je voudrais aussi remercier les membres de l'équipe Symbiose Marine. Merci à toi Brigitte pour ton aide implacable dans tout ce qui touche à l'administration mais aussi aux nombreux tests culinaires que tu nous as fait goûter grâce à ton fameux Thermomix. Merci à Thamilla, la formatrice paillasse de la première heure, de nous apprendre les bonnes manières de laborantin. Merci à toi Stéphanie, pour l'aide quotidienne que tu peux apporter dans ce labo, mais aussi pour tous les conseils que tu prodigues, cela allant de quel produit pour quelle manip à... quel est le resto que tu conseilles en ce moment... Toujours les bons choix ! Merci à Richard pour tous ses bons conseils à tout ce qui touchait à la bioinformatique ! Une petite pensée va aussi à PLM, membre de l'équipe à part entière et qui aura laissé des traces indélébiles dans la manière de répondre aux questions...merci !

Je souhaite également remercier Cécile et Fabrice, avec qui j'ai partagé de nombreux repas...souvent un peu rapide...mais le travail n'attend pas ;-) Merci pour tous vos conseils et votre bonne humeur !

Mes remerciements vont ensuite aux doctorants que j'ai côtoyé tous les jours.

Merci à toi Barbara (ou Tac), jumeau de labo qui raconte tout de mes danses solo dans le labo... alors qu'il n'y avait pas de musique... Merci de m'avoir fait découvrir le vrai Nice, l'authentique, par les nombreuses sorties organisées dans la région... ça me manquera ! Mais avant tout merci pour ta présence et ton dévouement tant au labo qu'en dehors en tant qu'amie. A la prochaine... On se fait un Fût ? N'oublie pas ton opinel ! ;-)

Ludmilla, this part is for you ! Even if you were part time in Nice, part time in Poland I was happy to share a common subject with you even if sea anemones are much better than cockles! You helped me a lot during these years, thank you for that.

Patricia...je te le concède, le Portugal... c'est sympa ! Mais pas autant que la Belgique ! Je n'oublierai jamais Hawai'i en ta compagnie, la préparation des Arancini et les soirées à l'Altra Casa. De collègue qui parle bizarrement, tu es rapidement devenue une véritable amie...mais qui parlait toujours bizarrement, comme moi apparemment (je n'ai jamais compris pourquoi on me disait cela d'ailleurs... peut-être les septante et les nonante...). Tu m'as appris que manger à 18h30 ce n'est pas normal... et je t'ai appris qu'il fallait me prévenir avant 18h30 lorsqu'un resto se profilait. En tout cas, merci pour tout !

*Pierre, n'oublie pas de vérifier ton câble d'accélérateur la prochaine fois que tu montes à la montagne... et évite de donner trop de calmants à Toa lors des voyages en voiture... tu vois bien que ses yeux disent m**** ! Merci pour toutes ces sorties, de la plage à la montagne, à travers tous les temps et toutes les saisons. Merci aussi pour toutes les expériences culinaires que tu proposes... même si je reste convaincu qu'une bonne gaufre c'est une gauf' avec du sucre perlé et plein de beurre ! Sinon ça caramélise pas !*

Vincent, un voisin de bureau, mais aussi un véritable ami. Simplement merci pour toutes ces discussions, les « café en bas ? » et les bons moments passés en ta compagnie. Les salles de sports vont paraître tristes maintenant ! N'oublie pas... 2-7-0-93 !

Les doctorants c'est une chose, mais il y a aussi une panoplie de stagiaires. Tout d'abord merci à Caroline, Julie et Emilie pour avoir contribué à l'aboutissement de cette thèse... finalement c'est aussi grâce à vous et votre enthousiasme. Merci particulièrement à Petite Raptor pour être devenue une amie et une confidente. Merci aussi aux nombreux autres stagiaires que j'ai côtoyé de près ou de loin... les premiers Claire, Françoise, Val' et les derniers Clara et Eugenio ; vous avez tous amené un vent de fraîcheur au sein du labo. Merci !

Je finirai par remercier ceux qui sont là les bons jours mais vous soutiennent dans les moments difficiles : les amis et la famille !

Merci à Anne et Thomas ! Se retrouver chaque année à la mer depuis plus de 20 ans est comme une bouffée d'oxygène nécessaire pour bien repartir pendant un an ! Merci à Fabienne, prof de guitare, partenaire de whist, amie et j'en passe qui a supporté pendant toutes ces années les fausses notes, les barrés qui grincent et les rythmes plus qu'approximatifs, tout ceci ressemble beaucoup à la thèse finalement... Merci à mes amis proches Alice, Benjamin, Damien, Marie et Sophie, toujours présents pour déconner quand il le faut, toujours contents de me revoir malgré la distance qui nous sépare parfois, mais d'un soutien infailible à travers chaque épreuve... Merci à ma famille, mes oncles, tantes et cousins de croire en moi et en ce que j'entreprends. Merci d'organiser les repas de famille quand je peux revenir et ainsi revoir tout le monde ! Et finalement, merci à mes parents sans qui tout ceci ne serait pas possible. Merci de travailler encore ce soir, le dernier jour avant l'impression, à embellir cette thèse. Merci de garder Comète quand je ne suis pas là et d'en prendre soin comme jamais je n'en serai capable. Mais avant tout merci pour votre patience, votre gentillesse et votre amour !

Vous me donnez des ailes !

Table des matières

Liste des illustrations.....	1
Liste des tableaux.....	3
Liste des publications et des communications orales	5
Préambule	9
Chapitre 1 Introduction.....	11
1.1 Stratégies de réponse aux stress	13
1.2 Les mécanismes de l'adaptation locale	18
1.2.1 Le potentiel d'adaptation	18
1.2.2 Conditions pour la mise en place de l'adaptation locale.....	18
1.3 Les changements environnementaux.....	19
1.3.1 Le changement climatique	19
1.3.2 Les stratégies de réponse face au changement climatique	22
1.3.3 L'adaptation locale comme outil pour l'estimation du potentiel d'adaptation dans le cadre du changement climatique.....	23
1.3.4 Le changement environnemental et les Cnidaires	24
1.4 Les Cnidaires	24
1.4.1 L'Embranchement des Cnidaires	24
1.4.2 La Classe des Anthozoaires	26
1.4.3 La symbiose	29
1.4.4 <i>Anemonia viridis</i> (Forskål, 1775).....	34
1.5 Objectifs de la thèse	35
Chapitre 2 Stratégies expérimentales	37
2.1 Détection des variations génétiques et marqueurs moléculaires choisis	39
2.1.1 Les marqueurs EPIC.....	39
2.1.2 Les marqueurs RADseq.....	41
2.2 Stratégie expérimentale pour la délimitation des espèces chez <i>Anemonia viridis</i>	44
2.2.1 Stratégie d'échantillonnage.....	44
2.2.2 Marqueurs moléculaires.....	47
2.2.3 Clefs d'analyse	49
2.3 Stratégie expérimentale pour la détection de l'adaptation locale chez <i>Anemonia viridis</i>	51
2.3.1 Stratégie d'échantillonnage.....	52
2.3.2 Marqueurs moléculaires.....	53
2.3.3 Clefs d'analyse	54
Chapitre 3 Délimitation d'espèces au sein d' <i>Anemonia viridis</i>	55
3.1 Le concept d'espèce	57

3.1.1	Espèces cryptiques	58
3.1.2	Variation morphologique sans spéciation.....	59
3.1.3	Délimitation d'espèces	60
3.1.4	Mécanismes de spéciation	62
3.2	Le cas d' <i>Anemonia viridis</i>	64
3.2.1	Classification des Actiniaires.....	65
3.2.2	Les morphes d' <i>Anemonia viridis</i>	65
3.3	Analyse du statut taxonomique des morphes d' <i>A. viridis</i>	68
3.3.1	Article 1	69
3.3.2	Article 2	117
3.3.3	Résultats majeurs et conclusion synthétique.....	147
Chapitre 4 Adaptation locale chez <i>Anemonia viridis</i>		153
4.1	Introduction	155
4.2	Results and discussion.....	159
4.3	Conclusion.....	164
Chapitre 5 Conclusions et Perspectives		165
5.1	L'origine des morphes d' <i>Anemonia viridis</i>	167
5.2	Adaptation locale et plasticité phénotypique chez <i>Anemonia viridis</i>	170
Annexe A : Protocole de mise au point des EPICs		173
Annexe B : Protocole de mise au point des banques RAD.....		179
Annexe C Local adaptation in <i>A. viridis</i> : material and methods		193
Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing		197
Glossaire.....		205
Bibliographie		209

Liste des illustrations

Figure 1.1 : Décalage de distribution de poissons et Invertébrés marins sur la côte Est de l'Australie	14
Figure 1.2 : Présentation hypothétique de l'effet de l'acclimatation sur deux génotypes..	16
Figure 1.3 : Présentation hypothétique de l'effet de l'acclimatation sur deux génotypes..	17
Figure 1.4 : Scénarios RCP prédisant l'évolution de la concentration en CO ₂	20
Figure 1.5 : Changements dans la chimie et la physique des océans.	22
Figure 1.6 : Arbre phylogénétique représentant les cinq Classes parmi l'Embranchement des Cnidaires.	26
Figure 1.7 : Arbre phylogénétique de la Classe des Anthozoa	27
Figure 1.8 : Anatomie générale d'un Anthozoaire.	28
Figure 1.9 : Coupe électronique dans les tissus d' <i>A. viridis</i>	29
Figure 1.10 : Arbres phylogénétiques construits en maximum de vraisemblance à l'aide de deux marqueurs moléculaires classiquement utilisés pour la phylogénie du genre <i>Symbiodinium</i>	31
Figure 1.11 : Photo de deux anémones <i>A. viridis</i>	35
Figure 2.1 : Présentation d'un gène alternant introns et exons à partir duquel des amorces se situant dans les exons flanquant un intron spécifique sont mises au point.	40
Figure 2.2 : Etapes de construction d'une banque RADseq.	43
Figure 2.3 : Huit sites d'échantillonnage pour l'approche « EPIC Sanger »	45
Figure 2.4 : Cinq sites d'échantillonnage pour l'approche RADseq	46
Figure 2.5 : Différents arbres de gènes au sein d'un même arbre d'espèces.	50
Figure 2.6 : Cinq sites d'échantillonnage en Mer Méditerranée pour l'adaptation locale.	53
Figure 3.1 : Concept de zone grise de De Queiroz (2007) dans lequel la boucle de taxonomie intégrative a été implémentée par Pante et al. (2015) dans le but de délimiter différentes espèces pouvant être en cours de spéciation.	61
Figure 3.2 : Identification des différents morphes d' <i>Anemonia viridis</i> par la couleur des tentacules et par leur profil fluorescent.	67
Figure 4.1 : Distribution hypothétique des valeurs F_{st}	156
Figure 4.2 : Principal components analysis using PCAdapt package in R.	162
Figure 4.3 : Venn diagram grouping sites with the same ecological patterns.....	163
Figure 5.1 : Partie de l'arbre individuel SVDQuartets (Article 2) présentant la lignée Med1.....	168

Liste des tableaux

Table 2.1 : Liste des individus échantillonnés pour le séquençage Sanger	45
Table 2.2 : Individus échantillonnés pour l'étude du statut taxonomique des trois morphes d' <i>A. viridis</i>	46
Table 2.3 : Pipeline de mise au point des marqueurs EPIC de gènes de stress.	47
Table 2.4 : Individus échantillonnés pour l'étude de l'adaptation locale chez <i>A. viridis</i>	52
Table 4.1 : Summary of the characteristics of each population and standard genetic diversity measures. ...	160
Table 4.2 : Pairwise F_{st} values among populations.	160

Liste des publications et des communications orales

Publications

Mallien C., Porro P., Zamoum T., Olivier C., Wiedenmann J., Furla P., Forcioli D. (2017). Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria). Systematics and Biodiversity

Mallien C., Porro P., Pey A., Aubin E., Christen R., Furla P., Forcioli D. Morphological differentiation and species delimitation within the holobiont *Anemonia viridis*. In prep.

Communications orales

C. Mallien , D. Forcioli, P. Furla. “Neutral and Adaptive Diversity in the Sea Anemone *Anemonia viridis*”. Journée Evolution of the UMR 7138, Paris, France, May 2014.

C. Mallien , B. Porro, T. Zamoum, P. Furla, D. Forcioli. “Espèces cryptiques, ecomorphes et profils GFP/GFP-like chez un cnidaire *Anemonia viridis*.” GDR Marine Connectivity Meeting, Sète, France, June 2014.

C. Mallien, C. Olivier, B. Porro, T. Zamoum, P. Furla, D. Forcioli “GFP morphs in the cnidarian *Anemonia viridis*: For once, morphological variation without a genetic differentiation?” GDR Marine Connectivity Meeting, Montpellier, France, September 2015

C. Mallien, B. Porro, P. Ventura. “Team Marine Symbiosis, Themes and Thesis presentations”. Journée Evolution of the UMR 7138, Paris, France, February 2016.

C. Mallien, E. Aubin, R. Christen, P. Furla, D. Forcioli “Morphs and Speciation in the Symbiotic Temperate Sea Anemone *Anemonia viridis*” 13th International Coral Reef Symposium, Honolulu, HI, USA, June 2016.

Communications poster

C. Mallien, B. Porro, T. Zamoum, D. Forcioli and P. Furla GFP morphs in the cnidarian *Anemonia viridis* : For once, morphological variation without a genetic differentiation?" 21st Benelux Congress of Zoology, Liège, Belgium, December 2014

C. Mallien, C. Olivier, T. Zamoum, P. Furla and D. Forcioli "GFP morphs in the cnidarian *Anemonia viridis* : For once, morphological variation without a genetic differentiation?" 15th Congress of the European Society of Evolutionary Biology, Lausanne, Switzerland, August 2015

*« L'homme, c'est la seule espèce animale qui puisse concevoir
l'idée de sa disparition et la seule que cette idée désespère.*

*Quelle race étrange : si acharnée à se détruire et si acharnée
à se conserver»*

Robert Merle

Préambule

De nos jours, le changement climatique global est largement reconnu et accepté par la majorité de la population mondiale, pourtant la prise de conscience de l'impact de ce changement sur notre vie de tous les jours peine à suivre. En tant qu'être humain, en partie responsable des bouleversements qu'amène la surconsommation des ressources de la Terre, les effets ressentis sur le climat à travers toutes les régions de la planète me préoccupent. Et donc, souvent je me pose ces questions : Comment peut-on agir en tant qu'individu pour permettre à nos enfants de vivre dans un monde meilleur ? Quelles sont les solutions globales mises en place par nos gouvernements afin de freiner le réchauffement de la planète ? Et au final, quel est l'avenir de notre planète face à cette crise mondiale ?

Par la suite, j'ai compris par ma formation scientifique que ces questions pouvaient être transférées au monde vivant en général. Comment un être vivant, une espèce ou un écosystème fait-il pour survivre lorsque son environnement est bouleversé et quels sont les solutions et les mécanismes entrant en jeu pour assurer sa survie ? Dans quelle mesure les écosystèmes pourront-ils répondre aux changements climatiques ? Comment les organismes faisant partie de cet écosystème vont répondre face aux changements environnementaux ? Vont-ils disparaître ? Vont-ils survivre et dans ce cas, quels sont les mécanismes mis en place par ces organismes qui vont contrecarrer les effets des modifications environnementales sur leur survie ?

C'est avec cette vision que j'ai rejoint l'équipe Symbiose Marine de l'UMR 7138 à l'Université de Nice Sophia Antipolis et cette thèse retrace mes quatre années passées à l'étude du potentiel d'adaptation d'un Cnidaire symbiotique de mer Méditerranée, l'anémone de mer *Anemonia viridis*. Cette équipe a choisi une approche pluridisciplinaire pour étudier l'effet de stress environnementaux comme le changement climatique et l'anémone de mer *A. viridis* comme modèle d'étude de prédilection. Les questionnements soulevés sont à plusieurs échelles (de la molécule à la population) et se focalisent sur : quels sont les mécanismes mis en jeu, les réponses à court terme chez cette espèce, ce qu'on appelle l'acclimatation ? Quels sont ceux qui entrent en jeu sur le plus long terme, ce qu'on appelle l'adaptation ? Et finalement, comment cette espèce évolue au fil du temps ? L'approche pluridisciplinaire unique du laboratoire permet d'avoir une vision plus globale des possibilités de réponses d'une espèce et donc de son évolution potentielle, formant ainsi un continuum allant de l'acclimatation, passant par l'adaptation, jusqu'à la spéciation, concepts dont je parlerai tout au long de cette thèse.

Chapitre 1

Introduction

Toute modification biotique ou abiotique, d'origine humaine ou naturelle de l'environnement va avoir un impact sur les populations présentes dans cet environnement. Dans le pire des cas, ces populations peuvent s'éteindre si l'environnement devient trop hostile (voir le débat actuel sur l'anthropocène). Par ailleurs, certaines populations peuvent éviter l'extinction en répondant à ces variations environnementales de 3 manières différentes (Davis et al., 2005; García Molinos et al., 2015; Hoffmann et Parsons, 1991; Holt, 1990; Parmesan, 2006). Certains groupes d'individus vont envahir de nouveaux habitats devenus plus adéquats et ainsi former de nouvelles populations; c'est le phénomène de migration. D'autres vont s'ajuster phénotypiquement aux nouvelles conditions sans qu'il y ait altération de leur constitution génétique; c'est l'acclimatation. Et enfin, quelques populations vont voir évoluer leur contenu génétique sous action de la sélection par ces nouvelles conditions environnementales; c'est l'adaptation. Eventuellement, lorsque la pression adaptative est forte, elle peut finir par favoriser des processus d'isolement reproducteur aboutissant *in fine*, à la formation de nouvelles espèces ; c'est la spéciation. L'ensemble de ces processus forme un grand continuum acclimatation-adaptation-spéciation qui permet de décrire comment les populations évoluent en réponse aux modifications de leur environnement ainsi qu'aux relations/liens génétiques qu'elles ont avec les autres populations.

Dans ce chapitre introductif, je commencerai par décrire les différentes stratégies de réponse aux stress. Je vais ensuite approfondir l'adaptation locale et l'implication potentielle de ce processus face aux changements environnementaux. Enfin, dans le cadre du changement climatique, je montrerai que les Cnidaires symbiotiques font partie de ces organismes sentinelles dont l'étude de leur réponse au stress est pertinente et justifie le choix de l'anémone de mer symbiotique, *Anemonia viridis*, comme modèle d'étude.

1.1 Stratégies de réponse aux stress

La migration

La migration*¹ peut être considérée comme un changement dans la distribution d'une espèce dans le temps et l'espace (Parmesan, 2006). Une des contraintes majeures de cette réponse est que la survie des populations en migration va dépendre de l'existence d'un nouvel habitat accessible où les conditions environnementales seront propices à sa survie, puis à son expansion. L'exemple de la figure 1.1 (tirée de Sunday et al., 2015) illustre parfaitement la migration de populations d'ichtyofaunes et invertébrés marins au niveau de la grande barrière de corail (figure 1.1A) en réponse à un changement environnemental de grande envergure (le

¹ Voir glossaire pour une définition du mot lorsque celui-ci est suivi d'un astérisque (*).

régime thermique). La figure 1.1B montre le décalage vers le Sud de la distribution de la plupart des populations avec le temps. Ce décalage suit la tendance des isothermes annuelles moyennes. Le changement d'environnement créé par l'augmentation locale des températures a ainsi entraîné la migration des populations vers le Sud, vers un nouvel optimum de température moyenne annuel. Cette stratégie de fuite est possible lorsque les espèces peuvent se déplacer suffisamment rapidement par rapport au changement de l'environnement. Toutefois, la capacité d'une population à survivre par migration dépend de la disponibilité en habitats compatibles.

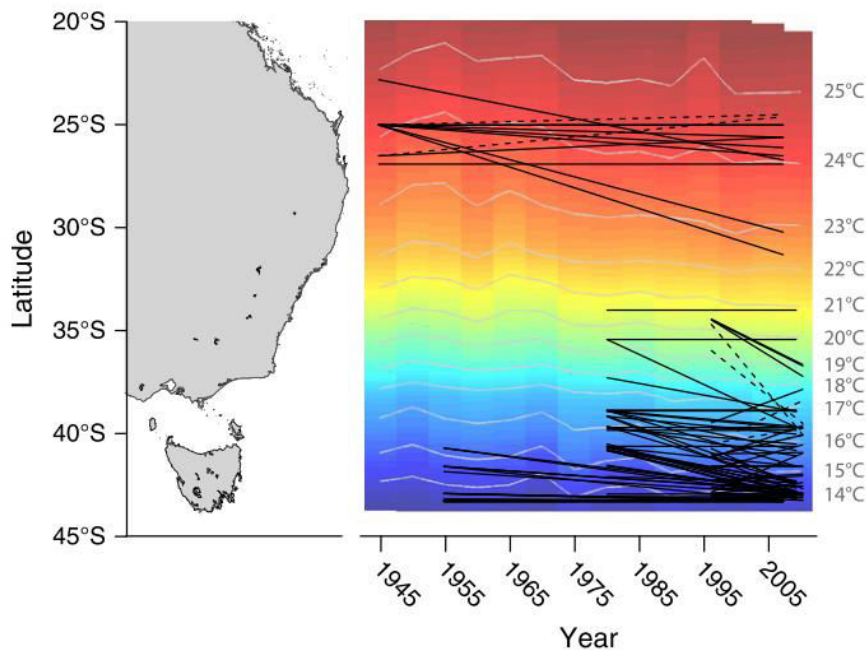


Figure 1.1 : Décalage de distribution de poissons et invertébrés marins sur la côte Est de l'Australie et changement latitudinal des isothermes annuelles moyennes de température (d'après Sunday et al., 2015). A) Illustration de la côte Est de l'Australie en fonction de la latitude. B) Distribution des populations de poissons et d'invertébrés marins (lignes noires) selon la distribution latitudinale des températures (dégradé de couleur) et isothermes annuelles moyennes de température (lignes grises) en fonction du temps (de 1945 à 2015). On observe une augmentation de la température tout le long de la côte Est avec le temps (schématisé par la pente descendante des isothermes). Pour de nombreuses populations, il y a eu un décalage de la distribution vers le Sud avec le temps, corrélé avec les isothermes annuelles moyennes, montrant un phénomène de migration.

L'acclimatation

L'acclimatation* est la faculté d'une population à s'ajuster aux conditions environnementales sans qu'il y ait pour autant une modification génétique (Foo et Byrne, 2016). En d'autres termes, tout changement métabolique, physiologique, anatomique ou comportemental au niveau d'un organisme est une stratégie de réponse réversible aux changements environnementaux. L'acclimatation est donc liée à la notion de plasticité phénotypique*. Cette notion est définie comme étant la capacité d'un organisme ayant un génotype* donné à

produire différents phénotypes* en réponse aux différentes conditions environnementales. Le changement dans les conditions environnementales induit un état de stress sur l'organisme, ce qui peut amener à un changement de l'état biologique dans lequel celui-ci se trouve et pouvant avoir un effet négatif sur la fitness de cet organisme (Hoffmann et Parsons, 1991). L'organisme va donc répondre à ce changement et l'efficacité de cette réponse va dépendre de la capacité de l'organisme à être plastique. En effet, plus il est plastique, plus son potentiel d'acclimatation est grand car il peut exprimer de nombreux phénotypes et ainsi survivre dans de nombreux environnements. Prenons l'exemple de la figure 1.2 (d'après Dam, 2013). Sur le graphique 1.2A, deux génotypes sont représentés, l'un plastique (1) et l'autre non-plastique (2). Les droites représentent le phénotype exprimé en fonction de la température du milieu (i.e. en fonction de l'environnement) pour les deux génotypes. On peut voir que le génotype plastique voit son phénotype exprimé changer en fonction de l'environnement alors que le génotype non-plastique n'a aucune variation dans le phénotype exprimé, peu importe l'environnement. Le graphique 1.2B représente la fitness d'une population en fonction de la température pour les deux génotypes. Une population avec un génotype plastique va permettre à celle-ci de maintenir sa fitness à des niveaux optimaux dans des environnements différents. Par contre une population avec un génotype non-plastique verra sa fitness diminuer dès que l'on sort des conditions environnementales initiales.

En conclusion, le potentiel d'acclimatation d'une population aux changements environnementaux va donc dépendre de la plasticité phénotypique de cette population et cette capacité à être plastique peut être mesurée indirectement par la variation de fitness d'une population à travers différentes conditions environnementales.

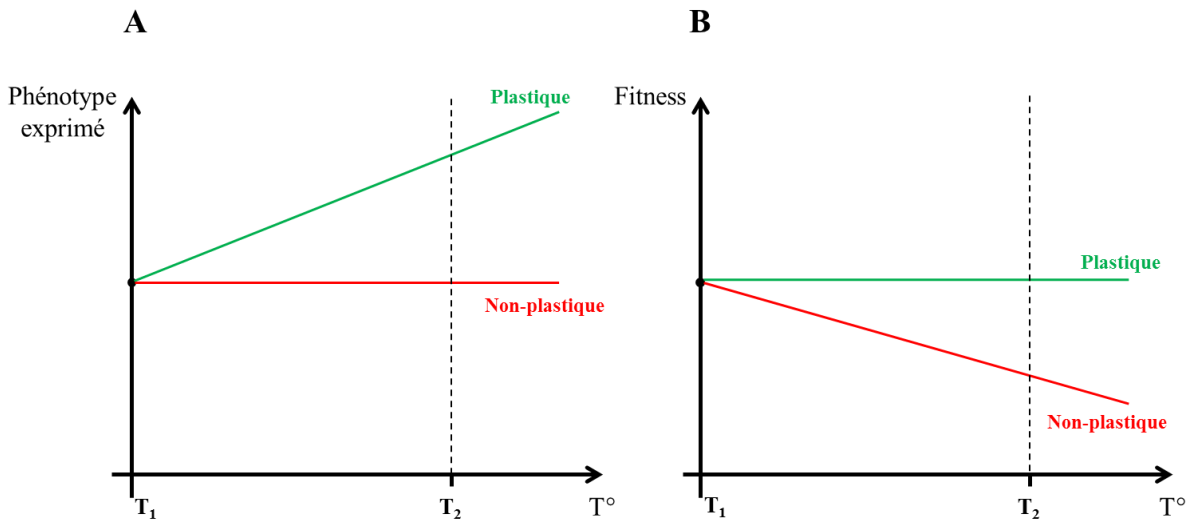


Figure 1.2 : Présentation hypothétique de l'effet de l'acclimation sur deux génotypes. A) Norme de réaction de 2 génotypes différents en fonction d'une variable environnementale (température). Le génotype vert est dit plastique, son phénotype exprimé varie en fonction de l'environnement. Le génotype rouge est dit non-plastique, le phénotype exprimé ne varie pas en fonction de l'environnement. B) Fitness relative d'une population portant un génotype plastique (vert) ou non plastique (rouge) en fonction de la température. Le génotype vert voit sa fitness inchangée peu importe la température. Le génotype rouge voit sa fitness diminuer lorsque la température augmente (d'après Dam, 2013).

L'adaptation

L'adaptation* est définie comme une modification du contenu génétique d'une population au fil des générations due à la sélection naturelle* (Foo et Byrne, 2016). Contrairement à l'acclimation, l'adaptation va se mettre en place sur le plus long terme, après plusieurs générations au sein d'une population et le changement génétique fixé est généralement irréversible. Reprenons une population possédant deux génotypes (1 et 2) mais qui cette fois voient leur fréquence évoluer sous effet d'un changement environnemental (figure 1.3A). Dans l'environnement T_1 (figure 1.3B), la fitness des deux génotypes est identique. Par la suite, l'environnement change (T_2) et amène à une modification de la fitness du génotype 1. Il en résulte que la fréquence du génotype 1 diminue jusqu'à disparaître totalement, amenant la fixation du génotype 2 dans l'environnement T_2 . On dit alors que le génotype 1 est contre-sélectionné dans l'environnement T_2 car il y est maladapté. La fitness du génotype 2 reste inchangée peu importe l'environnement contrairement au génotype 1 qui, lui n'est adapté qu'à l'environnement T_1 et se retrouve donc contre-sélectionné.

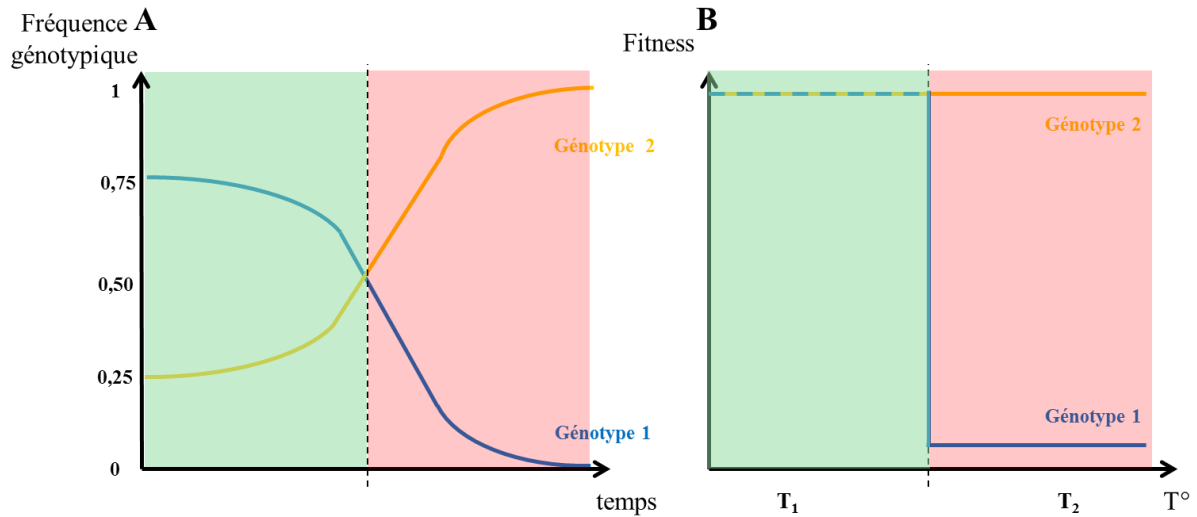


Figure 1.3 : Présentation hypothétique de l'effet de l'acclimatation sur deux génotypes. A) Fréquence génotypique de 2 génotypes en fonction d'une variable environnementale (température) variant avec le temps. Dans l'environnement T1, les deux génotypes sont présents alors que dans l'environnement T2, seul le génotype 2 est adapté et finit par se fixer à l'ensemble de la population. B) Fitness relative d'une population composée de deux génotypes (1 et 2) en fonction de la température. Le génotype 2 est favorisé dans l'environnement T₂ car il est adapté à cet environnement contrairement au génotype 1.

L'adaptation va donc se faire sur différents génotypes en fonction de l'environnement et la sélection naturelle agit comme une force qui filtre les génotypes maladaptés, diminuant ainsi la diversité génétique locale.

Cette adaptation par sélection ne peut se faire qu'en présence de polymorphisme. Soit les génotypes adaptés au nouvel environnement étaient déjà présents dans la population avant le changement environnemental (polymorphisme ancestral*), soit ils apparaissent opportunément dans la population après ce changement par migration ou mutation*. Si l'on considère maintenant le cas d'un environnement très variable de manière chronique, ce changement constant des conditions environnementales fait que le génotype qui sera éventuellement fixé ne sera pas celui qui est le mieux adapté à une condition environnementale donnée mais celui le mieux adapté sur le long terme dans ce genre d'environnement, c'est-à-dire le génotype qui procurera à l'organisme la plus grande plasticité phénotypique. Ainsi, la fixation d'un génotype procurant une grande plasticité phénotypique est aujourd'hui considérée comme une réponse adaptative à un environnement variable (Ghalambor et al., 2007; Murren et al., 2015). En conclusion, l'ensemble de la diversité génétique au sein d'une population va influencer le potentiel d'adaptation de cette population à tout changement environnemental.

1.2 Les mécanismes de l'adaptation locale

1.2.1 Le potentiel d'adaptation

De nos jours, le potentiel d'adaptation* d'une population est estimé à travers l'étude de l'adaptation locale*. L'adaptation locale est définie comme un processus inter-populationnel dans lequel la répartition des génotypes est le fruit d'un gradient sélection et d'une réduction du flux de gènes entre populations. L'étude de celle-ci va se faire par la comparaison entre populations qui évoluent sous différentes conditions environnementales (Kawecki et Ebert, 2004). L'adaptation locale est donc un outil privilégié pour identifier les forces de sélection à l'œuvre au sein d'une espèce (Williams, 1993). De mon point de vue, le potentiel d'adaptation est la part du polymorphisme dans une population qui permettrait à celle-ci de s'adapter à de futures conditions environnementales. Identifier les gènes impliqués dans d'adaptation locale permettrait de définir l'étendue de cette « boîte à outils » génétique.

1.2.2 Conditions pour la mise en place de l'adaptation locale

L'un des prérequis essentiels pour qu'une population s'adapte à de nouvelles conditions environnementales est que le potentiel d'adaptation soit déjà présent dans cette population. L'adaptation locale peut néanmoins être entravée par deux phénomènes. Le premier phénomène est le flux de gènes (migration et dispersion). Celui-ci amène constamment de nouvelles variations génétiques dans une population par la migration d'individus provenant d'autres populations. Ceci a pour conséquence une homogénéisation du contenu génétique dans l'ensemble des populations connectées. Donc, pour qu'il y ait adaptation locale dans le cas d'un flux de gènes important, seule une pression de sélection forte contrant l'apport de nouvelles variations génétiques permettra l'augmentation de fréquence du génotype adaptatif (Sanford et Kelly, 2011). Le second est la dérive génétique qui provoque un échantillonnage aléatoire des génotypes d'une génération à l'autre et peut ainsi entraîner la perte d'un génotype qui pourrait être potentiellement adaptatif. Donc, une population de grande taille efficace* aura plus de chances de présenter un génotype adaptatif qu'une population de petite taille dans laquelle la dérive génétique est forte. C'est par exemple le cas d'une population ayant récemment subi un goulot d'étranglement, sa taille efficace étant réduite, le potentiel d'adaptation résultant sera faible.

En conclusion, le potentiel d'adaptation résulte d'un équilibre entre la sélection naturelle, favorisant la fixation de caractères adaptatifs, et les processus biologiques tels que le flux de

gènes entre deux populations pouvant entraver cette adaptation locale en homogénéisant les contenus génétiques.

1.3 Les changements environnementaux

Les perturbations environnementales sont nombreuses et plusieurs d'entre elles ont aujourd'hui une origine essentiellement humaine. C'est le cas par exemple de l'eutrophisation* du milieu, la pollution des océans par les déchets ménagers et industriels, la réduction des stocks de pêche due à la surpêche, le tourisme et la minéralisation des côtes réduisant l'habitat disponible pour les espèces y vivant. Toutefois, parmi les nombreuses perturbations, le changement climatique est probablement le plus préoccupant car son impact a déjà aujourd'hui un effet à l'échelle de la planète.

1.3.1 Le changement climatique

Ces dernières années, les indices d'un changement climatique d'origine anthropique se font de plus en plus nombreuses et ses conséquences de plus en plus visibles à travers le monde (IPCC, 2013). Parmi les causes du changement climatique, l'augmentation de la teneur en gaz à effet de serre dans l'atmosphère est très certainement la problématique majeure (Hansen et al., 2006). Il a été prouvé que l'augmentation de la concentration de ces gaz dans l'atmosphère est à l'origine de la variation accrue du régime des pluies et des vents (Xie et al., 2010), de l'augmentation de la fréquence des tempêtes et des événements climatiques extrêmes (Vecchi et al., 2013), de l'augmentation du niveau moyen des mers (Vermeer et Rahmstorf, 2009) et de la variation de la température de surface des océans (Xie et al., 2010)). Ces perturbations ont un impact majeur sur tous les écosystèmes (Smith et al., 2009), et notamment les écosystèmes marins (Stenseth, 2002).

Parmi les nombreux gaz à effet de serre, le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC ou IPCC en anglais) a défini que le dioxyde de carbone (CO₂) était celui qui a le plus d'effet sur le changement climatique à la vue des quantités relarguées dans l'atmosphère quotidiennement (IPCC, 2013). Une partie du CO₂ se retrouve dans l'atmosphère et, en synergie avec les autres gaz à effet de serre, provoque une augmentation de la température moyenne de l'air et des océans. De plus, les océans agissant comme une pompe à CO₂, ceux-ci récupèrent l'autre partie du CO₂ rejeté dans l'atmosphère (IPCC, 2013). L'accumulation de CO₂ dans les océans a pour conséquence leur acidification. Le CO₂ absorbé réagit avec l'eau et provoque une diminution du pH en changeant l'abondance

relative des éléments de carbone inorganique dissous (DIC)² présents naturellement et en équilibre dans les océans. La capacité des océans à jouer le rôle de pompe à CO₂ n'étant pas infinie, la concentration du CO₂ dans l'atmosphère continuera de s'accroître, intensifiant l'augmentation de la température des mers et des océans.

Le changement climatique a donc un impact direct sur la survie des populations car il entraîne une modification des paramètres physico-chimiques des océans pouvant avoir un effet sur un grand nombre de processus biologiques tels que la croissance, les défenses immunitaires, la disponibilité en nourriture, le succès reproductif, la phénologie,... et ainsi impacter la structure et la fonction des écosystèmes (IPCC, 2013; Parmesan, 2006). A l'heure actuelle, la température de surface moyenne des océans Indien, Atlantique et Pacifique a déjà augmenté de 0.65, 0.41 et 0.31°C respectivement entre 1950 et 2009 (IPCC, 2013) et, selon le GIEC, la température de surface des océans va continuer à croître entre 1.2 à 3.2°C pendant ce siècle (IPCC, 2013). Cette information est déduite de simulations qui permettent de prédire, à partir de données actuelles, l'évolution du climat pour le 21^{ème} siècle. Toutefois, il existe de nombreuses simulations différentes qui dépendent notamment de la manière dont la concentration en CO₂ va évoluer (figure 1.4). Par conséquent, ces simulations ne sont pas toutes en accord sur le futur du climat et donc l'impact que le changement climatique global aura sur nos écosystèmes.

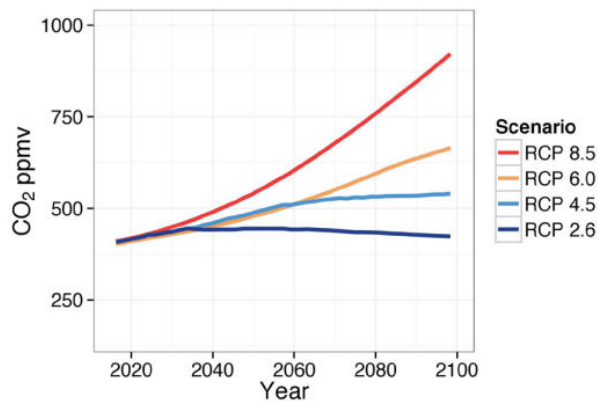


Figure 1.4 : Scénarios RCP prédisant l'évolution de la concentration en CO₂. Les quatre scénarios RCP (Representative Concentration Pathway) prédisant l'évolution de la concentration en CO₂ (ppmv = partie par million en volume) de l'atmosphère durant le 21^{ème} siècle. Le scénario le plus optimiste est le RCP2.6 tandis que le plus pessimiste est le RCP8.5 (Howes et Joos 2015).

² Ces éléments DIC comprennent le dioxyde de carbone (CO₂) les ions bicarbonates (HCO₃⁻) et les ions carbonates (CO₃²⁻). Chez quelques espèces marines, notamment les Cnidaires Scléactiniaires, les ions carbonates permettent la formation d'un squelette calcaire à la base de l'un des écosystèmes les plus riches de la planète : les récifs coralliens.

En considérant les 2 scénarios extrêmes, il est possible d'estimer la manière dont les différents écosystèmes vont réagir (figure 1.5, d'après Gattuso et al., 2015). Cette figure résume les effets qu'auraient les émissions de CO₂ selon le scénario optimiste RCP2.6³ et pessimiste RCP8.5 sur les paramètres physico-chimiques des océans et sur quelques écosystèmes. Sans grande surprise, le scénario RCP8.5 montre un impact très fort pour la plupart des écosystèmes présentés dans ce schéma, impact devenant plus faible dans le cas du scénario RCP2.6. De plus, Gattuso et al. (2015) ont montré que les options de gestion de l'écosystème seront plus efficaces si l'émission de CO₂ est limitée (RCP2.6). Dans tous les cas, par cette étude, nous pouvons estimer que même pour un scénario optimiste, il y aura un impact sur de nombreux écosystèmes marins à travers la planète et que, les efforts effectués pour limiter les facteurs clefs causant le changement climatique (« mitigate »), la construction ou la maintenance de la résilience dans les écosystèmes (« protect ») et la réparation des dommages déjà causés sur les écosystèmes (« repair ») ne seront peut-être pas suffisants.

L'intérêt pour l'étude du potentiel d'acclimatation et d'adaptation des populations est un atout majeur pour prédire et déterminer la meilleure manière d'agir face au changement climatique. Cela pourrait aider à distinguer les populations les plus sensibles des populations les plus résistantes aux changements climatiques prédits (Gienapp et al., 2008).

³ Les quatre scénarios RCP sont nés de la grande diversité de scénarios proposés à travers le monde, tant par des équipes scientifiques que par des équipes socio-économiques. Ils ont été définis sur base de 300 scénarios publiés dans la littérature et ont été sélectionnés dans le but de permettre à toute équipe désireuse de faire des prédictions à partir de données climatiques d'utiliser les mêmes prédictions. Ceci permet maintenant d'avoir une base de travail commune et ainsi de comparer les résultats entre équipes. RCP veut dire « Representative Concentration Pathway » tandis que le chiffre qui suit donne le forçage radiatif utilisé dans la simulation. Le forçage radiatif est le changement du bilan radiatif (différence entre le rayonnement entrant et le rayonnement sortant) au sommet de la troposphère (situé entre 10 et 16 km d'altitude), dû à un changement d'un des facteurs d'évolution du climat – comme la concentration des gaz à effet de serre. Il est exprimé en W/m². Il est à noter que seuls les scénarios RCP2.6 et RCP4.5 intègrent les effets d'une politique de réduction des émissions de gaz à effet de serre susceptible de limiter le réchauffement planétaire à 2°C en 2100, seuil maximal à ne pas dépasser défini par la COP21 en décembre 2015 à Paris (d'après <http://www.drias-climat.fr/accompagnement/sections/175>).

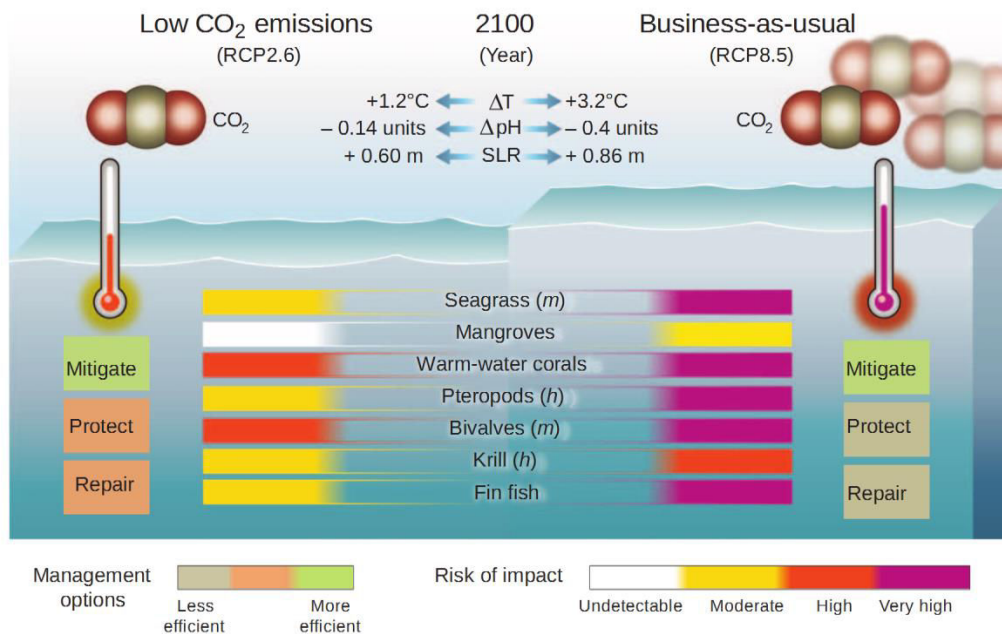


Figure 1.5 : Changements dans la chimie et la physique des océans et les impacts que cela pourrait avoir sur les organismes et les écosystèmes. Deux scénarios d'émission de CO₂ sont représentés, l'un optimiste (RCP2.6) et l'autre pessimiste (RCP8.5). Le changement de température (ΔT) et de pH (ΔpH) sont relatifs à la période pré-industrielle (1870-1899). La hausse du niveau moyen des océans (SLR = « Sea Level Rise ») est relative au niveau de 1901. L'efficacité de 3 options de management est aussi ajoutée pour les deux scénarios. « Mitigate » représente la limitation des facteurs clés causant le changement climatique (comme l'émission de CO₂), « protect » montre la réparation ou la maintenance de la résilience dans les écosystèmes (par la mise place d'Aire Marines protégées par exemple) et « repair » représente la réparation des dommages déjà causés sur les écosystèmes (d'après Gattuso et al., 2015).

1.3.2 Les stratégies de réponse face au changement climatique

La première stratégie de réponse des organismes face aux perturbations environnementales est la migration. Perry et al. (2005) ont montré que plusieurs des espèces de poissons démersaux (exploités ou non-exploités), dont ils ont étudié la répartition géographique en Mer du Nord, ont migré vers le Nord vers des températures plus froides. La cause de ce décalage de distribution : une hausse de la température moyenne annuelle de l'eau de 1.05°C entre 1977 et 2001 en Mer du Nord. Toutefois cette stratégie pose deux problèmes majeurs. La première est que la migration de populations vers des latitudes plus élevées dépend de la possibilité à trouver un nouvel habitat approprié. La seconde est que la migration de populations entières est plus compliquée (i.e. inter-générationnelle) pour des espèces sessiles. Par conséquent, les stratégies favorisant l'acclimatation et/ou l'adaptation seront probablement plus efficaces.

Face à un changement rapide et fort de l'environnement, l'acclimatation est une solution avantageuse car la réponse face au changement environnemental ne dépend que de la plasticité phénotypique. Ceci implique donc uniquement un changement du phénotype de chaque individu dans la population, changement se passant à l'échelle individuelle et non pas générationnelle (c'est le même individu qui s'acclimata à son nouvel environnement). Toutefois, beaucoup d'espèces marines semblent déjà arriver aux limites de leurs tolérances thermiques possibles grâce à leur plasticité phénotypique (Stat et al., 2012; Sunday et al., 2015) et une acclimatation supplémentaire face à la température risque d'être limitée (Peck, 2016; Peck et al., 2009).

Enfin, la dernière stratégie est l'adaptation. Soit le variant génétique amenant une adaptation aux nouvelles conditions environnementales est déjà présent dans la population, soit celui-ci apparaît à une échelle de temps similaire à l'échelle de temps à laquelle le changement climatique (ou environnemental) se passe, conduisant ainsi au maintien de la population. Dans tous les autres cas, le changement environnemental pourrait conduire à la disparition de la population (Billington et Pelham, 1991; Davis et al., 2005; Parmesan, 2006).

En conclusion, la réponse des organismes face à un changement de l'environnement résulte donc d'un mélange entre la migration, l'acclimatation et l'adaptation (Chevin et al., 2010; Davis et Shaw, 2001). La contribution relative de chaque phénomène ainsi que leur efficacité va essentiellement être dépendante de l'échelle de temps et d'espace du changement environnemental (García Molinos et al., 2015). Mais cela va dépendre aussi de l'organisme, de par son histoire de vie, la disponibilité en habitats et sa capacité de dispersion (Chevin et al., 2010; Gienapp et al., 2008; Parmesan et Yohe, 2003). De manière générale, la plasticité phénotypique permettrait aux populations de tolérer certaines variations environnementales rapides sur une courte échelle de temps et l'adaptation pourrait faire la même chose pour une échelle de temps plus longue (Dam, 2013).

1.3.3 L'adaptation locale comme outil pour l'estimation du potentiel d'adaptation dans le cadre du changement climatique

L'ensemble des populations d'une espèce recouvre une certaine variabilité environnementale. Par exemple, des populations de lagune subissent une plus forte variabilité des conditions environnementales telles que la température et/ou la salinité qu'une population de pleine mer. Eventuellement, ces conditions locales peuvent imiter les conditions prédites globalement dans le cadre du changement climatique. Comprendre comment ces populations font face à ces conditions locales peut permettre d'estimer le

potentiel d'adaptation d'une espèce face au changement climatique (Bensoussan et al., 2010). Inversement, mesurer la réponse à un même stress environnemental de populations localement différenciées génétiquement (polymorphisme ancestral différent) peut également permettre cette estimation (Angilletta, 2009).

1.3.4 Le changement environnemental et les Cnidaires

Parmi les organismes vivants, les Cnidaires, et notamment les coraux constructeurs de récifs tropicaux sont visiblement impactés par le changement climatique (Alvarez-Filip et al., 2011; De'ath et al., 2012; Hoegh-Guldberg, 1999; Hoegh-Guldberg et al., 2007; Normile, 2016). Or, les récifs coralliens sont une ressource inestimable pour de nombreux peuples à travers le monde grâce notamment à la pêche et au tourisme (Lesser, 2004). Toutefois, la fréquence des événements climatiques extrêmes causés par le changement climatique associée à d'autres activités anthropiques telles que la surpêche et l'exploitation des côtes, le tout agissant en synergie (Coma et al., 2009), provoquent une réduction de la couverture corallienne mondiale (Alvarez-Filip et al., 2011; De'ath et al., 2012), au détriment de la diversité associée (Hoekstra et al., 2004) mais aussi des populations humaines dépendantes de ces ressources (Hoegh-Guldberg, 1999; Hoegh-Guldberg et al., 2007). Les chiffres du GIEC montrent que 7% des récifs ont subi au moins un état de stress dans la période 1985-1994 et ce pourcentage monte à 38% dans la période 1995-2004. Plus récemment, la dernière période El Niño a dévasté les coraux mondialement (Normile, 2016). D'un autre côté, dans les zones tempérées, des Cnidaires symbiotiques se développent sous des conditions environnementales très variables, qui seraient létales pour les récifs coralliens (Bensoussan et al., 2010). Par conséquent, comprendre l'origine de la différence de sensibilité/résistance permettrait de mieux estimer le potentiel d'adaptation de ces espèces.

1.4 Les Cnidaires

Les Cnidaires sont des organismes essentiellement marins répartis partout sur la planète ; ils sont présents à toutes les profondeurs. Pélagiques et/ou benthiques, leur taille varie de quelques millimètres pour les espèces coloniales à plus d'un mètre pour les formes solitaires. Ils comprennent les organismes comme les hydres, les méduses, les coraux, les gorgones et les anémones de mer.

1.4.1 L'Embranchement des Cnidaires

L'embranchement des Cnidaires (*cnid-* Gr. = ortie) compte plus de 13 000 espèces décrites à ce jour (Zhang, 2013). Ils sont tous caractérisés par la présence d'un type de cellules

spéciales urticantes : les cnidocytes. Ce sont des organismes à symétrie radiaire et diploblastiques⁴ (*diplo-* Gr. = double, *blast-* Gr. = germe, pousse) c.à.d. qu'ils possèdent deux feuilletts embryonnaires : l'ectoderme et l'endoderme. Leur cycle biologique est composé d'une alternance de générations (cycle vital dimorphe) entre le stade polype et le stade méduse.

De manière générale, les méduses sont nageuses et ont la forme d'une ombrelle. La bouche est orientée vers le bas et se prolonge par le manubrium. La cavité gastro-vasculaire est ramifiée dans l'ombrelle qui est bordée de tentacules. Les polypes ont un corps cylindrique et s'attachent au substrat par leur disque pédieux. La bouche est orientée vers le haut, et est entourée de plusieurs tentacules. Les différentes classes de Cnidaires se distinguent par l'importance relative du stade méduse et polype, soutenues aujourd'hui par des données phylogénétiques.

L'ancêtre commun aux Cnidaires serait apparu il y a environ 500 millions d'années (Cartwright et al., 2007). Aujourd'hui les Cnidaires sont divisés en deux Sous-Embranchements : les Medusozoa et les Anthozoa. Parmi les Medusozoa on retrouve quatre Classes : les Hydrozoa (*hydr-* Gr. = eau, *zo-* Gr. = animal), les Scyphozoa (*scyph-* Gr. = coupe, tasse, *zo-* Gr. = animal), les Cubozoa (*cub-* Gr. = cube, *zo-* Gr. = animal) et les Staurozoa. Le Sous-Embranchement des Anthozoa ne comprend qu'une seule Classe : les Anthozoa (*anth-* Gr. = fleur), eux-mêmes se divisant en deux Sous-Classes : les Hexacorallia (*hexa-* Gr. = six, *coralli-* Gr. = corail) et les Octocorallia (*octo-* Gr. = huit, *coralli-* Gr. = corail) (figure 1.6).

Chez les Hydrozoa, les deux formes corporelles sont généralement présentes et sont à peu près d'égale importance à l'exception de l'hydre d'eau douce *Hydra vulgaris* (Linnaeus, 1758). Chez les Scyphozoa, les Cubozoa et les Staurozoa, le stade méduse domine ; le stade polype étant très réduit. Enfin, chez les Anthozoa, c'est le stade polype qui domine, avec une absence totale du stade méduse. Dans le cadre de cette thèse, je me suis centré sur la Classe des Anthozoa.

⁴ Spongiaires et Cténaïres à part, l'ensemble du reste du vivant animal est dit triploblastique et possède donc trois feuilletts embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme.

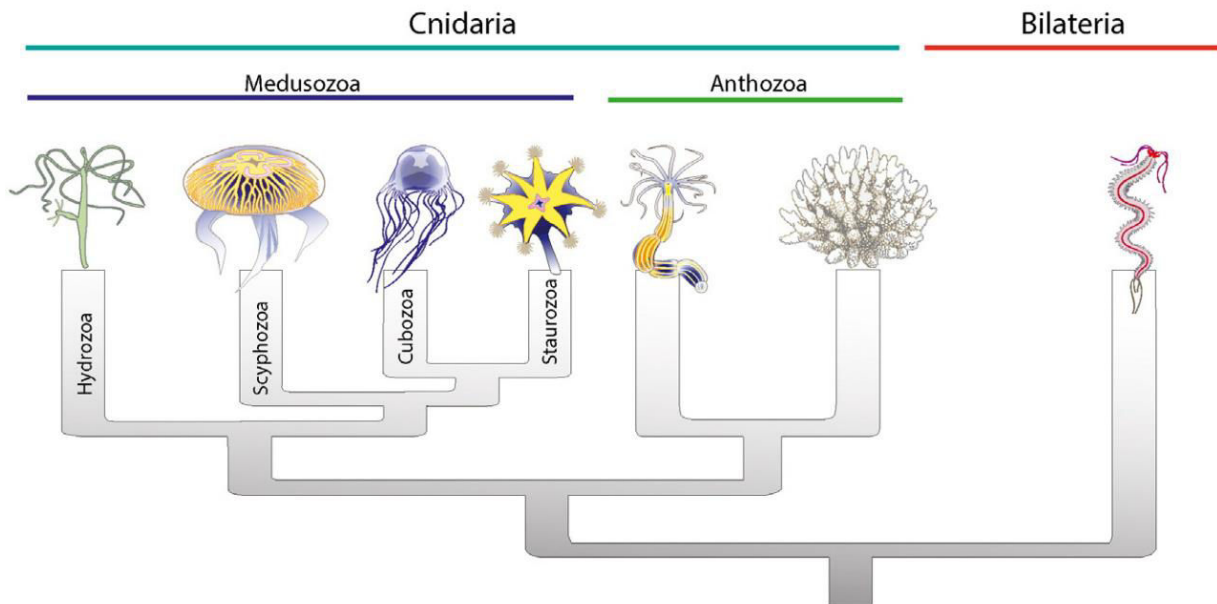


Figure 1.6 : Arbre phylogénétique représentant les cinq Classes parmi l'Embranchement des Cnidaires. Chaque Classe est décrite avec l'un de ses représentants. Dans le Sous-Embranchement des Medusozoa, on trouve *Hydra vulgaris* (Hydrozoa), *Aurelia aurita* (Scyphozoa), *Chironex fleckeri* (Cubozoa), *Haliclystus sp.* (Staurozoa) (d'après Technau et Schwaiger (2015)).

1.4.2 La Classe des Anthozoaires

Les Anthozoaires sont uniquement retrouvés en milieu marin. Ils peuvent être solitaires ou coloniaux. Alors que la forme solitaire peut s'attacher à des substrats durs ou se terrer dans le sable, la forme coloniale peut construire de véritables récifs en squelette calcaire (récifs coralliens).

a. Classification des Anthozoaires

La Classe des Anthozoaires compte environ 6100 espèces réparties entre les deux sous classes, Hexacoralliaires et Octocoralliaires (Berntson et al., 1999; France et al., 1996). Les Hexacoralliaires ont une symétrie radiaire d'ordre six et comportent un nombre de tentacules multiple de six. Ils comprennent les coraux constructeurs de récifs et les anémones de mer. Les Octocoralliaires ont une symétrie radiaire d'ordre huit et possèdent huit tentacules. Les Hexacoralliaires sont sous-divisés en six Ordres : Antipatharia, Zoantharia, Actiniaria, Corallimorpharia, Scleractinia et Ceriantharia (Figure 1.7). Parmi les Anthozoaires, je me suis intéressé à l'Ordre des Actiniaires, groupe que je décrirai dans le chapitre 3.2.1.

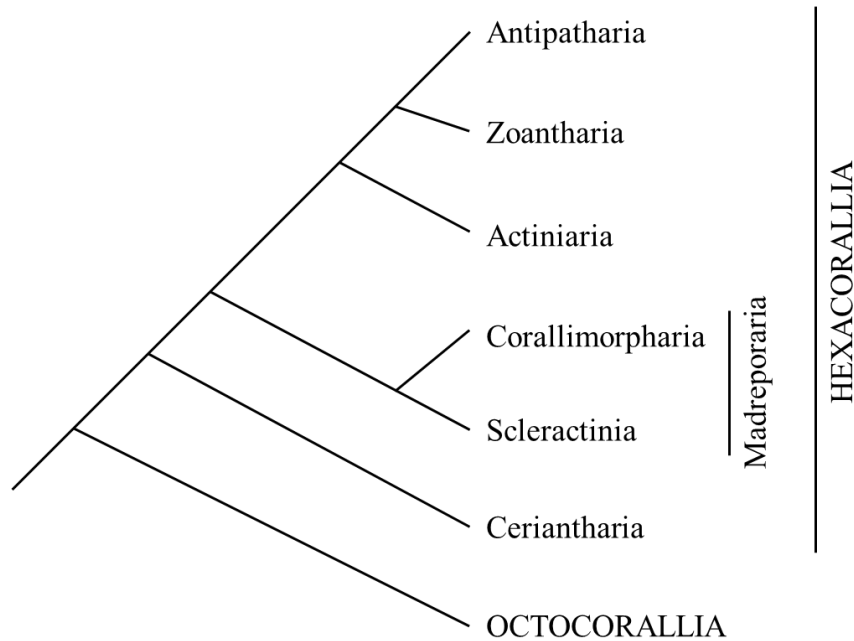


Figure 1.7 : Arbre phylogénétique de la Classe des Anthozoa (d'après France et al. (1996)).

b. Anatomie générale des Anthozoa

Les Anthozoaires peuvent être considérés comme un sac tubulaire avec une bouche entourée de tentacules (figure 1.8) reposant sur un disque de fixation au substrat ou pied. Il existe quelques caractères morphologiques spécifiques aux Anthozoaires. En effet, ceux-ci sont caractérisés par deux structures particulières : l'actinopharynx et les mésentères (figure 1.8). L'actinopharynx (ou stomodeum) est une sorte de gosier tubulaire reliant la bouche à la cavité gastrovasculaire. Pour la plupart des Anthozoa, il est composé de siphons ciliés, appelés siphonoglyphes (non représentés sur la figure 1.8), amenant l'eau dans la cavité gastrovasculaire. La cavité gastrovasculaire est grande et partitionnée par des septas, ou mésentères, qui augmentent fortement la surface d'échange pour la digestion et assurent un meilleur support hydrostatique grâce aux stromas.

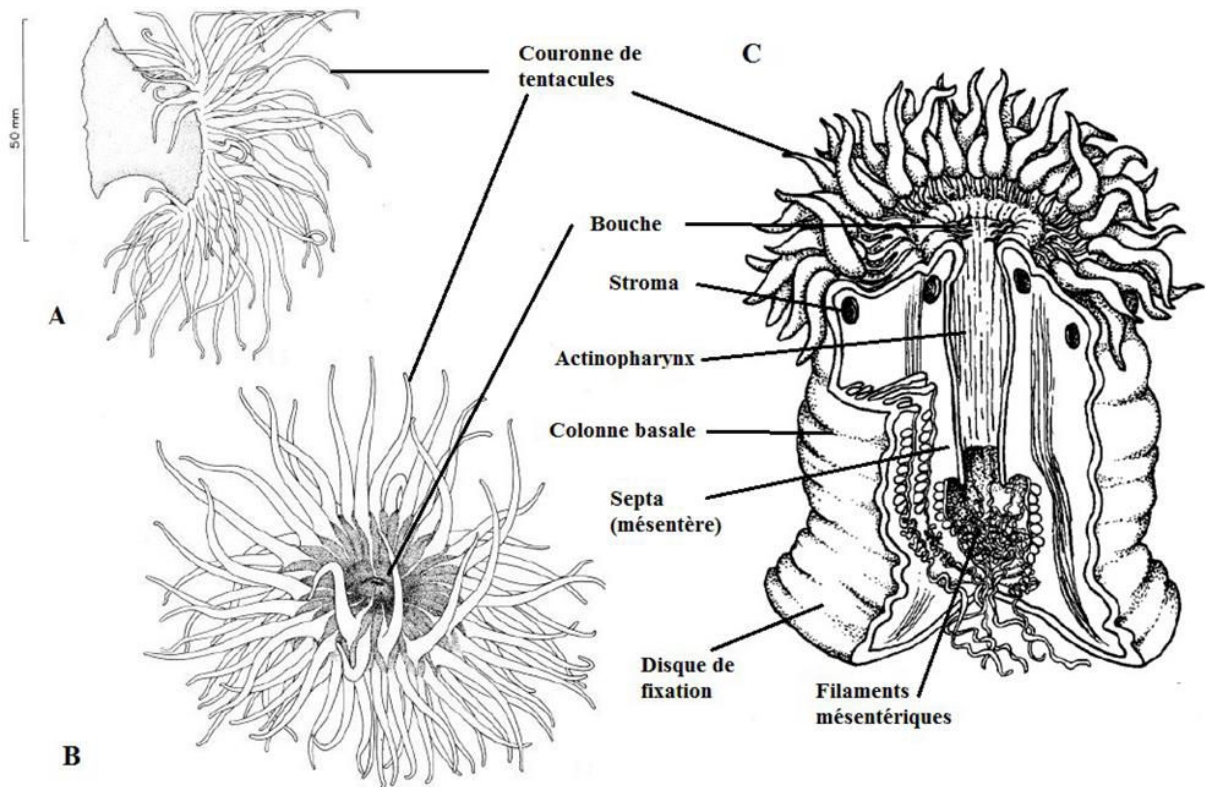


Figure 1.8 : Anatomie générale d'un Anthozoaire. (A et B) Schéma d'*Anemonia viridis* (Actiniaria) en vue latérale (A) et en vue apicale (B) (Manuel R.L., 1984, modifié). (C) Schéma classique de structure d'une anémone (Morin A., 1994 ©BIODIDAC, modifié).

Comme tous les Cnidaires, les Anthozoa sont caractérisés par une symétrie radiaire. Ils possèdent deux couches tissulaires : l'épiderme (épithélium monostratifié) et le gastroderme (figure 1.9). Ces deux tissus sont séparés par une couche tissulaire considérée comme acellulaire mais riche en collagène et en eau : la mésoglée. Les cnidocytes sont présents majoritairement dans l'épiderme et sont composés d'une structure urticante (cnidocyte) qui, sous l'excitation d'un cnidocil par contact mécanique avec un objet extérieur, se dévagine et libère un filament urticant.

Ils possèdent un réseau de fibres musculaires circulaires (interface gastroderme-mésoglée) et un autre de fibres longitudinales (interface épiderme-mésoglée), formé par des cellules myoépithéliales, qui permettent l'élongation ou la contraction du corps et des tentacules de l'animal. Un plexus nerveux (en forme de réseau lâche, non ganglionnaire) innerve les fibres musculaires.

Au niveau du gastroderme, on peut trouver, dans le cas de Cnidaires dits symbiotiques (chapitre 1.4.3), des Dinoflagellés de type *Symbiodinium* sp. (Z) à l'intérieur même des cellules gastrodermales.

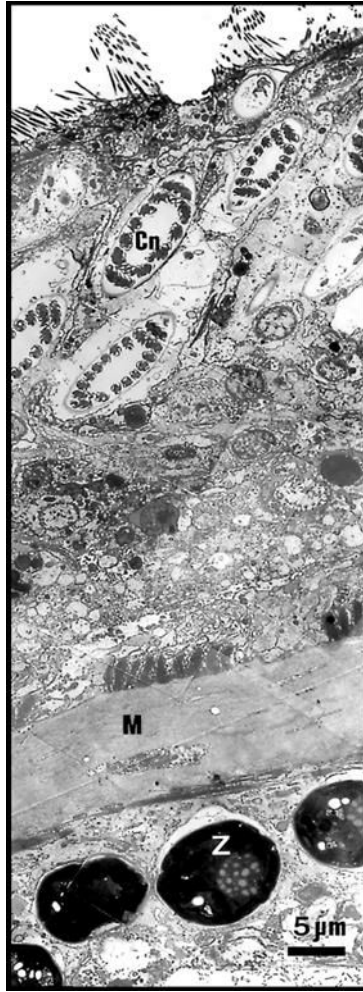


Figure 1.9 : Coupe électronique dans les tissus d'*A. viridis*. L'épiderme au-dessus, avec les cnidocytes (Cn) ; en-dessous la couche considérée comme acellulaire, la mésoglye (M) ; et enfin, le gastroderme contenant les symbiotes (Z) (d'après Allemand et al., 1998).

1.4.3 La symbiose

De nombreux Hexacoralliaires et quelques Octocoralliaires vivent en symbiose mutualiste avec des organismes Dinoflagellés unicellulaires photosynthétiques du genre *Symbiodinium* (Freudenthal, 1962) (voir figure 1.9). Cette symbiose est caractérisée par des échanges mutuels et bénéfiques entre les deux partenaires, qui vivent alors étroitement ensemble, formant l'holobionte*. Le symbiote, communément appelé zooxanthelle, réside dans une vacuole à l'intérieur même des cellules du gastroderme (Trench, 1979). Les zooxanthelles apportent les produits de la photosynthèse, notamment l'oxygène et les sucres mais aussi des acides aminés et de petits peptides (Muscatine, 1990; Trench, 1979) nécessaires au métabolisme de l'animal (ou hôte). L'ensemble des photosynthétats produits et amenés par les zooxanthelles contribue en moyenne à 60% et jusqu'à 95% des besoins en nutriments et énergétiques de l'hôte chez les Scléactiniaires (Muscatine, 1990). Ce pourcentage varie en fonction de l'espèce et est beaucoup plus faible chez les Anthozoaires tempérés (Muller-

Parker et Davy, 2001), mis à part pour quelques exceptions comme l'anémone de mer symbiotique *Anemonia viridis* (Forskål, 1775) chez laquelle on retrouve des valeurs similaires aux coraux (Davy et al., 1996). En contrepartie, l'hôte va amener les nutriments nécessaires pour la photosynthèse aux zooxanthelles (ammonium, phosphate, CO₂,...) ainsi qu'une protection contre l'environnement extérieur (Trench, 1979) permettant aux zooxanthelles de vivre dans un environnement très stable.

En plus de vivre en symbiose, il existe des souches de *Symbiodinium* qui vivent dans la colonne d'eau, dans les sédiments, dans le sable et les décombres coralliens,... (les différents habitats possibles pour *Symbiodinium* sp. sont repris dans Pochon et al., 2014). L'étude des phylogénies croisées a montré une forte flexibilité d'association entre l'hôte et le symbiote à l'échelle macroévolutive (Baker, 2003). Malgré l'homogénéité de forme au sein du genre, il existe une diversité cryptique très importante (Baker, 2003).

a. Phylogénie du genre *Symbiodinium*

Le genre *Symbiodinium* se retrouve dans toutes les mers du monde, en symbiose avec un autre organisme ou vivant directement dans la colonne d'eau. Depuis la description par Freudenthal en 1962 de *Symbiodinium microadriaticum*, de nombreuses espèces sont aujourd'hui décrites selon le concept d'espèces morphologiques (Baker, 2003). Toutefois, la diversité génétique découverte au sein de cette espèce a remis en question le statut de *S. adriaticum* comme une seule espèce. Aujourd'hui, la diversité retrouvée au sein du genre *Symbiodinium* est divisée en clades et sous-clades selon des critères phylogénétiques. L'utilisation des sous-unités ribosomales chloroplastique et nucléaire a permis de décrire neuf clades, de A à I (Pochon et Gates (2010), figure 1.9), présents dans 5 phyla différents : les Foraminifères, les Porifères, les Mollusques, les Plathelminthes et, ce qui nous intéresse ici, les Cnidaires (Trench, 1993). Chaque clade peut être divisé en sous-clades à l'aide de la région ITS (Internal Transcribed Spacer), une autre région ribosomale nucléaire (LaJeunesse, 2001; Rodriguez-Lanetty, 2003).

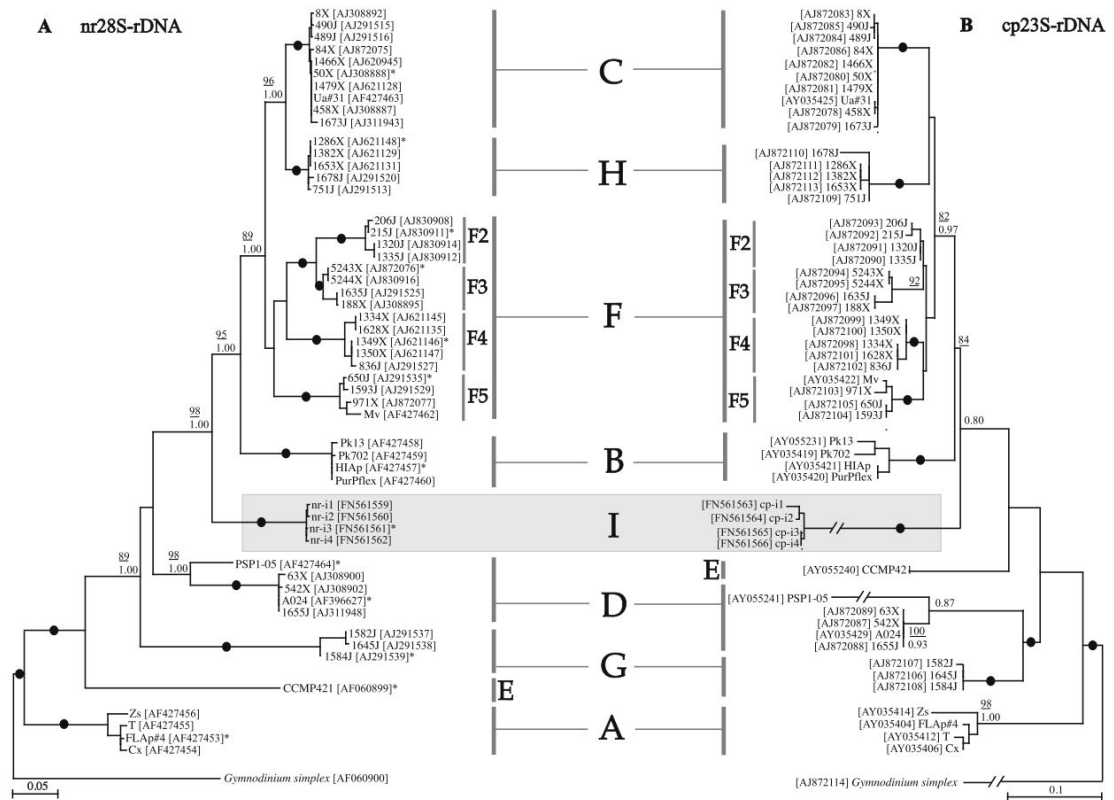


Figure 1.10 : Arbres phylogénétiques construits en maximum de vraisemblance à l'aide de deux marqueurs moléculaires classiquement utilisés pour la phylogénie du genre *Symbiodinium*. (A) Sous-unité 28S de l'ADN ribosomal (B) Sous-unité 23S de l'ADN chloroplastique. La phylogénie donnée par les deux arbres est similaire et démontre la concordance des résultats entre deux organelles différentes (Pochon et Gates , 2010).

Il a été montré que les clades, sous-clades et souches de *Symbiodinium* ne sont pas forcément répartis aléatoirement chez leurs hôtes. Chez les hôtes généralistes, l'hôte abrite systématiquement plusieurs souches de *Symbiodinium* sp. quel que soit le lieu d'échantillonnage. Chez les hôtes spécialistes, l'hôte abriterait le même symbiote indépendamment du milieu, mais les spécialistes stricts sont rares (Fabina et al., 2012).

b. Rupture de symbiose

L'augmentation de la température des océans, combiné à d'autres facteurs comme les maladies et l'acidification des océans (Hoegh-Guldberg, 1999; Hoegh-Guldberg et al., 2007), agissant en synergie (Coma et al., 2009), conduisent fréquemment à une rupture de la symbiose entre l'hôte et le symbiote, ce qu'on appelle le blanchissement. Sans son symbiote, lui fournissant la majorité de ses besoins en énergie, l'animal risque de périr. Le blanchissement, comme son nom l'indique, est caractérisé phénotypiquement par une décoloration de l'hôte due à l'expulsion des zooxanthelles hors du corps de l'hôte. Il est fréquemment utilisé comme marqueur de stress chez les Cnidaires symbiotiques.

Ce phénomène est particulièrement intense ces dernières décennies dû au changement climatique global et est la cause des mortalités massives au niveau des récifs coralliens, déjà précédemment mentionné (Alvarez-Filip et al., 2011; De'ath et al., 2012; Hoegh-Guldberg, 1999; Hoegh-Guldberg et al., 2007; Lesser, 2004; Normile, 2016).

c. Adaptation des Anthozoaires face au changement climatique

La tolérance face aux variations environnementales dépend du potentiel d'adaptation spécifique à chaque espèce ou chaque population (Brown et Cossins, 2011). Toutefois, dans un cadre évolutif, la vitesse actuelle d'adaptation et d'évolution des Anthozoaires ne sera peut-être pas suffisante par rapport à la vitesse des changements environnementaux (Gates et Edmunds, 1999). L'interaction qu'il y a entre l'hôte, ses symbiotes et l'environnement va pouvoir conditionner la fitness de l'holobionte (Mieog et al., 2009).

Par la mise en place de la symbiose, il y a eu une évolution réciproque (ou co-évolution) des deux partenaires, amenant à une fitness plus grande lorsque les deux partenaires sont considérés comme un tout. L'avantage de cette association est de pouvoir répondre à un grand nombre d'environnements différents car la sélection ne se fait plus au niveau de chacun des partenaires mais plutôt sur l'holobionte en entier (Parkinson et Baums, 2014), qui est alors vu comme une unité de sélection dépendant du génotype de l'hôte et du symbiote (Maynard Smith, 1991).

La répartition des clades au sein des coraux n'est pas homogène. Ceci est dû au fait qu'une partie de la diversité génétique au sein du genre *Symbiodinium* est liée à des capacités fonctionnelles variables en fonction de l'environnement et donc il en résulte des spécificités différentes dans la tolérance aux changements environnementaux. On voit par exemple que dans le cas du genre *Pocillopora* (Scleractinia) dans le Pacifique Est, la présence de *Symbiodinium* de type D1 est un déterminant important qui explique pourquoi les colonies le possédant survivent à de longues périodes de stress (LaJeunesse et al., 2010).

La capacité de photoacclimatation de l'holobionte et la diversité génétique au sein du genre *Symbiodinium* a donc permis la colonisation de nombreux habitats avec un taux d'irradiance très variable. Mais avant d'acquérir un type de symbiote adapté à son environnement, l'holobionte passe par une phase de stress pouvant provoquer un phénomène de blanchissement.

Buddemeier et Fautin, (1993), ont premièrement émis l'hypothèse que ce blanchissement est en fait un mécanisme adaptatif grâce auquel l'hôte peut acquérir de nouvelles zooxanthelles plus adaptées au milieu environnant : c'est l'hypothèse du blanchissement adaptatif ou ABH (Adaptative Bleaching Hypothesis). L'ABH est définie comme la perte des symbiotes d'un hôte permettant le rétablissement de la symbiose avec un autre type de symbiote, résultant en un nouvel holobionte mieux adapté aux nouvelles conditions environnementales (Buddemeier et Fautin, 1993; Fautin et Buddemeier, 2004; Ware et al., 1996). L'explication évolutive du blanchissement est assez obscure. Deux hypothèses : le blanchissement amènerait un avantage sélectif à l'hôte dans des conditions environnementales différentes (mais bénignes) des conditions actuelles, ou alors le blanchissement serait un produit dérivé négatif d'un trait symbiotique avantageux comme l'élimination de zooxanthelles endommagés (Douglas, 2003).

Toutefois, tous les Cnidaires symbiotiques n'ont pas forcément cette flexibilité d'association. La co-évolution a construit, chez certaines espèces, une spécificité entre hôte et symbiote qui empêche le changement de partenaires et par conséquent peut limiter les capacités d'acclimatation et d'adaptation. L'étude de la diversité génétique au sein d'*Eunicea flexuosa* (Lamouroux, 1821) et des *Symbiodinium* sp. a montré une association étroite entre des lignées distinctes du symbiote avec son hôte en fonction de la profondeur (Prada et al., 2014). De plus, une transplantation réciproque a révélé que l'effet de l'association génotype hôte et génotype symbiote est plus forte que la relation avec la profondeur, prouvant le lien étroit entre les deux partenaires (Prada et al., 2014). Ceci prouve clairement qu'une co-évolution existe entre le génotype hôte et le génotype symbiote, pouvant amener à un potentiel d'adaptation différent et mener à une divergence de chaque holobionte par spéciation.

En conclusion, l'acquisition de la symbiose et la diversité génétique au sein du symbiote et de l'hôte ont permis la colonisation d'un grand nombre d'environnements par les Cnidaires car le potentiel d'adaptation entre les génotypes hôte et symbiote est important. Connaître la diversité génétique chez les deux partenaires est un préalable essentiel, car l'association entre l'hôte et le symbiote pourrait être le fait d'une co-évolution pouvant amener à une spéciation de chaque holobionte.

1.4.4 *Anemonia viridis* (Forskål, 1775)

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis intéressé à un Cnidaire symbiotique vivant dans un environnement tempéré, l'anémone de mer *Anemonia viridis*.

a. Avantages du modèle

Pour mieux comprendre l'origine de la sensibilité/résistance aux variations climatiques des Cnidaires, il est intéressant d'étudier le potentiel adaptatif d'un Cnidaire symbiotique vivant en milieu tempéré. La répartition géographique d'*A. viridis* fait qu'elle subit des gammes de températures qui seraient létales pour les récifs coralliens. On la retrouve beaucoup en Méditerranée, mais aussi tout le long de la côte Atlantique, et ainsi jusqu'aux côtes anglaises de la Manche. Récemment, des naturalistes l'ont retrouvée localement aux Pays-Bas. En plus de sa répartition géographique, *A. viridis* est présente en surface mais aussi jusqu'à 30m de profondeur, en mer mais aussi dans des lagunes ou des cuvettes créées par les marées dans la Manche.

Par ailleurs, c'est un organisme déjà très étudié dans sa réponse aux stress. Richier et al. (2005) ont montré une résistance accrue face à un stress oxydatif comparé à des anémones non symbiotiques. Ganot et al. (2011) et Moya et al. (2012) ont mis en évidence une série de gènes ou gènes « Kern »⁵ dont l'expression est modifiée en fonction de différents stress comme les UV, la température et/ou l'absence de symbiotes, travaux rendus possibles grâce à une banque d'EST (Sabourault et al., 2009). Ventura et al. (2016) ont montré que l'acidification du milieu n'entraînait aucune variation dans le taux de photosynthèse net. Toutes ces données indiquent clairement une capacité d'acclimatation de l'organisme face à son environnement.

De plus, la nature des échanges moléculaires entre les partenaires de cette symbiose commence à être explorée. (Revel et al. 2016) ont mis en évidence le transfert du symbiote vers l'hôte de certains précurseurs d'acides gras. Dani et al. (2017) ont identifié la protéine NPC1 comme marqueur potentiel de la membrane périsymbiotique chez *A. viridis*.

Ces différents travaux ont été facilités par la séparation des différents tissus que sont l'épiderme, le gastroderme et les symbiotes (Bénazet-Tambutté et al., 1996), ce qui est possible chez *A. viridis* mais pas chez la majorité des coraux tropicaux.

⁵ « Kern » = noyau en allemand

Enfin, *A. viridis* présente 5 morphes (Wiedenmann et al., 1999) qui se distinguent sur base de leur morphologie (taille du polype, nombre de tentacules, couleur du corps et de la pointe des tentacules), leur mode de reproduction et leur composition en protéines fluorescentes GFP-like (figure 1.10). L'intérêt de cette diversité de forme est qu'elle pourrait être une réponse plastique de l'anémone face à l'environnement, pourrait venir d'une adaptation à des conditions environnementales ou même pourrait représenter des lignées génétiques indépendantes divergeant les unes par rapport aux autres par des phénomènes de spéciation.



Figure 1.11 : Photo de deux anémones *A. viridis*. A gauche, *A. viridis* var. *smaragdina* et à droite *A. viridis* var. *rustica*.

1.5 Objectifs de la thèse

Lors de mes travaux, je me suis intéressé au potentiel d'adaptation chez *A. viridis*. Dans ce but, il a d'abord fallu déterminer le statut taxonomique des morphes d'*A. viridis* car dans le cas où ceux-ci représentent des lignées génétiques différentes, ils pourraient avoir un potentiel d'adaptation différent. En conséquence, connaître les relations génétiques entre les morphes d'*A. viridis* était un prérequis nécessaire pour étudier par la suite les phénomènes d'acclimatation et d'adaptation.

Le premier objectif de ma thèse était donc de clarifier le statut taxonomique des morphes d'*A. viridis*. La stratégie expérimentale qui m'a permis de répondre à cet objectif est décrite dans le chapitre 2.2. Les résultats et discussion sont présentés en chapitre 3, avec à l'appui la

publication 1 intitulée «Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria)» et de la publication 2 en préparation intitulée «Morphological differentiation and species delimitation within the holobiont *Anemonia viridis*».

Le second objectif de ma thèse, concerne l'étude de l'adaptation locale chez *A. viridis* et fait l'objet du chapitre 4, dont les résultats obtenus sont présentés sous forme d'une troisième publication en cours de préparation. La stratégie expérimentale utilisée pour étudier le potentiel d'adaptation de l'anémone est décrite dans le chapitre 2.2.

Chapitre 2
Stratégies
expérimentales

La biologie évolutive et la taxonomie intégrative* se sont fortement développées au cours des dernières décennies grâce à l'arrivée de techniques d'acquisition et de traitement de données de plus en plus sophistiquées. Par extension, les outils permettant de traiter les données moléculaires sont devenus plus efficaces pour faire face à une quantité de données toujours plus grande. Aujourd'hui, les techniques de type « Next-Generation Sequencing » permettent de caractériser génétiquement des individus, des populations ou des espèces de manière beaucoup plus fine et fournissent une grande quantité d'informations sur la diversité génétique, l'adaptation locale, le potentiel évolutif et la délimitation taxonomique des populations et ce, même chez des espèces dites, à bon ou mauvais escient, « non-modèles ».

Ce chapitre a pour but de décrire comment, pour répondre à mes deux objectifs de thèse, j'ai eu recours à des techniques NGS. Premièrement, je décrirai les différentes techniques que j'ai utilisées pour créer la base de données de marqueurs moléculaires qui m'ont servi tout au long de ma thèse. Dans un deuxième temps, je me concentrerai sur la stratégie expérimentale mise au point dans le but de déterminer le nombre de lignées génétiques au sein d'*Anemonia viridis*. Enfin, dans la troisième partie de ce chapitre, je décrirai la stratégie expérimentale utilisée pour détecter des phénomènes d'adaptation locale.

2.1 Détection des variations génétiques et marqueurs moléculaires choisis

Dans le cadre de cette thèse, je me suis concentré sur deux types de marqueurs moléculaires, les EPIC (Exon-primed Intron-crossing sequences) et le RADseq (Restriction-site Associated DNA sequences), avec comme objectif de mettre en évidence des variations génétiques entre individus:

- les SNP (Single Nucleotide Polymorphism), correspondant à un changement d'une base à une position donnée dans la séquence d'ADN et résultant en différents variants nucléotidiques au niveau de cette position
- les insertions et délétions (=indels) d'un fragment d'ADN de taille variable

Par ailleurs, dans le cadre de ce travail, j'ai également été amené à utiliser des loci microsatellites : courtes séquences de 1 à 5 bases pour les microsatellites, répétées en tandem.

2.1.1 Les marqueurs EPIC

Un marqueur « Exon-primed Intron-crossing sequence » ou EPIC permet d'amplifier une séquence intronique à partir d'amorces situées dans les régions codantes flanquant cet

intron, les exons, évoluant moins rapidement (Subramanian et Kumar, 2003) et donc supposément moins variables (figure 2.1).

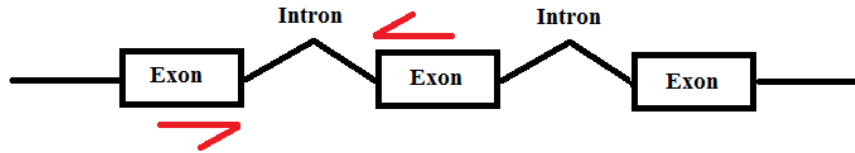


Figure 2.1 : Présentation d'un gène alternant introns et exons à partir duquel des amorces se situant dans les exons flquant un intron spécifique sont mises au point (demi-flèches rouges).

Cette particularité donne l'opportunité d'accéder à la diversité intraspécifique tout en permettant l'utilisation des amorces sur un groupe taxonomique plus large que l'espèce (Lessa, 1992; Palumbi et Baker, 1994), d'où l'intérêt pour ces marqueurs. En effet, nous cherchions à déterminer si les morphes étaient des espèces à part entière ou non. Par conséquent, avoir des amorces au niveau des exons assurait l'amplification chez d'éventuelles espèces différentes tout en permettant d'avoir suffisamment de résolution pour accéder à la diversité intraspécifique. La mise au point de ces marqueurs a néanmoins été laborieuse car la position des introns dans les gènes d'intérêts sélectionnés était inconnue chez *A. viridis*.

Les difficultés rencontrées lors de la mise au point de ces marqueurs relevaient certainement du fait que ceux-ci ont été développés non pas sur des gènes de ménage « universels » mais sur des loci bien précis d'*A. viridis*. En effet, ils ont été conçus à partir d'une liste de gènes appelés gènes « Kern » (Ganot et al., 2011; Moya et al., 2012). Ces gènes voient leur expression modifiée chez *A. viridis* lors de l'induction d'un stress température et/ou UV *in aquaria* ou au cours d'un état aposymbiotique (blanchi). Ils sont donc potentiellement des acteurs importants dans les mécanismes d'acclimatation voir d'adaptation (chapitre 4). Par ailleurs, l'utilisation de gènes de stress ne devrait pas poser de problème pour la délimitation d'espèces puisque, selon la littérature, ces gènes, potentiellement non neutres, pourraient même être des marqueurs plus efficaces que les marqueurs neutres pour la délimitation des lignées indépendantes (Bensch et al., 2002; Garvin et al., 2010). Ces EPIC sont détaillés et analysés dans l'Article 1 (cf Chapitre 3) et l'Article 3 (cf Chapitre 4).

2.1.2 Les marqueurs RADseq

Même si les techniques NGS se sont fortement développées ces dernières années, on ne peut toujours pas séquencer des génomes entiers dans le cadre d'une étude populationnelle. Il faut encore avoir recours à des méthodes de réduction de la complexité du génome et mesurer la diversité génétique sur une portion réduite du génome. C'est ce que permettent les marqueurs de type « Restriction-site Associated DNA sequencing » (RADseq) qui ciblent les séquences flanquant les sites de restriction d'une endonucléase donnée. Cette technique a premièrement été utilisée pour détecter des SNP altérant un site de restriction ou des variations de longueurs entre deux sites de restrictions due à la présence d'indels (Miller et al., 2007), de la même manière que des méthodes plus anciennes comme les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et RFLP (Restriction-site Fragment Length Polymorphism). Baird et al. (2008) ont développé la première méthode *sensu stricto* de RADseq en couplant une approche de type AFLP à des techniques NGS de séquençage de masse. L'intérêt pour les méthodes de séquençage de masse (NGS) de type RADseq ne fait que croître depuis quelques années (Andrews et al., 2016). Ceci est dû aux nombreuses applications de ce type de méthodes (Andrews et al., 2016; Seehausen et al., 2014) dont notamment pour des questions phylogénétiques (Cariou et al., 2013; Eaton et Ree, 2013; Lemmon et Lemmon, 2013; McCormack et al., 2013; Ree et Hipp, 2015; Rubin et al., 2012; Suchan et al., 2017; Wagner et al., 2013; Warner et al., 2015) et de détection de l'adaptation locale (Hoban et al., 2016; Lamichhaney et al., 2012; Picq et al., 2016; Savolainen et al., 2013; Sork et al., 2013; Tiffin et Ross-Ibarra, 2014).

Un schéma de la méthode RADseq est présenté en figure 2.2. Le génome de chacun des individus est digéré individuellement par un enzyme de restriction, formant des fragments de longueurs variables dépendant de l'enzyme de restriction utilisée et de sa fréquence de coupe au sein du génome (figure 2.2 A). On ajoute à chaque fragment un « barcode » unique de quelques paires de bases, spécifique à l'individu ainsi qu'un adaptateur spécifique à la technique de séquençage utilisée, qui permettra l'amplification et le séquençage en masse (figure 2.2 B). Les produits de digestion de chaque individu sont alors regroupés dans une banque. Le nombre d'individus rassemblés par banque dépend de la couverture de séquençage souhaitée (dépendant du rendement de la technique de séquençage utilisée et du nombre de sites de restriction par individu). Les banques sont ensuite fragmentées aléatoirement en plus petits morceaux par sonication et une sélection de taille (300-600pb) des fragments est effectuée sur chaque banque. Un second adaptateur est ajouté à l'autre extrémité ainsi créée sur chaque fragment et on procède finalement à une PCR qui permet

d'enrichir la banque en séquences flanquées par ces adaptateurs (figure 2.2 C) (Baird et al., 2008; Davey et Blaxter, 2010).

La seconde partie de la méthode est le séquençage à proprement parler. Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé un séquençage de type Illumina HiSeq 2000 en passant par la plateforme de séquençage de l'institut Pasteur de Lille. Le séquençage Illumina peut être résumé en trois étapes : ajout de la banque sur une section (= « lane ») de la flow cell (membrane possédant des millions de sites complémentaires aux adaptateurs utilisés), amplification locale par « ponts » de chaque fragment d'ADN fixé sur la membrane et enfin séquençage par insertion des nucléotides sur la membrane. L'intérêt de cette technique est que, chaque nucléotide, quand celui-ci est inséré dans le fragment fixé, émet un photon qui sera reconnu par une caméra. En procédant à une insertion successive des quatre nucléotides, il est possible de déterminer la séquence de chacun des fragments situés sur la flow cell. L'amplification locale par « ponts » avant séquençage permet d'amplifier le signal lumineux, qui sera alors mieux détecté par la caméra. Le séquençage peut se faire de deux manières : en single-end (séquençage à partir du premier adaptateur) ou en paired-end (séquençage à partir de chacun des deux adaptateurs). Dans le cadre de cette thèse, j'ai obtenu, par séquençage single-end, des fragments d'environ 100pb (figure 2.2 D).

L'étape suivante est de reconstruire les loci par des outils bio-informatique (figure 2.2 E), comme détaillé dans le paragraphe 2.2.2.b ci-dessous et l'Article 2 du Chapitre 3).

L'intérêt principal de la méthode RADseq comme présenté ci-dessus réside dans la quantité de loci obtenus après séquençage NGS. En effet, suivant le type d'enzyme de restriction utilisé, l'ADN d'un individu sera coupé plus ou moins fréquemment et de manière aléatoire sur l'ensemble du génome, que ce soit au niveau des zones codantes comme au niveau des zones non-codantes. En comparant les séquences provenant des sites de coupures entre individus, on obtient une image globale de la diversité génétique. Toutefois, les sites de coupure étant répartis aléatoirement, déterminer l'origine des loci RAD est difficile sans un génome de référence ou toute autre base de données génétique.

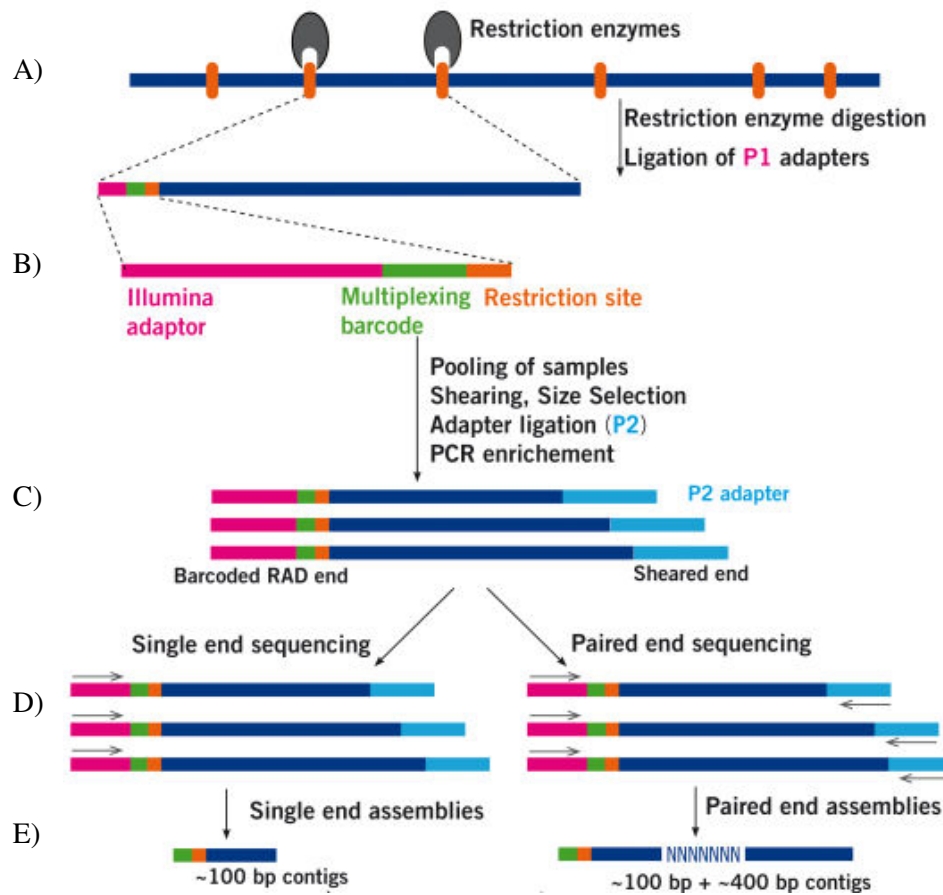


Figure 2.2 : Etapes de construction d'une banque RADseq. A) Digestion enzymatique de l'ADN de chaque individu. B) Ligation d'un barcode individuel et d'un adaptateur P1 sur chaque fragment. C) Multiplexage des individus en une banque, réduction et sélection de fragments d'environ 300 à 600pb, ligation d'un adaptateur P2 et amplification des fragments par PCR. D) Séquençage single-end ou paired-end par la technologie Illumina. E) Reconstruction des loci RAD (<http://www.floragenex.com/rad-seq/>)

De plus, la profondeur de séquençage pour chaque individu va dépendre de la taille du génome, du nombre d'individus dans une banque, de l'enzyme de restriction mais aussi de la présence éventuelle de contamination d'ADN étranger. Etant donné la présence de symbiotes au sein d'*A. viridis*, une extraction sur l'holobionte aurait forcément amené de l'ADN de *Symbiodinium* sp. au niveau du séquençage Illumina. Une trop grande contamination aurait diminué le nombre de lectures (une lecture, ou read en anglais, est une séquence produite par NGS) attribué à chaque individu. En effet, chaque banque est séquencée sur une membrane, cette membrane ayant une capacité de lectures fixe (jusqu'à $2 \cdot 10^9$). Sans contamination, l'ADN animal se répartit sur l'ensemble de la membrane. Lors d'une contamination, c'est un mélange d'ADN animal et du symbiote qui se répartit sur la membrane. Par conséquent, les lectures séquencées provenant réellement de l'animal seront

en proportion plus faible car ils n'auront pas occupé toute la membrane. L'impact réel de cette contamination restait à être estimé.

Une seconde limitation repose sur la qualité de l'ADN. Lors de l'étape de réduction de taille des fragments d'ADN par sonication, celle-ci n'est réellement efficace que si les fragments sont suffisamment longs. Par exemple, lors de l'étape de reprise de la banque sur gel (après sonication) dans le but de sélectionner une taille de fragments comprise entre 300 et 600 paires de base, un ADN de trop mauvaise qualité se retrouverait sous la bande de 300pb et par conséquent serait perdu à cette étape, appauvrissant la banque des individus dont l'ADN est de plus mauvaise qualité. Ceci pose un réel problème lorsque l'on utilise des échantillons conservés depuis longtemps, ce qui a été notre cas pour une partie de nos populations.

2.2 Stratégie expérimentale pour la délimitation des espèces chez *Anemonia viridis*

Un des premiers objectifs de mon travail de thèse consistait dans la délimitation d'espèces chez *Anemonia viridis* dont les résultats sont décrits dans le chapitre 3. Nous avons notamment testé si la différenciation génétique des individus pouvait se faire selon leur origine géographique ou selon leur morphologie. Une stratégie d'échantillonnage *ad hoc*, couplée à des méthodes de délimitation d'espèces (SpedeSTEM, BPP et SVDQuartet), a permis de révéler la présence ou l'absence de lignées génétiques indépendantes au sein de l'espèce étudiée.

2.2.1 Stratégie d'échantillonnage

Nous avons procédé à un échantillonnage hiérarchisé. Deux régions géographiques indépendantes ont été choisies : la Mer Méditerranée et la Manche. Pour chacune de ces régions, plusieurs sites contenant deux morphes différents au minimum ont été échantillonnés. L'approche « EPIC Sanger » (voir 2.2.2.a) et l'approche RADseq (voir 2.2.2.b) ont été réalisées sur des échantillons hiérarchisés différents (figure 2.3 et table 2.1 pour les « EPIC Sanger » et figure 2.4 et table 2.2 pour le RADseq).

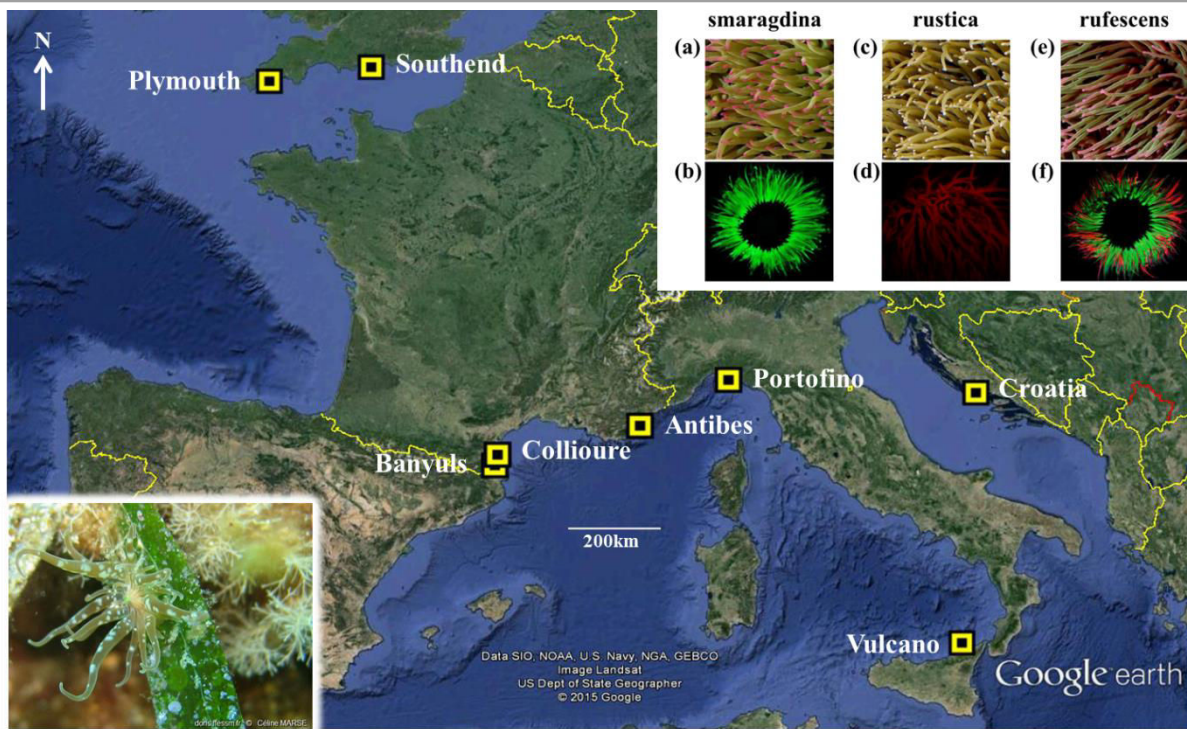


Figure 2.3 : Huit sites d'échantillonnage pour l'approche « EPIC Sanger » (carré jaune): six en Mer Méditerranée, deux dans la Manche. Le détail des échantillons est donné en table 2.2. En haut à droite se trouvent les trois morphes échantillonnés, respectivement var. *smaragdina*, *rustica* et *rufescens* avec les profils de coloration sous lumière claire en (a), (c) et (e), et sous lumière UV en (b), (d) et (f). En bas à gauche, le groupe externe *Paranemonia cinerea*.

Table 2.1 : Liste des individus échantillonnés pour le séquençage Sanger

Site	Morphe			Groupe externe
	Rustica	Rufescens	Smaragdina	
Alpes-Maritimes	2	/	2	/
Banyuls	2	/	2	/
Portofino	2	/	2	/
Vulcano	2	/	2	/
Southend	2	/	2	/
Croatie	2	/	2	/
Collioure	/	4	/	/
Plymouth	2	4	/	/
Culatra (Portugal)	/	/	/	1
Los Urrutias (Espagne)	/	/	/	1
Leucate (France)	/	/	/	1
Nubia (Italie)	/	/	/	1

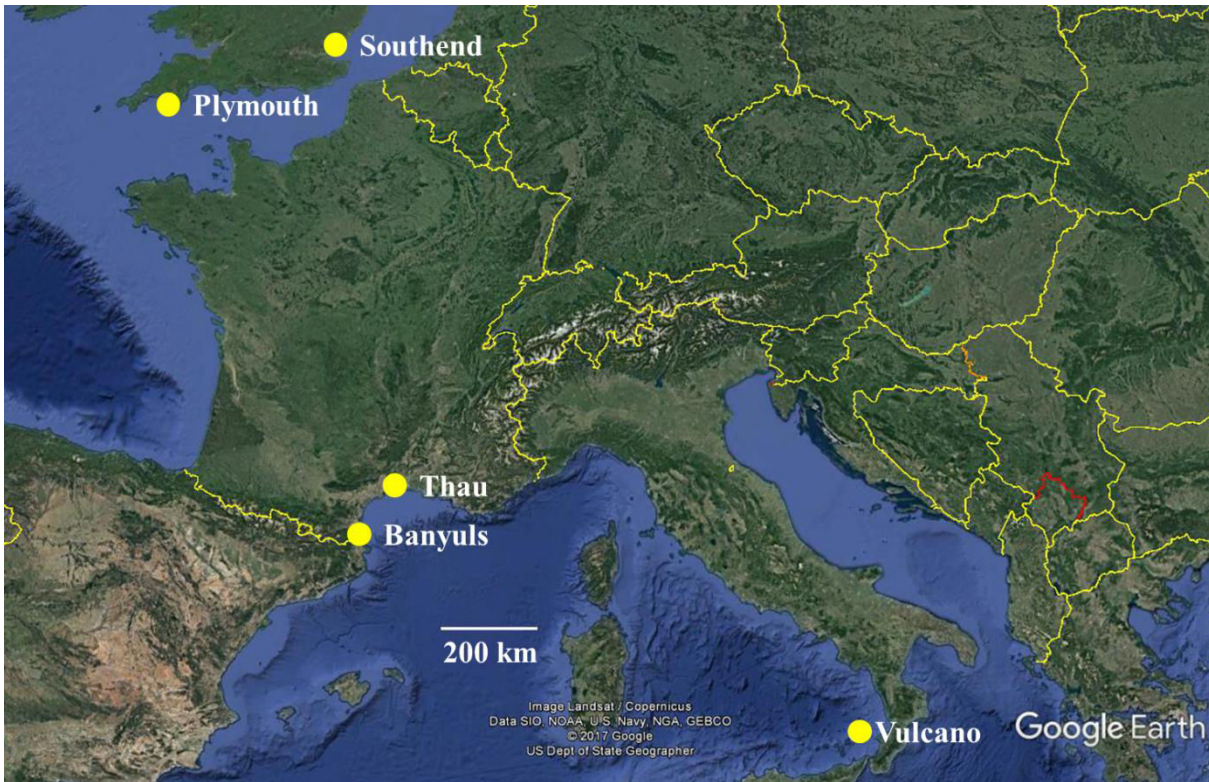


Figure 2.4 : Cinq sites d'échantillonnage pour l'approche RADseq (cercle jaune): trois en Mer Méditerranéenne, deux dans la Manche. Le détail des échantillons est donné en table 2.3

Table 2.2 : Individus échantillonnés pour l'étude du statut taxonomique des trois morphes d'*A. viridis* les plus abondants var. *rufescens*, *rustica* et *smaragdina*. La troisième colonne représente le nombre d'individus séquencés. Toutefois, au vu du faible nombre de loci détecté chez certains individus, un sous-échantillonnage d'individus comprenant au minimum 4000 loci a été effectué pour les analyses

Population	Morphe	Nombre d'individus séquencés	Nombre d'individus analysés
Banyuls	Rufescens	13	13
	Rustica	15	6
	Smaragdina	25	25
Plymouth	Rustica	15	15
	Rufescens	12	12
Southend	Rustica	13	13
	Smaragdina	13	13
Thau	Rustica	15	8
	Smaragdina	25	24
Vulcano	Rustica	16	6
	Smaragdina	16	2
Outgroup		4	3
Total		182	140

Grâce à cette stratégie, on a pu ainsi comparer la diversité génétique entre les morphes d'une même population, d'un morphe entre différentes populations et cela sur deux régions déconnectées.

2.2.2 Marqueurs moléculaires

a. Approche « EPIC en Sanger »

Le protocole complet de mise au point de ces EPIC est en Annexe A. Un résumé de ce protocole se trouve en table 2.3.

Parmi les gènes « Kern » décrits plus haut, 24 ont été choisis pour la suite des analyses. Pour chacun de ces gènes, la séquence EST correspondante (telle qu'obtenue par Sabourault et al. en 2009) a été comparée avec les gènes orthologues putatifs tirés des génomes de deux autres espèces de Cnidaires, *Nematostella vectensis* (Stephenson, 1935), génome publié par Putnam et al. (2007) et *Acropora digitifera* (Dana, 1846,) génome publié par Shinzato et al. (2011), afin de repérer les introns dont la position dans le gène est conservée entre les deux espèces. Pour chacun des introns conservés entre les deux génomes, une paire d'amorces a été construite à l'aide du logiciel Primer3 (Rozen et Skaletsky, 1999). 37 paires d'amorces ont été ainsi définies pour être validées expérimentalement (test d'amplification sur un individu, et de conservation sur 16 individus, voir table 2.3). La validité des loci et leur polymorphisme ont ensuite été testés sur un jeu d'individus réduit, puis, pour les loci validés, l'échantillon entier (table 2.2) comportant des individus d'*A. viridis* répartis sur 3 morphes (var. *rufescens*, *rustica* et *smaragdina*) et 4 individus de *Paranemonia cinerea* (Contarini, 1844) constituant le groupe externe. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans l'**Article 1**.

Table 2.3 : Pipeline de mise au point des marqueurs EPIC de gènes de stress.

Étapes de mise au point des EPIC	Nombres d'EPIC après chaque étape
1) <i>Bio-informatique</i>	
• Comparaison avec <i>N. vectensis</i> et <i>A. digitifera</i>	40
• Recherche d'amorces PCR	37
2) <i>Biologie moléculaire</i>	
• Validation des amorces	21
• Test de conservation	14
3) <i>Analyse des données</i>	
• Séquençage Sanger	9
• Test de polymorphisme	5

La méthode de séquençage utilisée ici est le Sanger (Sanger et al., 1977). Etant donné qu'*A. viridis* et *P. cinerea* sont deux organismes diploïdes, le séquençage Sanger résulte en deux séquences haplotypiques pour chaque individu (Flot et al., 2006, 2008). Elle permet d'obtenir des séquences longues, en l'occurrence de la longueur totale de nos marqueurs. Le séquençage direct des produits d'amplification, en présence d'indels, a permis de définir les 2 haplotypes de chaque individu diploïde en mettant en phase les SNPs et indels. Quand les haplotypes contenaient plus d'un indel, la lecture et la distinction des deux haplotypes devenaient rapidement difficile, montrant une limitation certaine à la méthode par séquençage Sanger (Garvin et al., 2010), ce qui fut le cas notamment pour deux de nos EPIC. Nous avons alors eu recours au clonage du produit PCR et dû ensuite séquencer un nombre suffisant de ces clones pour obtenir les 2 haplotypes de chaque individu.

Dans la suite de la thèse, je ne parlerai plus d'EPIC car certains des loci obtenus ne contenaient finalement pas d'introns mais du polymorphisme dans les phases codantes. Les séquences obtenues seront désignées sous le nom de marqueurs de gènes de stress.

b. Les loci RADseq par la technologie Illumina

Les marqueurs RADseq ont été construits sur des regroupements d'individus allant de 32 à 44 individus par banque, en utilisant l'enzyme *PstI*-HF (New England Biolabs), donnant ainsi un nombre de lectures moyen par individu de 4 086 151 ($\pm 3 834 869$ SD). Ces lectures sont par la suite démultiplexés (reconnaissance des barcodes et attribution de chaque lecture à un individu), filtrés et clusterisés (regroupement des lectures en évitant le plus possible le regroupement de loci paralogues et en limitant la proportion de données manquantes) formant ainsi un nombre de loci pour chaque individu. De ces loci, il a été ensuite possible d'extraire les SNP di-alléliques.

Pour contrôler l'effet de la qualité d'ADN et de la contamination en zooxanthelles, il a été nécessaire de construire deux banques test. La première était composée d'extraits d'ADN de bonne qualité appauvries en zooxanthelles parce que tirés du tissu épidermique non symbiotique et la seconde était constituée d'extraits d'ADN de moins bonne qualité avec une contamination forte en zooxanthelles (extraction sur l'ensemble des tissus). Dans l'ensemble, nous n'avons pas vu d'effet de la présence de symbiotes lors du séquençage. Par contre, la qualité de l'ADN a grandement contribué à la quantité

de loci reconstruits après séquençage, notamment chez les individus provenant de Vulcano. C'est pour cela que nous n'avons pas considéré les individus avec moins de 4000 loci dans l'analyse de la délimitation des morphes.

c. Diversité symbiotique par l'ITS2

Afin d'inférer la diversité génétique des symbiotes intra et inter morphes, un locus spécifique amplifiant une partie de l'ADN ribosomal (ITS2) a été séquençé par NGS (séquençage d'amplicons) sur l'ensemble des individus analysés en RADseq. Ce locus a été choisi car c'est un marqueur classiquement utilisé pour l'étude de la diversité génétique au sein de *Symbiodinium* sp. (Stat et al., 2012). Après amplification spécifique par PCR de l'ITS2 au sein de chacun des individus, les amplicons ont été séquençés avec une technologie NGS : le séquençage Illumina sur plateforme MiSeq. Il existe deux différences majeures avec la technologie HiSeq. La première est la taille des amplicons séquençés, qui est d'environ 250pb pour le MiSeq contre 100pb pour le HiSeq. La seconde est que le nombre de fragments séquençés par flowcell (nombre de lectures total) est 100 fois moindre pour le MiSeq (environ 20 millions de lectures).

Le modèle d'étude pose malgré tout un problème dans le cadre de l'identification des séquences ITS2. En effet, une anémone peut posséder plusieurs millions de *Symbiodinium* sp. par mg de protéines (Ventura et al., 2016; Zamoum et Furla, 2012). Il peut donc y avoir une diversité de séquences ITS2 à l'intérieur de chaque anémone, ce qui pose problème pour les méthodes classiques d'identification des loci après séquençage en masse par NGS. Ce travail a été effectué au sein du laboratoire dans le cadre du travail doctoral de Barbara Porro et les résultats sont présentés dans la publication 2 (Chapitre 3).

2.2.3 Clefs d'analyse

Une fois la base de données acquise, il faut encore interpréter ces données. Dans le cas de la distinction des morphes, j'ai pris le parti d'utiliser la théorie de la coalescence pour reconstruire des arbres d'espèces (Fujita et al., 2012) par une approche multi-locus (Dupuis et al., 2012). En effet, cette approche coalescente est devenue un standard dans les problématiques de délimitation d'espèces (Carstens et al., 2013). La coalescence* est un processus décrivant la rencontre de deux lignées en un même ancêtre lorsque l'on parcourt en sens inverse du temps la généalogie d'un échantillon de gènes dans une population (Kingman, 2000). En d'autres termes, si l'on prend deux individus qui possèdent chacun une copie différente d'un gène, on va remonter jusqu'à l'ancêtre commun des deux copies de

gènes, ce qu'on appelle, le point de coalescence. A partir de cela, il est possible de construire un arbre de gènes qui va des copies présentes dans l'échantillon d'individus jusqu'à l'ancêtre commun de toutes ces copies de gènes.

Jusqu'à récemment, la construction d'arbres de gènes était utilisée comme proxy pour l'arbre d'espèces (Degnan et Rosenberg, 2009). Toutefois, l'utilisation de plusieurs arbres de gènes pose problème. En effet, chaque arbre de gène reflète une histoire évolutive différente, liée à l'histoire des espèces mais qui peut être significativement différente d'un gène à l'autre (figure 2.5) (Szöllösi et Daubin, 2012). Par ailleurs, la coalescence ne permet pas de prendre en compte plusieurs facteurs pouvant influencer l'évolution de gènes entre espèces. C'est notamment le cas des phénomènes de duplication, des transferts horizontaux, et de la perte d'un gène (Szöllösi et al., 2015).

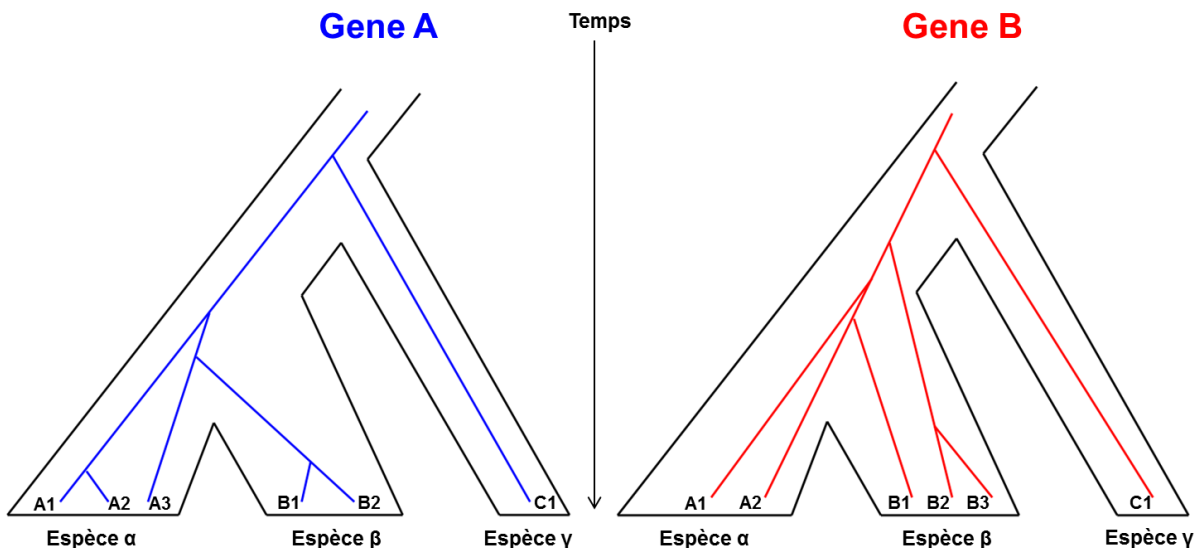


Figure 2.5 : Différents arbres de gènes au sein d'un même arbre d'espèces. Le gène A et B n'ont pas les mêmes histoires de coalescence au sein d'une même généalogie d'espèces. Les points de coalescences dépendent de l'apparition aléatoire de mutations et non des spéciations. De la même manière, la perte d'un variant allélique au sein d'une lignée dépend de la dérive génétique, elle aussi aléatoire. A partir de différents arbres de gènes, il est possible de reconstruire un arbre d'espèce le plus compatible avec ces différentes histoires de coalescence (d'après Fujita et al., 2012).

Par conséquent, l'utilisation d'arbres de gènes comme proxy pour délimiter les espèces sera fortement compromise par l'incongruence qu'il peut y avoir entre arbre de gènes et arbre d'espèces (Maddison, 1997; Rosenberg, 2002).

Les méthodes actuelles de reconstruction d'arbres d'espèces combinent les données de tous les arbres de gènes disponibles pour émettre l'hypothèse la plus probable d'arbre d'espèce. Ceci peut se faire par l'estimation par coalescence de l'arbre d'espèce le plus probable ou

par la construction d'un « supergène » par concaténation (Degnan et Rosenberg, 2009). D'après Edwards et al. (2007), la concaténation ne fonctionne pas correctement à partir du moment où il y a 5 ou plus taxons car celle-ci ne permet pas d'hétérogénéité de réponse entre arbres de gènes. Par conséquent, les méthodes utilisées dans cette thèse sont toutes basées sur la coalescence pour inférer l'arbre d'espèce le plus probable d'après l'ensemble des arbres de gènes, ce qui a été fait sur *A. viridis* avec les marqueurs de gènes de stress (approche EPIC par Sanger) par l'approche SpedeSTEM (Ence et Carstens, 2011) et BPP (Yang, 2015) (Article 1, chapitre 3).

Un reproche pouvant être fait dans l'utilisation de gènes de stress pour délimiter les espèces est que ces gènes pourraient ne pas être assez variables car soumis à sélection conservatrice. Cependant, Bensch et al. (2002) et Garvin et al. (2010) avancent que ces gènes pourraient justement être des bons marqueurs de divergence. Afin de vérifier que nos marqueurs de gènes de stress sont des marqueurs appropriés dans le cadre de la délimitation d'espèces, j'ai mené, en parallèle, une approche RADseq sur un nombre d'individus plus important pour vérifier que le statut taxonomique des morphes d'*A. viridis* avait été correctement identifié par les marqueurs de gènes de stress. Dans cette approche, la délimitation d'espèces a été faite à partir des SNP di-alléliques en utilisant SVDQuartets (Chifman et Kubatko, 2014) (Article 2, chapitre 3).

2.3 Stratégie expérimentale pour la détection de l'adaptation locale chez *Anemonia viridis*

Le but de l'objectif 2 était de détecter des phénomènes d'adaptation locale pour estimer le potentiel d'adaptation d'*Anemonia viridis* ; les résultats sont décrits dans le chapitre 4. La manière la plus efficace de répondre à cet objectif était de rechercher des sites où un gradient de sélection par rapport aux conditions environnementales pouvait s'exercer. En appliquant des méthodes de détection de loci outlier, ici BAYESCAN (Foll et Gaggiotti, 2008) et PCAdapt (Luu et al., 2017), c.à.d. dont la distribution des fréquences alléliques le long du gradient était significativement différente de celle de l'ensemble des loci, il est possible de mettre en évidence des gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation locale. De plus, le sous-objectif supplémentaire de cette partie était de tester si les gènes de réponse au stress étaient impliqués dans l'adaptation locale.

2.3.1 Stratégie d'échantillonnage

De manière similaire à la stratégie expérimentale utilisée pour les morphes, un échantillonnage hiérarchisé a été effectué. Premièrement, cinq sites déconnectés géographiquement ont été choisis. Dans chacun de ces sites, deux populations a priori du même pool génique ont été choisies de telle sorte qu'il y ait un gradient de sélection possible entre les deux populations (i.e. pouvant ainsi conduire à l'adaptation locale). Deux types de gradients environnementaux ont été sélectionnés :

- la modalité surface/profondeur dans laquelle la quantité de lumière reçue varie avec la profondeur et où la température en surface peut subir des variations quotidiennes plus importantes ;
- la modalité lagune/mer, où la salinité et la température au niveau de la lagune sont plus variables que du côté mer.

Les cinq sites sélectionnés avec les 2 populations dans chacun des sites ainsi que les modalités écologiques sont décrites dans la table 2.4 et la figure 2.6.

Table 2.4 : Individus échantillonnés pour l'étude de l'adaptation locale chez *A. viridis*. Pour chaque site, deux populations ont été prélevées, provenant d'environnements contrastés.

population	Site	Morphe	Spécificité écologique (origine et profondeur)	Nombre d'individus
Bany1S	Banyuls		Mer/<1m	25
Bany5S			Mer/5-10m	25
BarcES	Barcarès		Lagune/<1m	25
BarcMS			Mer/ 1-2m	19
MarMaS	Marseille	Smaragdina	Mer/1m	25
MarPoS			Mer/30m	25
ScaSDS	Scandola		Mer/3m	21
ScaSSS			Mer/10m	25
ThauIS	Thau		Lagune/ <1m	25
ThauOS			Mer/ 1-2m	23
<i>Total</i>				238

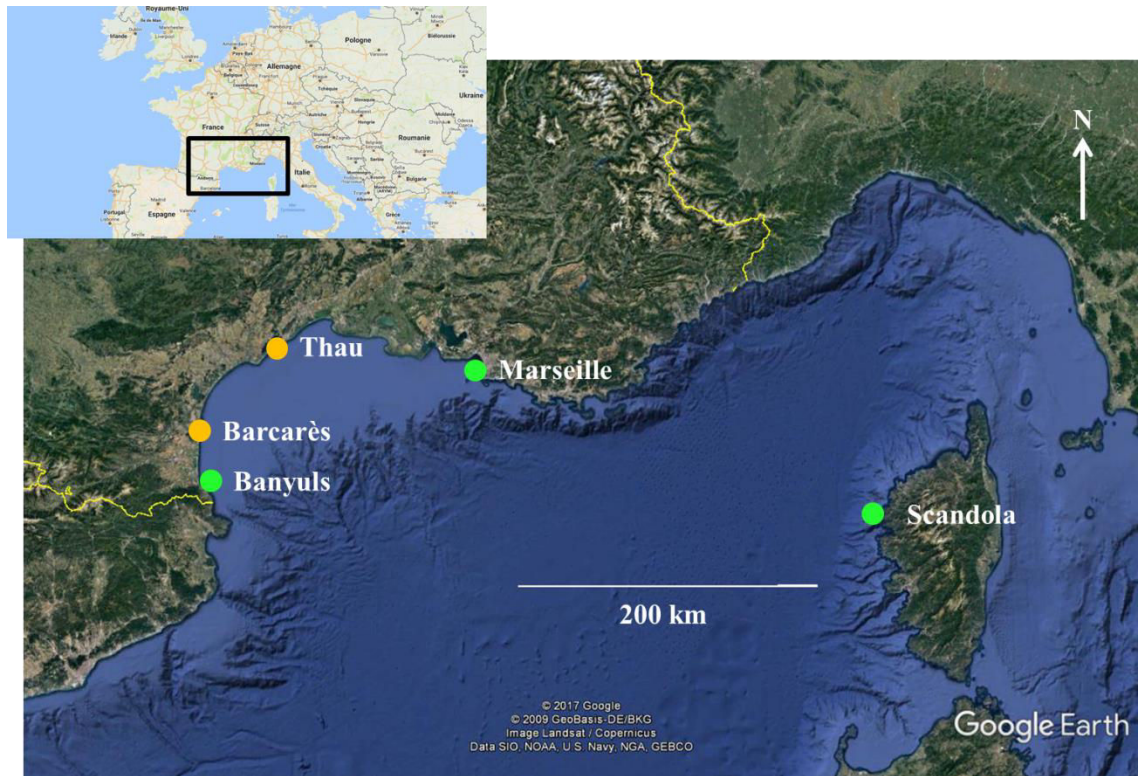


Figure 2.6 : Cinq sites d'échantillonnage en Mer Méditerranée pour l'adaptation locale. Les sites pour la modalité surface/profondeur sont en vert, les sites pour la modalité lagune/mer sont en orange.

Cette étude de l'adaptation a été menée en parallèle avec la délimitation d'espèces au sein des morphes. Par sécurité, temps disponible et contraintes budgétaires, seul le morphe *A. viridis* var. *smaragdina* a été étudié.

2.3.2 Marqueurs moléculaires

a. Les loci RADseq par la technologie Illumina

Les loci RAD pour l'étude de l'adaptation locale ont été mis au point de la même manière que pour les loci RAD utilisés pour l'analyser des morphes. Il est à noter que l'identification des loci RAD a été faite sur un jeu de données différent du précédent (ici, uniquement des individus *A. viridis* var. *smaragdina* de Mer Méditerranée). Par conséquent les jeux de données ne sont pas directement comparables entre les deux analyses RADseq.

b. Marqueurs de gènes de stress en NGS

Afin de déterminer si les gènes dont l'expression est modifiée lors de l'induction d'un stress environnemental sont également impliqués dans l'adaptation locale, l'idée était d'insérer les marqueurs de gènes de stress mis au point dans le chapitre 2.2.2.a dans la recherche de loci soumis à sélection. Pour ce faire, la technique Illumina MiSeq a aussi

été utilisée de la même manière que pour l'ITS2 chez le symbiote. La différence dans le cas des marqueurs de gènes de stress était que, ceux-ci étant présents en deux copies chez chaque anémone, organisme diploïde, il était plus facile de retrouver les haplotypes de chacune des anémones à l'aide d'un pipeline bioinformatique développé exactement pour ce type d'analyse, GATK (McKenna et al., 2010). Ainsi, une base de données de SNP provenant des marqueurs de gènes de stress a été ajoutée à l'analyse de détection d'outliers.

2.3.3 Clefs d'analyse

Le but ici est de déterminer quels sont les loci dont la répartition des allèles entre les populations au sein de chaque site est plus différenciée que pour la moyenne des loci dans le génome. Les types d'analyses utilisés ici relèvent donc du balayage génomique (« Genome Scan »). Par exemple, il est possible de détecter des loci SNP dits « outliers » en comparant leur valeur F_{st} par rapport à la valeur F_{st} moyenne sur l'ensemble des loci considérés (Akey et al., 2002). Le F_{st} est une mesure de la différenciation allélique entre populations. Le principe de cette analyse repose sur le fait que l'adaptation locale amène à une différenciation génétique forte entre deux populations, mais uniquement aux loci sélectionnés et ceux qui leur sont liés (de Villemereuil et Gaggiotti, 2015). Les loci avec une valeur F_{st} très haute par rapport au F_{st} moyen peuvent être considérés comme potentiellement impliqués dans l'adaptation locale. Cette approche, dite « F_{st} -scan », fait aujourd'hui débat dans le monde de la biologie évolutive quant à son efficacité à trouver de réels loci impliqués dans l'adaptation locale (Bierne et al., 2011, 2013a; Catchen et al., 2017; Lowry et al., 2017a, 2017b; McKinney et al., 2017). C'est pour cela que j'ai choisi d'utiliser deux techniques différentes de détection d'outliers BAYESCAN et PCAdapt.

Chapitre 3

Délimitation d'espèces

au sein

d'Anemonia viridis

L'adaptation locale est reconnue comme un mécanisme important de maintien de la diversité génétique (Kawecki et Ebert, 2004) à l'échelle de l'espèce mais qui permet aussi l'initiation de divergences entre espèces naissantes par des processus de spéciation (Schluter, 2001) comme la spéciation écologique (Lenormand, 2012). Le lien étroit qui existe entre adaptation locale au sein d'une population et divergence entre deux espèces peut poser problème dans le cadre de la protection des espèces face au changement climatique. Par exemple, au sein du genre *Acropora*, un corail constructeur de récif, il a été décrit 5 espèces dont trois sont actuellement classées au niveau « quasi menacée » sur la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN). Toutefois, les définitions d'espèces utilisées par l'UICN ne sont peut-être pas valides. En effet, des analyses génétiques ont amené à la découverte d'espèces cryptiques au sein du genre (Richards et al., 2016). En conséquence, le risque d'extinction des espèces formant réellement le genre *Acropora* reste à définir. De plus, étant donné que les lignées détectées dans le genre *Acropora* risquent de ne pas avoir le même potentiel d'acclimatation et d'adaptation, la mise en place d'un plan de conservation uniquement des trois espèces classées pourrait alors n'avoir qu'un faible impact sur la prévention de perte de biodiversité au sein du genre. Bien délimiter les espèces est donc un préalable indispensable pour l'étude du potentiel d'acclimatation et d'adaptation d'une espèce.

3.1 Le concept d'espèce

D'après la définition énoncée par Ernst Mayr en 1942 (définition biologique de l'espèce), une espèce est une population ou un groupe de populations dont les individus sont en mesure de se reproduire les uns avec les autres, et de produire une descendance viable et féconde. Cette définition basée sur le principe d'interfécondité, n'est pas la seule définition qui existe aujourd'hui. Au cours du XX^{ème} siècle, de nombreuses autres définitions sont apparues, basées sur d'autres concepts⁶ (De Queiroz, 2007). On peut noter, par exemple, l'utilisation du concept de niche écologique, avançant que deux espèces sont considérées comme distinctes lorsque leur niche écologique est différente (Van Valen, 1976). Une autre définition, appelée espèce phylogénétique (Cracraft, 1983), dit qu'une espèce est le plus petit regroupement d'organismes distincts des autres regroupements, soit le plus petit groupe monophylétique. Le caractère diagnostique utilisé ici peut être n'importe quel trait morphologique ou moléculaire. De premier abord, cette dernière définition semble facilement applicable. Toutefois, le désavantage de cette définition est qu'elle peut donner lieu à une inflation taxonomique,

⁶ Chaque concept utilise différentes propriétés pour définir ce qu'est une espèce. Ces propriétés peuvent être biologiques, écologiques et/ou génétiques, mais toutes vont mener à des délimitations différentes entre entités biologiques.

résultant en un nombre d'espèces surestimé par rapport à la réalité. Dans le cadre des espèces cryptiques*, une définition intéressante de l'espèce est celle du cluster génotypique de Mallet (Mallet, 1995). Ce concept définit l'espèce comme tout groupe génotypique reconnaissable (=cluster), avec très peu ou pas d'intermédiaires lorsque deux groupes sont en contact (zone hybride très limitée). Cette définition permet d'éviter de déterminer comment la spéciation est apparue entre les clusters et utilise des données que l'on peut facilement obtenir pour identifier les groupes d'individus pouvant se reproduire entre eux à un niveau maintenant la cohésion des génotypes tout en permettant des phénomènes d'introgession*. Elle est notamment relativement efficace chez les coraux (Ladner et Palumbi, 2012), chez qui on retrouve de nombreux cas d'espèces cryptiques (chapitre 3.1.1).

La conséquence directe du nombre important de définitions de l'espèce va impliquer qu'un groupe d'individus, en fonction de la définition utilisée, pourra être considéré comme une population, une espèce ou même un complexe d'espèces, ce qui peut être problématique dans le cadre de l'étude de l'adaptation locale. Dans un but d'unification des différents concepts, De Queiroz, (2007) a avancé le concept d'espèce unifié (USC), définissant une espèce comme une lignée métapopulationnelle évoluant indépendamment et reconnue comme telle par au moins un critère opérationnel, ces critères pouvant être de différentes natures : dépression de consanguinité, discontinuité démographique, morphologique, physiologique, moléculaire, écologique,... En d'autres termes, le concept unifié d'espèce va considérer un ensemble plus large de critères biologiques que les autres concepts d'espèces, ce qui me semble en faire, à l'heure actuelle, le concept d'espèce le plus satisfaisant.

3.1.1 Espèces cryptiques

Historiquement, les espèces étaient définies selon des critères morphologiques. Toutefois, cela ne fonctionne pas dans le cas des espèces cryptiques. Celles-ci sont relativement fréquentes dans le règne vivant (Pfenninger et Schwenk, 2007). Des espèces seront décrites comme cryptiques lorsque les caractères morphologiques ne sont pas suffisants pour les différencier, alors que des différences génétiques existent entre elles (Bickford et al., 2007). De ce fait, une adaptation potentielle à une variable environnementale pourrait en fait provenir d'une divergence génétique inter-espèce non encore reconnue. Par conséquent, des espèces cryptiques, génétiquement différenciées même si morphologiquement identiques, peuvent répondre différemment à un stress environnemental. Se limiter à des critères morphologiques pour décrire une espèce n'est donc pas suffisant. Le cas décrit chez les Copépodes du genre *Cletocamptus* illustre bien cette problématique. Une étude

phylogénétique a mis en évidence un complexe de quatre espèces cryptiques en Amérique du Nord au sein de l'espèce *Cletocampus deitersi* (Richards, 1897) (Gómez et al., 2004; Rocha-Olivares et al., 2001). Parmi ce complexe d'espèces cryptiques, deux d'entre elles, *C. fourchensis* et *C. stimpsoni*, indissociables morphologiquement, ont été exposées à des métaux lourds. Les deux espèces ont montré une tolérance différente aux contaminants (Rocha-Olivares et al., 2004). Ces deux espèces, ont donc une réponse différente face à une variable environnementale. De même, la définition de l'espèce *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767) a été récemment bousculée. Cette ascidie, couramment utilisé en biologie développementale et l'un des premiers animaux à voir son génome entièrement séquencé (Dehal, 2002), semble en fait être composée de 4 espèces cryptiques (Caputi et al., 2007; Nydam et Harrison, 2007; Suzuki et al., 2005; Zhan et al., 2010) dont deux de ces espèces ont divergé depuis 3 à 4 millions d'années (Roux et al., 2013).

Chez les Cnidaires, les complexes d'espèces cryptiques sont fréquents, le cas d'*Acropora* décrit plus haut en est un exemple (Richards et al., 2016). Ces espèces cryptiques peuvent aussi varier entre elles sur le mode de reproduction (Baums et al., 2006) et exhiber différentes interactions écologiques, comme lors de la réponse au stress (Boulay et al., 2014). Ne pas reconnaître des espèces cryptiques pourrait amener à une sous-estimation de la diversité génétique, une surestimation des intervalles écologiques et physiologiques des espèces (par exemple une espèce généraliste à la place de plusieurs spécialistes) et ainsi mener à une estimation erronée du potentiel d'acclimatation et d'adaptation (Prada et al., 2014).

3.1.2 Variation morphologique sans spéciation

Inversement, des espèces distinctes morphologiquement peuvent n'être en réalité qu'une seule espèce à plasticité phénotypique forte, causant cette variation morphologique. Cette plasticité phénotypique a été à l'origine de nombreuses confusions taxonomiques (Fukami et al., 2004; Schwaninger, 1999). C'est notamment le cas chez les coraux, dont différentes espèces décrites sur la base de la morphologie générale de l'architecture squelettique des colonies (Todd, 2008), se sont révélées être des espèces capables de se croiser et donc interfécondes, comme c'est le cas par exemple au sein du genre *Stylophora* (Flot et al., 2011; Stefani et al., 2011). Par conséquent, comprendre le rôle et l'étendue de la variabilité morphologique est crucial pour identifier une espèce, estimer correctement sa diversité génétique et donc déterminer son potentiel évolutif (Paz-García et al., 2015a, 2015b).

Toutefois, la plasticité phénotypique induite par l'environnement, la variabilité intraspécifique causée par différents génotypes et le brassage génétique causé par d'éventuelles introgressions entre espèces, provoquent un chevauchement de la variabilité morphologique intra et interspécifique (Combosch et Vollmer, 2015; Richards et Hobbs, 2015; Todd, 2008) montrant clairement la nécessité d'utiliser de nouvelles méthodes pour surmonter les limitations dues à la morphologie (Arrigoni et al., 2016; Pante et al., 2015).

3.1.3 Délimitation d'espèces

Une morphologie uniforme peut cacher de la diversité cryptique et une plasticité phénotypique peut créer différents morphotypes au sein d'une seule et même espèce. Tout ceci peut rendre difficile la délimitation d'une espèce qui elle-même est un préalable indispensable à l'étude du potentiel évolutif des organismes. Quelle est la meilleure manière de délimiter une espèce ?

L'idée générale derrière la définition de l'USC (De Queiroz, 2007) va être de multiplier les critères diagnostiques afin d'appuyer une hypothèse de délimitation d'espèces. Délimiter une espèce revient alors à rechercher de tels critères qui vont regrouper les individus étudiés sous différentes entités. La zone grise, décrite par De Queiroz (2007) définit une zone de conflit dans laquelle les espèces ne sont pas entièrement séparées, correspondant à la zone de spéciation, jusqu'à ce qu'il y ait un isolement reproducteur total entre les deux espèces naissantes. Dans cette zone grise, le nombre de critères permettant de mettre en évidence la divergence croissante entre populations et la séparation en deux lignées va augmenter, d'où l'intérêt de multiplier ces critères dans le but de trouver lequel ou lesquels sera/seront diagnostique(s) pour déterminer l'état de spéciation entre ces lignées.

La difficulté de l'application de l'USC et de la délimitation d'espèce réside dans le problème du choix de critères fiables pour distinguer les lignées (Gélin et al., 2017). Notamment pour contrer cette difficulté, Pante et al. (2015) proposent d'associer la taxonomie intégrative au concept de zone grise. La taxonomie intégrative est définie comme une approche de recherche taxonomique qui vise à incorporer différents types de données et méthodes utilisées classiquement en systématique dans le but de documenter la biodiversité et les processus évolutifs promouvant la divergence (Fujita et al., 2012). La figure 3.1 montre l'utilisation de la taxonomie intégrative pour la délimitation d'espèces. La première étape est de définir une hypothèse d'espèces primaire (« PHE ») qui sera testée par différents critères (la morphologie et/ou des marqueurs moléculaires) pour arriver à une première délimitation d'espèces. Ensuite, cette hypothèse sera confrontée à d'autres types de critères d'ordres

phénétiques, phylogénétiques et biologiques (Samadi et Barberousse, 2015), ce qui amènera une nouvelle délimitation d'espèces (affirmant ou réfutant la PHE) et au concept d'hypothèse d'espèces secondaire (« SHE »).

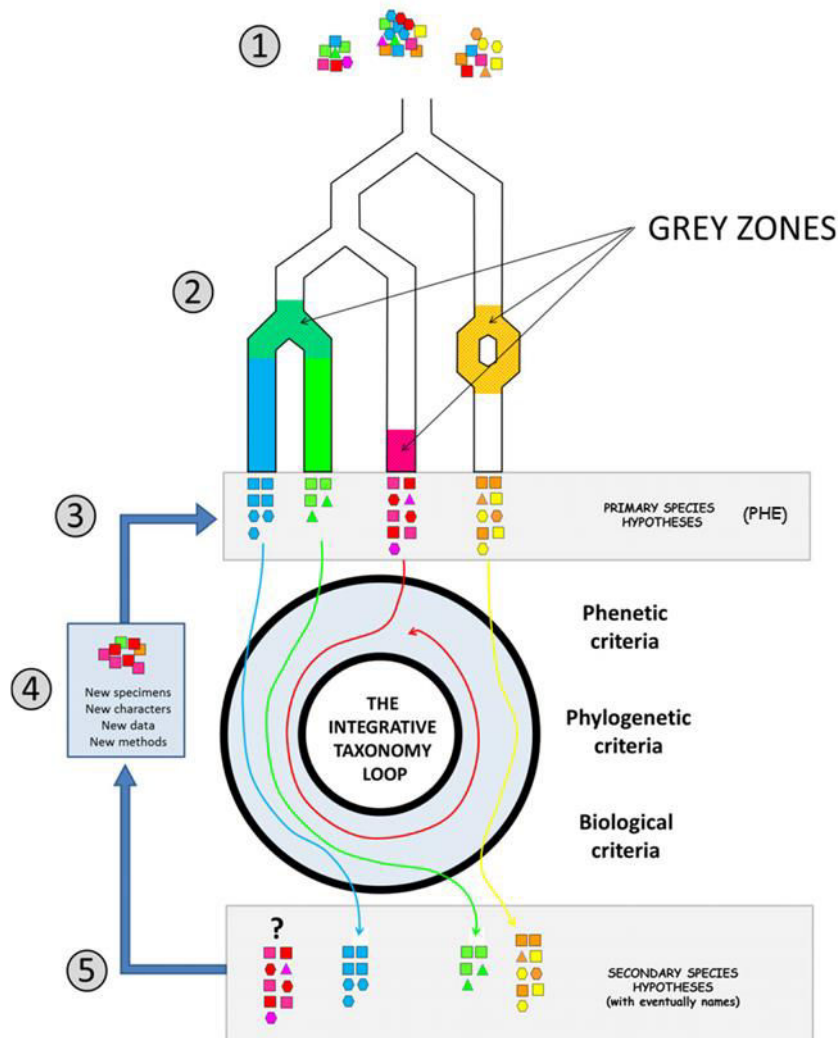


Figure 3.1 : Concept de zone grise de De Queiroz (2007) dans lequel la boucle de taxonomie intégrative a été implémentée par Pante et al. (2015) dans le but de délimiter différentes espèces pouvant être en cours de spéciation. 1) Echantillonnage. 2) Niveau de spéciation: certaines espèces sont peut-être fortement différenciées (bleu et vert), peuvent avoir divergé récemment et par conséquent être encore dans la « zone grise » (rouge et rose), ou encore il ne peut y avoir qu'une seule espèce étant passée par des séparations en différentes lignées par le passé (jaune/orange). 3) Proposition d'une hypothèse d'espèce primaire (PHE). 4) Test de la PHE par la taxonomie intégrative. 5) Sortie de la boucle de taxonomie intégrative avec l'hypothèse d'espèce secondaire (SHE). Si certaines lignées ne sont pas encore clairement définies, un second tour dans la boucle de taxonomie intégrative peut être engagé (avec éventuellement l'addition de nouveaux individus, de nouvelles analyses de caractères et/ou de nouvelles méthodes) (d'après Pante et al., 2015).

Cette méthode, encore récente, a déjà été utilisée sur le genre *Pocillopora*. Ce groupe d'espèces pose de nombreux problèmes taxonomiques dus à la superposition de la variation morphologique, de la diversité intra et interspécifique, de la discordance entre l'ADN

mitochondrial et nucléaire, ainsi qu'aux introgressions entre espèces (Flot et al., 2006; Marti-Puig et al., 2014; Pinzón et al., 2013; Schmidt-Roach et al., 2013a, 2013b, 2014; Veron, 2000; Veron et Pichon, 1976). L'étude de Gélin et al. (2017) a permis de définir 18 SHE et morphotypes, prouvant la grande plasticité morphologique du genre et la présence de lignées cryptiques dans le genre *Pocillopora*.

3.1.4 Mécanismes de spéciation

La spéciation est définie comme l'apparition et l'accumulation de barrières à la reproduction entre populations permettant le maintien de la divergence génétique et phénotypique (Seehausen et al., 2014). L'évolution de l'isolement reproducteur*, causé par les barrières à la reproduction au sein d'une espèce ancestrale, résultera en l'apparition de deux ou plusieurs espèces descendantes (Rabosky, 2015). En d'autres termes, la spéciation peut être vue comme un processus par lequel une barrière au flux de gènes se met en place entre deux populations et amène à un isolement reproducteur de l'une des populations par rapport à l'autre (Halliburton, 2004). Les barrières au flux de gènes peuvent être initiées de deux manières distinctes, correspondant aux deux types de spéciation. Dans le cas où les barrières sont initiées par la dérive génétique dû à un isolement géographique, on parle de spéciation allopatrique*. Lorsque les barrières à la reproduction sont formées grâce à la sélection divergente*, on parle de spéciation sympatrique* ou écologique.

Dans le cas de la spéciation allopatrique, le flux de gènes entre les deux espèces naissantes est réduit ou même supprimé par un isolement géographique. Lorsque les populations se retrouvent à nouveau en contact (= contact secondaire), un isolement reproducteur est né parfois de l'évolution indépendante des populations, les empêchant de se reproduire entre elles. Ainsi, lors d'une spéciation allopatrique, les populations évoluent dans un équilibre mutation-dérive, dans lequel des mutations apparaissent et sont fixées ou supprimées par dérive génétique. La sélection n'est donc pas la force majeure amenant à la divergence des populations même si quelques mutations peuvent avoir un effet avantageux sur cette population et seront fixées elles aussi, accentuant cette divergence (Schluter, 2009).

Dans le cas de la spéciation sympatrique, les deux espèces naissantes ont une aire de répartition qui se chevauche, aucune barrière géographique n'empêche le flux de gènes. Toutefois, un gradient de sélection sur un paramètre environnemental réduit le flux de gènes entre les deux populations et finit aussi par créer un isolement reproducteur. Contrairement à la spéciation allopatrique, les deux populations étant toujours en contact, c'est l'effet de la

sélection divergente qui va amener à la divergence des populations (Schluter, 2009). La spéciation sympatrique est aussi, en ce cas, appelée spéciation écologique.

a. Mise en place de la spéciation écologique

Le processus de spéciation écologique qui s'opère entre deux populations peut être divisé en trois composantes : une source écologique de sélection divergente, un isolement reproducteur et un lien génétique liant la source écologique et l'isolement reproducteur (Rundle et Nosil, 2005).

1°) Source écologique de sélection divergente. La première composante nécessaire pour qu'il y ait spéciation écologique est une source de sélection divergente. Il peut par exemple y avoir une différence environnementale comme la structure de l'habitat, les ressources, la prédation, tout cela englobé dans le concept de niche écologique (Schluter, 2000). On peut aussi trouver une origine de sélection divergente dans l'interaction qu'il peut y avoir entre différentes populations, comme par exemple, la compétition interspécifique pour une même niche écologique. L'ensemble de ces sources de divergence va créer un gradient qui sera nécessaire pour induire la divergence entre les deux populations.

2°) Isolement reproducteur. Après l'apparition d'une source de divergence, il faut qu'un isolement reproducteur apparaisse. Ceci va limiter le flux de gènes encore présent entre les deux populations. Il existe de nombreuses formes d'isolement reproducteur. Ceux-ci sont classés en différentes sous-catégories en fonction de l'étape dans la reproduction sur laquelle elles agissent : on distingue isolement pré-zygotique* et post-zygotique*. L'isolement pré-zygotique concerne toutes les barrières à la reproduction qui vont se passer avant la fécondation telles qu'une différence au niveau de la période de maturité des gonades, des stratégies différentes de détection du partenaire sexuel ou encore un isolement écologique. Les barrières post-zygotiques vont affecter le développement embryonnaire (via des processus de méiose perturbée) ou la fitness de la descendance (diminution de la fertilité ou de la viabilité des hybrides qui se seront formés entre les deux populations).

3°) Liaison entre la source écologique et l'isolement reproducteur. Le dernier composant pour qu'il y ait spéciation écologique est un mécanisme génétique par

lequel le trait sélectionné devient lié aux gènes causant l'isolement reproducteur. Deux cas de figure peuvent se présenter. Soit, les gènes intervenant dans le trait sélectionné sont identiques aux gènes intervenant dans l'isolement reproducteur. Soit, ces gènes causant la divergence sont différents de ceux provoquant l'isolement reproducteur. Dans ce cas, l'isolement reproducteur évolue par sélection indirecte provenant de l'association non aléatoire des gènes codant pour l'isolement et les gènes codant pour le trait sélectionné (traduisant donc un déséquilibre d'association).

b. La spéciation écologique existe-t-elle ?

Il y a aujourd'hui un débat concernant l'existence de la spéciation écologique. En effet, la spéciation sympatrique, définie comme ci-dessus semble être une hypothèse simplifiant un peu trop ce qui se passerait dans la réalité. Le point central de ce débat tourne autour du flux de gènes entre les deux populations en sympatrie. Une population adaptée localement reçoit en continu de nouveaux migrants, maintenant un flux de gènes constant empêchant le génotype adaptatif de se fixer dans la population. Pour que celui-ci puisse se fixer, il faudrait que la sélection positive sur ce génotype soit extrêmement forte pour contrer l'effet du flux de gènes, ce qui semble peu probable.

Ceci amène à une reconsidération de la définition de la spéciation écologique. A la base, il existerait déjà un isolement reproducteur de type post-zygotique (Barton et de Cara, 2009) sur lequel se superpose un gradient environnemental qui induit une adaptation locale, résultant en un couplage entre l'incompatibilité génétique intrinsèque et l'adaptation locale (Bierne et al., 2011). Ce gradient environnemental favorise la fixation de génotypes adaptés ce qui renforce l'isolement reproducteur par la mise en place d'incompatibilités pré-zygotiques (Abbott et al., 2013; Bierne et al., 2013b).

3.2 Le cas d'*Anemonia viridis*

Les Cnidaires semblent avoir une hétérogénéité de réponse aux stress entre espèces, populations et individus, faisant de ceux-ci de bons candidats pour l'étude de la plasticité phénotypique (Obura, 2005), de l'adaptation de par leur mode de vie sessile et leur longévité (Huey et al., 2002), mais aussi de la spéciation et de la délimitation d'espèces de par la présence de nombreux complexes d'espèces cryptiques (Ladner et Palumbi, 2012).

Au sein de la Classe des Anthozoaires (Chapitre 1.4.2.), l'anémone de mer *Anemonia viridis* fait partie de l'Ordre des Actiniaires. Les Actiniaires sont toujours solitaires et fixés au

substrat par un disque adhésif. De plus, de nombreuses espèces possèdent des prolongements filamenteux mésentériques sur le bord des mésentères (= aconties), garnis de très nombreux cnidocytes gastrodermiques et cellules glandulaires, ayant un rôle digestif et défensif. Enfin, de nombreuses espèces présentent des acrorhages, tubercules situés sur le pourtour du pied et accumulant de nombreux cnidocytes. Ils servent à la défense face à des individus de la même espèce ou d'une espèce différente qui envahirait l'espace de l'anémone.

3.2.1 Classification des Actiniaires

La classification récente des Actiniaires a été premièrement posée sur base de données morphologiques comme la forme des cnidocytes (Acuña et al., 2003; Östman, 2000), la présence d'aconties, d'acrorhages, et d'autres caractères morphologiques dont les muscles (Dawson, 2003). Toutefois, il semblerait qu'il y ait eu des épisodes indépendants de perte/acquisition de traits identiques (Rodríguez et al., 2014). Pour ce qui est des classifications moléculaires, une tentative de classification de 9 espèces d'Actiniaires a été réalisée à l'aide d'allozymes (Solé-Cava et al., 1994) suivie par des études phylogénétiques basées sur l'ADN nucléaire et mitochondrial (Rodríguez et al., 2012, 2014). La comparaison entre les données phylogénétiques a permis de détecter de nombreux phénomènes d'homoplasie. Il en résulte que de nombreux groupes monophylétiques ne correspondent pas aux groupes taxonomiques précédemment définis (Daly et al., 2008, 2017; Rodríguez et Daly, 2010; Rodríguez et al., 2014; Schmidt, 1972). La classification des Actiniaires est compliquée par la difficulté de trouver un marqueur permettant d'identifier clairement les familles d'anémones au sein des Actiniaires. Par exemple, les marqueurs classiquement utilisés pour la taxonomie du règne animal comme certaines parties de l'ADN mitochondrial sont inefficaces chez les Anthozoaires (Shearer et al., 2002) sauf dans quelques rares cas chez les coraux (Flot et al., 2008; Stefani et al., 2011; Terraneo et al., 2014). La classification des Actiniaires reste, par conséquent, encore peu stable.

3.2.2 Les morphes d'*Anemonia viridis*

Anemonia viridis (Forskål, 1775), communément appelée anémone de mer verte, actinie verte ou encore ortie de mer est présente des côtes méditerranéennes à la Grande-Bretagne. C'est un omnivore opportuniste se nourrissant de particules en suspension. Son alimentation est essentiellement composée de plancton, de petits Crustacés (amphipodes essentiellement) et parfois de mollusques. Un changement de régime alimentaire en fonction de la saison a été observé, reflétant la faune macrobenthique du moment (Chintiroglou et Koukouras, 1992a). Elle joue aussi un rôle majeur de l'écosystème local en protégeant de nombreux

animaux tels que des crabes, des gobies ou des juvéniles de poissons (Chintiroglou et Koukouras, 1992b).

L'anémone adulte peut se déplacer en glissant sur le substrat ou en s'en détachant, notamment lors de périodes de jeûne mais aussi dans le cas de compétition avec d'autres congénères pour l'habitat disponible (Williams, 1992). Elle se reproduit de deux manières différentes. La première est par reproduction sexuée par la libération des gamètes mâles et femelles dans le milieu, ce qui fait de celle-ci un organisme dioïque (Schmidt, 1972). Elle est aussi capable de se reproduire asexuellement par fission longitudinale, et former de larges populations clonales.

A. viridis est un Cnidaire symbiotique vivant en association avec des Dinoflagellés du genre *Symbiodinium*. En Méditerranée, contrairement aux mers tropicales, on ne distingue qu'une seule lignée ribosomale de *Symbiodinium*, le sous-clade A tempéré, présentant toutefois de la diversité génétique (Casado-Amezúa et al., 2014; Forcioli et al., 2011; Visram et al., 2006). La population de symbiotes au sein d'*A. viridis* semble être une portion spécifique de ce sous-clade (Casado-Amezúa et al., 2014; Forcioli et al., 2011). Contrairement à la majorité des Cnidaires symbiotiques tempérés, le taux d'autotrophie est très important chez cette anémone, dont le symbiote amène jusqu'à 96% de l'apport en carbone à l'hôte (Davy et al., 1996), valeurs équivalentes aux coraux tropicaux constructeurs de récifs.

L'histoire de la taxonomie d'*A. viridis* a été fortement mouvementée depuis sa première description au XVI^{ème} siècle. Différents noms lui ont été attribués, des morphes ont été décrits, parfois séparés en espèces distinctes et différents écotypes sont même encore aujourd'hui utilisés pour décrire cette anémone. Cette anémone est aussi connue sous le nom *Anemonia sulcata* (Pennant, 1777). En suivant Gosse (1860) et Andres (1881, 1883), 5 morphes différents ont été définis dont la description aujourd'hui repose essentiellement sur 2 critères (figure 3.2): la couleur des tentacules, et le profil d'expression de protéines fluorescentes (PF) similaires à celles découvertes chez la méduse *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962). Trois des morphes présentent un profil de fluorescence vert sur l'ensemble de l'organisme: var. *smaragdina*, var. *viridis* et var. *rufescens*, ce dernier ayant aussi une fluorescence orange/rouge sur la partie inférieure de chaque tentacule. Les tentacules de ces 3 morphes varient autour du vert. Les deux derniers morphes var. *rustica* et var. *vulgaris* n'ont pas de profil de fluorescence détectables (mise à part la fluorescence naturelle des symbiotes) et présentent des tentacules plutôt brunâtres. Enfin, var. *smaragdina*, var. *rufescens* et var. *vulgaris* expriment un pigment de couleur rose sur la

pointe de chaque tentacule (Lukyanov et al., 2000; Wiedenmann et al., 1999, 2000a). Gosse (1860) décrit un morphe supplémentaire, *A. viridis* var. *alabastrina* (avec pointes roses) et Andres (1883) ajouta le morphe var. *albida* (sans pointes roses) tous deux présentant des tentacules blancs. Plus récemment, il s'est avéré que ces deux morphes étaient simplement des individus blanchis de var. *vulgaris* pour *alabastrina* et var. *rustica* pour *albida* (Wiedenmann et al., 2000b).

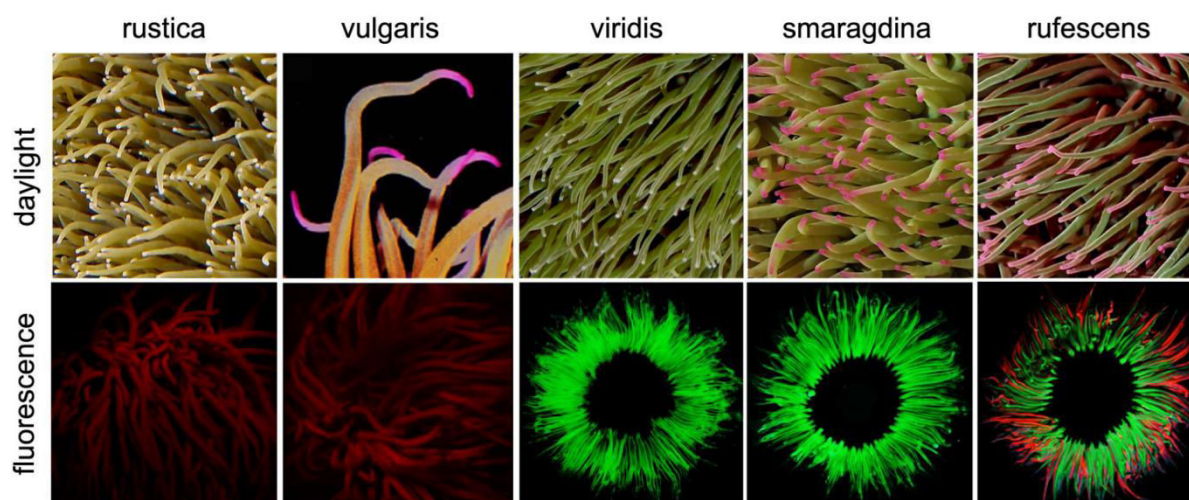


Figure 3.2 : Identification des différents morphes d'*Anemonia viridis* par la couleur des tentacules et par leur profil fluorescent. *Rustica*: brun, pas de fluorescence. *Vulgaris*: brun à pointes roses, pas de fluorescence. *Viridi* : vert, fluorescence verte. *Smaragdina*: vert à pointes roses, fluorescence verte. *Rufescens*: vert à pointes rouges et ligne rouge dessous le tentacule, fluorescence verte avec le dessous orange vif. (Wiedenmann et al., 1999).

En 1972, Schmidt a également proposé, au sein de l'espèce *A. viridis*, une nouvelle distinction morphologique des individus indépendante de la coloration des morphes. Il a ainsi décrit l'existence de deux écotypes. L'écotype 1 est caractérisé par des anémones ayant une petite taille et un disque basal d'un diamètre pouvant aller jusqu'à 3cm, ayant jusqu'à 192 tentacules et vivant sous la forme de prairies plus ou moins denses, associant cet écotype à un mode de reproduction clonal. *A. viridis* var. *rustica*, *smaragdina* et *vulgaris* sont de cet écotype. L'écotype 2 est caractérisé par des anémones ayant un disque basal pouvant aller jusqu'à 15cm, un nombre de tentacules atteignant 384 et vivant plutôt sous forme solitaire, associant cet écotype à un mode de reproduction sexué. Parmi l'écotype 2, on peut retrouver *A. viridis* var. *smaragdina*, *viridis* et *rufescens*.

En 1984, Bulnheim et Sauer ont décrit *A. viridis* var. *rustica* et var. *vulgaris* comme des espèces différentes par la comparaison d'iso-enzymes. Cette hypothèse d'espèce était également soutenue par l'observation de la compétition pour l'espace qu'il y a entre var. *rustica* et *smaragdina* (Sauer et al., 1986) et du comportement même des deux morphes ci-

dessus Williams (1992), avec var. *smaragdina* qui utilisera ses accrorhages lors de l'agression d'une anémone par une autre anémone et var. *rustica* préférant se détacher de son substrat. Ces différentes formes de réactivité face à un agresseur sont probablement aussi liées à la reconnaissance du soi, var. *rustica* écotype I étant clonale et var. *smaragdina* écotype II étant plutôt sexuée, résultant en une agressivité plus forte chez var. *smaragdina* (Sauer et al., 1986). De plus, Sauer et al. (1986) ont montré une distribution bathymétrique différente entre les deux morphes, var. *rustica* étant plutôt située en surface tandis que var. *smaragdina* investit les zones plus profondes. Cette hypothèse a néanmoins été désapprouvée plus tard par Chintiroglou et Karalis (2000) sur des bases morphologiques.

Tous ces éléments mènent cependant à penser qu'il peut y avoir une différenciation fonctionnelle entre les morphes même si celle-ci n'est pas stricte. Dans tous les cas, l'étude de la définition taxonomique des morphes se révèle être un préalable nécessaire avant d'étudier le potentiel d'adaptation d'*Anemonia viridis*.

3.3 Analyse du statut taxonomique des morphes d'*A. viridis*

L'objectif était de déterminer le statut taxonomique des trois morphes les plus communs d'*Anemonia viridis* : var. *rufescens*, var. *rustica* et var. *smaragdina*.

Le premier article de ce chapitre explore le statut taxonomique des morphes d'*A. viridis* par l'utilisation de marqueurs moléculaires basés sur des gènes de stress (les marqueurs EPIC), et donc pouvant avoir un rôle dans l'adaptation locale.

Le second article vise à préciser la diversité génétique au sein d'*Anemonia viridis* et de son symbiote et de déterminer s'il y a une corrélation pouvant montrer un phénomène de co-spéciation entre les deux partenaires par le séquençage en NGS de marqueurs RADseq et ITS2.

Enfin, je discuterai l'ensemble des résultats obtenus dans ces deux publications et je me concentrerai sur quelques hypothèses quant à l'origine des morphes.

3.3.1 Article 1

Conspicuous morphological differentiation without speciation

in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria)

Article sous presse dans Systematics and Biodiversity

Cédric Mallien¹, Barbara Porro¹, Thamilla Zamoum¹, Caroline Olivier¹, Jörg Wiedenmann^{2,3}, Paola Furla^{1§}, Didier Forcioli^{1§*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Univ Antilles, Univ Nice Sophia Antipolis, CNRS, Evolution Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (EPS - IBPS), 75005 Paris, France

² Coral Reef Laboratory, Ocean and Earth Science, University of Southampton, Southampton SO14 3ZH, United Kingdom;

³ Institute for Life Sciences, University of Southampton, Southampton SO17 1BJ, United Kingdom;

* Corresponding author:

Didier Forcioli

Email: forcioli@unice.fr

UMR 7138 EPS, Marine Symbiosis Team, Faculté des Sciences, Univ Nice Sophia Antipolis, 06108 Nice cedex 02.

[§]These authors share the seniorship position

Anemonia viridis is a model species for studies of physiological and transcriptomic response to symbiosis and environmental stress (temperature, light, symbiosis breakdown). Five morphs are described in this species, based on morphology, pigment protein content and major mode of reproduction. Up to now, the taxonomic status of these morphs remains unclear, without clear knowledge of whether the morphological variation among the morphs is due to phenotypic plasticity or adaptation. In the present study, we assess the species status of the three most commonly found morphs by coalescent analyses. For this purpose, five markers were designed for genes whose expression is modified under stress (*ca2m*, *duf140*, *RNAbinding5*, *tyrK*, *sym32*) and analysed in 34 individuals representing the morphs *A. viridis* var. *rufescens*, *rustica* and *smaragdina* from eight geographic sites (two in the English Channel and six in the Mediterranean Sea). Phylogenetic analyses of individual gene trees showed no clear separation of the morphs. Furthermore, multilocus coalescent analyses using SpedeSTEM and BPP regrouped all the morphs into one species, showing very few genetic differences amongst them. In a further analysis, we checked for clonality amongst 80 individuals of *A. viridis* var. *smaragdina* from one geographic site using three microsatellite loci. This morph proved to be as clonal as var. *rustica*, indicating a similar potential for asexual reproduction.

Keywords: Adaptation, *Anemonia viridis*, Clonality, Cnidaria, Coalescence, EPIC, Fluorescent protein, Microsatellites, Phenotypic plasticity, Phylogenetics.

Introduction

The symbiotic sea anemone *Anemonia viridis* (Forskål, 1775) (but see below for the discussion on the authority and description, unsettled in the literature for this species) is an important model to study adaptation in cnidarians due notably to its wide distribution range from the North Sea (mid-Scotland as a northern limit) to the Mediterranean basin (Wiedenmann et al., 2007). Moreover, its presence from tidal pools down to 25m depth (Manuel, 1988; Schmidt, 1972) demonstrates its amazing capacity to adapt to a wide range of physical conditions, typical of temperate regions (Bensoussan, Romano, Harmelin, & Garrabou, 2010). Consequently, *A. viridis* is a well established model for physiological studies in cnidarians (Choresh, Ron, & Loya, 2001; Dani et al., 2016; Ganot et al., 2011; Moya, Ganot, Furla, & Sabourault, 2012; Revel et al., 2016; Richier, Furla, Plantivaux, Merle, & Allemand, 2005).

However, *A. viridis* presents different phenotypic variations based on colour features alone (Andres, 1881; Schmidt, 1972). Indeed, the current taxonomy of the genus *Anemonia* itself is still not settled, and has been shown to be paraphyletic (Daly et al., 2017). Some authors refer to the species as *A. viridis* (Forskål, 1775), others as *A. sulcata* (Pennant, 1777), and one of the colour morphs described by Andres (1881) within *A. sulcata* has been raised to the species level as *A. rustica* (Bulnheim & Sauer, 1984), although no clear morphological differences among the colour morphs had been found (Chintiroglou & Karalis, 2000). As we aim to settle the question of the taxonomic status of the colour morphs in this species, we choose, to denominate them as varieties within the species *A. viridis* (Forskål, 1775), given the priority arising from the earlier description date. Five different morphs (var. *rufescens*, *rustica*, *smaragdina*, *viridis* and *vulgaris*) have been differentiated among a larger number of colour variants initially described by Andres (1881, 1883) and Gosse (1860) based on the type of green fluorescent, red fluorescent and pink non-fluorescent host pigments that define the tentacle coloration (Wiedenmann, Rocker, & Funke, 1999) (Fig. 1). These host pigments are homologous to the green fluorescent protein (GFP) from the bioluminescent jellyfish *Aequorea victoria* (Prasher, Eckenrode, Ward, Prendergast, & Cormier, 1992; Shimomura, Johnson, & Saiga, 1962) that can be either brightly green or red fluorescent proteins (FPs) or non-fluorescent chromoproteins (CPs) (Leutenegger et al., 2007; Lukyanov et al., 2000; Wiedenmann, Elke, Spindler, & Funke, 2000; Wiedenmann et al., 1999). *A. viridis* var. *smaragdina*, *rufescens* and *vulgaris* display

tentacles with pink tips, due to the expression of the CP (Lukyanov et al., 2000; Wiedenmann et al., 1999). Moreover, *A. viridis* var. *smaragdina*, *rufescens* and *viridis* contain high concentrations of green FPs in their tentacles and var. *rufescens* also display an additional orange/red FP on the underside of its tentacles (Wiedenmann, Elke, et al., 2000; Wiedenmann et al., 1999). The tentacles of var. *rustica* and *vulgaris* do not contain GFP-like proteins in amounts that can be detected by spectroscopic techniques (Wiedenmann, Elke, et al., 2000; Wiedenmann et al., 1999). However low-level expression of green fluorescent protein gene as FP499 and non-fluorescent red gene as CP562 has been found in var. *rustica* (Leutenegger et al., 2007). Two other morphs, var. *alabastrina* (Gosse, 1860) and *albida* (Andres, 1883) had been described, displaying white tentacles, respectively with and without pink tips (Wiedenmann, Kraus, Funke, & Vogel, 2000). They have however already been shown to be aposymbiotic clones of var. *vulgaris* (*alabastrina*) and var. *rustica* (*albida*) (Wiedenmann, Elke, et al., 2000).

The GFP-like proteins in the colour morphs of *A. viridis* are highly expressed in the ectodermal tissue of the tentacles and undetectable in the gastrodermal tissue containing the algal symbiont (Ganot et al., 2011; Leutenegger et al., 2007; Wiedenmann et al., 1999). In addition to these anatomical features, the morphs were found to differ also on their reproduction modes. In the Mediterranean Sea, *A. viridis* var. *rustica*, var. *vulgaris* were described as predominantly clonal while var. *viridis* and var. *rufescens* were found to reproduce exclusively in sexual mode (Bulnheim & Sauer, 1984; Sauer, 1986; Sauer, Müller, & Weber, 1986; Wiedenmann, Kraus, et al., 2000; Wiedenmann et al., 1999). Representatives of var. *smaragdina* can be found as a smaller, clonal form (ecotype I *sensu* Schmidt 1972) and larger, sexually reproducing form (ecotype II *sensu* Schmidt 1972) (Wiedenmann, Kraus, et al., 2000; Wiedenmann et al., 1999). Therefore, the basic question arises whether the colour morph variation in *A. viridis* is diagnostic of different evolutionary lineages.

Indeed, phenotypic plasticity can be very high in cnidarians, and is mostly due to light intensity and water movement directly influencing nutrients import, removal of sediment, temperature and salinity (Todd, 2008). Among the conspicuous phenotypic variations in cnidarians, differences in colouration of individuals/colonies within one species are frequent and can be caused by different ratio content of fluorescent and non-fluorescent proteins (Field, Bulina, Kelmanson, Bielawski, & Matz, 2006; Gittins,

D'Angelo, Oswald, Edwards, & Wiedenmann, 2015; Kelmanson & Matz, 2003). In numerous shallow water corals, the expression of GFP-like proteins is regulated by the amount of incident blue light, which can lead to striking differences in the colouration of the individuals exposed to different light environments (D'Angelo et al., 2008). In addition, the copy number of functionally expressed GFP-like protein genes is critical in determining the colouration of different morphs (Gittins et al., 2015).

A photoprotective function has been suggested for the GFP-like protein in *A. viridis* based on the greater abundance of the strongly pigmented morphs *smaragdina*, *viridis* and *rufescens* in most shallow water (Wiedenmann et al., 1999). The long-term competitive advantage of a clone of pigmented var. *smaragdina* over a clone of unpigmented var. *rustica* in a shallow water habitat supports this notion (Wiedenmann et al., 2007). A study based on allozyme diversity at three loci in a single population of *A. viridis* in Banyuls sur mer, France concluded that var. *rustica* and *vulgaris* represent different species (Bulnheim & Sauer, 1984). The species status seems to be supported by the finding that the two variants occupy niches in different water depths from which they exclude each other by aggressive behaviour (Sauer, 1986; Sauer et al., 1986). However, the different morphs of *A. viridis*, despite being adapted to different habitats, could also represent a case of pronounced intraspecific variability as suggested for the “ecotypes” that were defined based on the size and dominant mode of reproduction (Schmidt, 1972).

Molecular markers for species delimitation are still lacking in Actiniaria, and more precisely in *Anemonia*, and the well-known lack of resolution of canonical barcoding makers in cnidarians (Shearer & Coffroth, 2008; Shearer, Van Oppen, Romano, & Wörheide, 2002, but see Keshavmurthy et al. 2013) is all the more pregnant in sea anemones (Daly, Gusmao, Reft, & Rodriguez, 2010, Dohna & Kochzius 2015, Daly et al. 2017, see however Canales-Aguirre, Quiñones, Hernández, Neill, & Brante. 2015). Therefore, we assessed the taxonomic status of the three frequent morphs of *A. viridis*, var. *smaragdina*, *rustica* and *rufescens*, by measuring their genetic differentiation by analysing nucleotide sequences of stress response genes. Previous studies of *A. viridis* have revealed a set of genes, called “Kern” genes, the expression of which was modified under symbiont presence/absence and/or stress conditions (Ganot et al., 2011; Moya et al., 2012). Based on the assumption that environmentally regulated genes could be more efficient markers for the delimitation of divergent stocks (Bensch, Åkesson, & Irwin,

2002; Garvin, Saitoh, & Gharrett, 2010), we developed Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) markers (Palumbi & Baker, 1994) on Kern genes to resolve the taxonomical status of the morphs var. *smaragdina*, *rustica* and *rufescens* by a coalescent analysis. In addition, to assess the amount of fixed differences between the major colour morphs, we further explored the extent of clonality within *A. viridis* var. *smaragdina* and var. *rustica* at the local scale, within a Mediterranean population, using microsatellite markers.

Materials and methods

Genetic differentiation of the morphs

Sampling

A total of 34 *Anemonia viridis* individuals representing three major morphs (var. *smaragdina*, *rustica* and *rufescens*) were sampled between 2010 and 2014 at six sites in the Mediterranean Sea and two sites in the English Channel (as detailed in Table 1). Four individuals (three from the Mediterranean Sea and one from the Atlantic coast) from the sea anemone *Paranemonia cinerea* (Contarini, 1844) were also sampled to provide an outgroup for the subsequent analyses (Table 1). To identify the morphotypes, we detected their respective diagnostic fluorescence patterns using a fluorescence torch (Tekna T6, FireDiveGear, Netherland). For each individual, tentacles were cut, flash frozen in dry ice or immersed in 70-95% Ethanol in a 2ml Eppendorf container and stored at -80°C.

DNA extractions

DNA extractions were performed using a salting out protocol (Miller, Dykes, & Polesky, 1988) modified as followed. For each individual, 15 to 30mg of tentacles were digested in a 530µL solution containing up to 300µg/ml of proteinase K at 56°C for 3h. Proteins and sugars were then precipitated with 200µL of 5M NaCl solution and centrifuged at 10 000g for 5min. Then, the supernatant was collected and an equal volume of cold 96% ethanol was added to precipitate DNA overnight at -20°C. Finally, after a second 5min centrifugation at 10 000g, the supernatant was eliminated, the DNA

pellet was resuspended in 200µl Tris-EDTA buffer and stored at -20°C. The final DNA concentration was measured using a Nanodrop1000 and varied from 100 to 1000ng/µl.

Development of taxonomic molecular markers

For 16 Kern genes (Ganot et al., 2011; Moya et al., 2012), 38 *Anemonia viridis* specific primer pairs were designed after matching expressed sequence tags (ESTs) of *A. viridis* using tblastx (Sabourault, Ganot, Deleury, Allemand & Furla, 2009) to putative orthologous genes in the two anthozoan genomes available at that time: the non-symbiotic actinarian *Nematostella vectensis* (Stephenson, 1935) (Grigoriev et al., 2012) and the symbiotic scleractinian *Acropora digitifera* (Dana, 1846) (Shinzato et al., 2011).

We used Geneious version R6 (Kearse et al., 2012) as alignment tool between the contigs and their orthologs in both genomes (matrix cost = +5/-4, 65% similarity, gap opening = 50, gap extension = 3). Primers flanking putatively conserved intron positions were designed using with Primer3 (Rozen & Skaletsky, 1999) using the *A. viridis* contigs as references. To check primers specificity, NCBI Blast searches with default settings were performed for each primer pair using the nr partition of Genbank, with the search narrowed down to cnidarians and *Symbiodinium* sp.

PCR amplification and Sanger sequencing

Each PCR reaction was made in a final volume of 25µl with 1X Invitrogen™ PCR buffer mix, 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1µM each of forward and reverse primer, 0.8U Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA polymerase and 3 µl of a 1/100 dilution of the DNA extracts. To determine the optimal annealing temperature for each primer pair, temperature gradient PCR were performed as follows: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, 35 cycles each composed of denaturation for 30 seconds at 95°C, hybridization for 30 seconds at temperatures between 50 and 68°C, and elongation for 2 minutes at 72°C. A final extension step was carried out at 72°C for 7 minutes.

The optimal hybridization temperatures were defined for each primer pair on a single individual (AlpS1). To test for primer specificity, a subsample of 16 individuals was amplified for each locus at the optimal hybridizing temperature thus defined. Primer pairs for which null alleles or multi-band amplification patterns were obtained were abandoned. The PCR reactions were visualized on a 0.8 to 2% agarose gel, depending on PCR product size, with GelRed™ (Biotium) at 0.25X concentration and using TAE

1X as electrophoresis buffer for 1h at 60V. When a more precise size definition was needed, the electrophoresis was performed on a 5 or 8% polyacrylamide gel using TBE 1X as electrophoresis buffer and migration time and amperage depending on fragment size.

For the validated primer pairs (Table 2), PCR products for the full sample set (38 individuals) were directly Sanger sequenced at Macrogen Inc. (South Korea). In the few cases in which direct sequencing did not work, the PCR products were cloned using pGEM®-T Easy cloning kit (Promega) and 4 to 6 clones were sequenced per individual by Sanger technology at Macrogen Inc. (South Korea).

Sequence analysis

Sequences were checked using the software Aligner version 3.7.1 (CodonCode) to identify homozygotes and heterozygotes. The direct sequencing of the amplification products for an individual heterozygote for alleles of different lengths results in the superimposition of two sequences, one of which is shifted in comparison to the other from the insertion/deletion point. Comparing such superimposed sequences from direct and reverse sequencing allows the identification of the inserted sequence, and the phasing of the single nucleotide polymorphism between the two alleles. This deciphering was performed manually in our analysis.

To reconstruct the haplotypes of the heterozygotes without indels, we used the software PHASE (Stephens, Smith, & Donnelly, 2001) using SeqPHASE (Flot, 2010) to import/export data from/to PHASE. We aligned the sequences using ClustalW in BioEdit (Hall, 1999). The alignments were finalized manually for each locus. Finally, we calculated the nucleotidic diversity π for each locus on the whole dataset using MEGA6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013).

Locus validation pipeline

The alignment of sequences among highly divergent genomes (*N. vectensis* and *A. digitifera*, the only anthozoan genomes available at the time of primer design) led to the design of primer pairs, which were sometimes not specific enough to reliably amplify the targeted sequences in *A. viridis*. We therefore discarded primers that amplified more than two DNA fragments, as detected by gel electrophoresis, in a given individual from the 16 individuals subset. Among the PCR primers that passed this first test, we also

discarded the ones that resulted in more than two variant sequences in a given individual after direct sequencing of the PCR products. In consequence, our filtering against paralogous sequences were determined by 2 steps: the amplification step and the amplicon sequencing step. For both of them, if more than two sequences were revealed (more than two bands on the gel electrophoresis and unreadable sequences respectively), primers were discarded.

Gene trees reconstruction

For each locus, a gene tree was built with MEGA6 using both maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) algorithms. The optimal substitution matrix for ML calculation was obtained for each locus from MEGA6, and 500 bootstrap pseudoreplicates were performed for each tree for clade support. For each tree, a bootstrap consensus tree was built with a cutoff value of 35%. Haplotype networks for the same EPIC loci were also constructed using the TCS algorithm for maximum parsimony network (Clement, Posada, & Crandall, 2000) implemented in the software PopART version 1.7 (Leigh & Bryant, 2015).

As required for the subsequent coalescent analysis (see below), ultrametric trees were constructed for each locus from ML trees obtained in MEGA6 (as described above) using MESQUITE (Maddison & Maddison, 2017).

Species tree and species delimitation

Using the ultrametric gene trees, we estimated the likelihood of different species trees using a coalescent approach in SpedeSTEM 2.0 (Ence & Carstens, 2011). It assumes all putative species as separate lineages and computes the likelihood for alternative species trees in various permutations and combinations of subpopulations by collapsing two or more species into a single lineage using the ultrametric gene trees. Species boundaries were then compared using the Akaike information criterion. In this computation, we used an estimated value of $\theta = 0.16$ for *A. viridis* populations following Solé-cava & Thorpe (1991). A Bayesian estimation of the species delimitation and species tree was also performed using BPP (Bayesian Phylogenetics and Phylogeography) version 3.3, method A11 (Yang, 2015). The method uses the multispecies coalescent model to compare different models of species delimitation and species phylogeny, accounting for incomplete lineage sorting due to ancestral polymorphism and gene tree/species tree

conflicts (Rannala & Yang, 2013; Yang & Rannala, 2010, 2014). For this analysis, we regrouped the individuals either by “morph x site” or by “morph x region” groups taking into account that BPP can merge, but not split, these groups into species. The population size parameters (θ s) were assigned the gamma prior $G(32, 200)$, with mean $32/200 = 0.16$. The divergence time at the root of the species tree (τ_0) was assigned the gamma prior $G(4, 200)$, while the other divergence time parameters were assigned the Dirichlet prior (Yang & Rannala, 2010). Each analysis was run for 100,000 generations (with a burn-in of 10,000 generations) at least twice with different seeds to confirm consistency between runs.

Convergence was further tested by running the analysis using two different guide trees, as stated by Yang (2015). We chose one that split the individuals first by region of origin and then by morph, and another that split the individuals first by morph and then by region of origin.

Extent of clonality in A. viridis var. smaragdina and var. rustica

Sampling

80 individuals of *A. viridis* were sampled in September 2015 in Saint-Jean-Cap-Ferrat (43°41'59''N, 7°19'27''E). On each side of the bay, two pure patches, one of var. *smaragdina*, one of var. *rustica* (10 individuals each) and a 2m² area containing independent individuals, i.e. not clustered in patches, (10 individuals of each morph) were sampled. All individuals sampled belonged to ecotype I (Schmidt, 1972).

Microsatellite genotyping

DNA extractions were performed as previously described. Three *A. viridis* microsatellite loci (L19, L42 and L47, Table 2) were identified from the EST database (Sabourault et al., 2009) using MSATCommander 0.8.2 (Faircloth, 2008), and further validated following the procedure described for the EPIC markers. The 80 individuals were amplified separately for each locus using the PCR protocol previously described except for the volume of template DNA: 1μL (for L19 and L42) or 3μL (for L47) of a 1/100 dilution of the DNA extracts. The amplification cycle was as described above, except for an annealing temperature of 65°C and a 30 sec elongation step for all loci.

For each individual, a mixed dilution of the three PCR microsatellite loci (1/40 for L42 and L47, 1/30 for L19) was electrophorised along with a molecular weight marker on an automatic sequencer at Macrogen Inc. (South Korea). The electrophoregrams were read using STRand version 2.2.30 (Toonen & Hughes, 2001).

Detection of clonal genotypes

Clonal genotypes were detected using Genclone (Arnaud-Haond & Belkhir, 2006). This software computes the probability of obtaining the observed multilocus genotypes (MLG) under sexual reproduction, considering the allelic frequencies and the mean heterozygote deficiency (F_{IS}) in the population. When the probability of obtaining the observed number of occurrences of an MLG was lower than 5%, this MLG was considered as clonal.

The proportions of clonal individuals or MLGs were compared among the two morphs by performing an exact RxC test using the RxC software (Raymond & Rousset, 1995) with default settings.

Results

EPIC validation

A total of 38 primer pairs targeting 16 kern genes were tested, and after sequencing of the amplicons, seven of them revealed to be specific and reliably amplified the desired target gene sequence (*ca2c*, *ca2m*, *duf140*, *RNAbinding5*, *rnf34*, *tyrK*, *sym32*). These seven primer pairs amplified a homologous target in the outgroup *P. cinerea* as well. Nucleotide diversity varied among loci between 0 and 5% (see Table 2). Primers had been designed to target introns in *A. viridis* whose positions were conserved between *N. vectensis* and *A. digitifera* (alignments not shown). Only three of these primer pairs finally led to the amplification of an intron sequence (*duf140*, *RNAbinding5*, *tyrK*). Even if no intron was found for *ca2m* and *sym32*, the obtained coding sequences did contain polymorphisms. The amplification of *ca2c* and *rnf34* showed no genetic variation among the individuals analysed (outgroup included).

Across all polymorphic loci, we obtained 303 parsimony informative positions. All the alignments of the obtained sequences are available upon request.

Gene trees and haplotype network

For each of the five polymorphic loci (*ca2m*, *duf140*, *RNAbinding5*, *tyrK*, *sym32*), we built ML and MP trees. The ML trees are shown in Supplementary Figure 1. For all loci, both analyses gave similar results, with most trees being only partially resolved, with no clear clustering neither by morphs nor geography.

None of the haplotype networks showed grouping of alleles depending on morphology or geography (Figs 2 to 6). Whatever the locus, all morphs shared common alleles. Reticulation could be high (for *tyrK* and *duf140*, Fig 2 and 3) even for a locus with low nucleotide diversity. For *RNAbinding5*, two groups of closely related alleles were clearly identified (Fig 4), which may indicate the amplification of paralogous genes. However, no individual with more than two sequence variants were found making the hypothesis of paralogous genes highly unlikely. Moreover, the divergence between these two allele groups is mainly due to the presence of a single large indel within the intron sequence.

On the whole, many alleles are shared between *P. cinerea* and *A. viridis*, providing enough instances of incomplete sorting of ancestral polymorphisms to hypothesize that *P. cinerea* is a close relative of *A. viridis*.

Species delimitation and species tree

In the context of low phylogenetic signal, the multilocus coalescent approach can still extract pertinent information on species delimitation (Ence & Carstens, 2011; Yang, 2015). Both SpedeSTEM (Table 3) and BPP (Supplementary Table 1) analyses indeed pointed to the same result: the only clearly identified separated lineage in our data is the outgroup *P. cinerea*. In SpedeSTEM, all the *A. viridis* individuals formed a single lineage (Table 3). In BPP, all the *A. viridis* individuals were lumped in a single lineage (posterior probability of the species of 0,83), except for the *A. viridis* var. *rufescens* individuals from the Mediterranean Sea, which regrouped with the *P. cinerea* outgroup (posterior probability of the species of 0.65) (Supplementary Table 1). The grouping of individuals according to their regions of origin (English Channel vs Mediterranean Sea)

is more probable than their grouping according to their morphs (best of the worst hypothesis in SpedeSTEM, Table 3).

Clonality

In total, 38 var. *smaragdina* and 39 var. *rustica* individuals were genotyped for three microsatellite markers L19, L42 and L47 (Table 2). We obtained 36 different genotypes (20 for var. *smaragdina*, 16 for var. *rustica*). Among these genotypes, 25 were unique (found in a single individual), (16 for var. *smaragdina*, 9 for var. *rustica*). The other 11 genotypes were each found in 2 to 8 individuals, and, due to the allelic frequency distribution on the three loci, were all clonal, according to Genclone analysis (i.e. for each of them, the probability of having that many individuals with this genotype produced by sexual reproduction was lower than 5%, even after correcting for heterozygote deficit) (Supplementary Table 2). Even if clonality seemed more frequent in our samples in var. *rustica* (MLG=7) than in var. *smaragdina* ecotype I (MLG=4) (Supplementary Table 2), neither the number of clonal genotypes, nor the number of clonal individuals were significantly different in both morphs (RxC test, P values of 0.159 and 0.092 resp.).

Discussion

Expressed genes as species delimitation markers

We have tested the use of two different molecular markers to define the taxonomic status of different morphs of *Anemonia viridis*. Firstly, we conducted an EPIC analysis of stress response genes (Ganot et al., 2011; Moya et al., 2012), previously considered to represent potentially informative phylogenetic markers (Bensch et al., 2002; Garvin et al., 2010).

Among the seven amplified loci, four, *ca2c*, *rnf34*, *ca2m* and *sym32*, were finally not EPICs, as the amplified fragment did not contain any intron in both *A. viridis* and *P. cinerea*. Nevertheless, *sym32* and *ca2m* displayed nucleotide diversities of 1.3 and 2.4% (Table 2) and could be used in subsequent analyses. On the other hand, a total lack of polymorphism, without any divergent positions (including the outgroup), was observed

in *ca2c* and *rnf34*. This high conservation of these coding sequence, even at degenerate codon positions, is a testimony of the high level of background selection acting on these two loci, and therefore of their crucial role for the organism (ie, pH homeostasis and protein turnover, respectively). It is interesting to note that in *A. viridis*, the loss of introns whose positions were conserved among *Nematostella vectensis* and *Acropora digitifera* was not directly linked to the level of conservation of the surrounding coding sequence.

Anemonia viridis, how many species?

Species complexes can often arise without morphological segregation, as in the case of cryptic species (Bickford et al., 2007). In cnidarians, several examples of cryptic species have already been described (Ladner & Palumbi, 2012; Pfenninger & Schwenk, 2007; Warner, van Oppen, & Willis, 2015). In the worldwide distributed scyphozoan *Aurelia aurita*, genetic variation was found much higher than previously thought and nine cryptic species were described despite very low morphological variation throughout the worldwide distribution (Dawson & Jacobs, 2001). Furthermore, recently described sea anemone species *Exaiptasia brasiliensis* could only be differentiated from *Exaiptasia pallida* using molecular markers, the two species being morphologically undistinguishable (Grajales & Rodriguez, 2016). On the other hand, clear phenotypic differences, such as differences in spawning time, have been recognized as diagnostic for species level differentiation, as in the scleractinian *Acropora samoensis* (Rosser, 2015). It should, however, be noted that marked morphological differences were not linked to any detectable genetic difference in the sea anemone *Phymanthus crucifer* (González-Muñoz et al. 2015).

In the case of *A. viridis*, species status for the colour morphs first described by Andres (1881) and Gosse (1860) has been widely discussed. The major variants are characterised by different reproductive strategies (Sauer, 1986; Wiedenmann, Kraus, et al., 2000; Wiedenmann et al., 1999), different depth distributions (Sauer, 1986; Sauer et al., 1986; Wiedenmann et al., 2007, 1999) and in some cases, genetic differentiation (Bulnheim & Sauer, 1984). Following (Bulnheim & Sauer, 1984), *A. viridis* was separated into two species, with var. *rustica* being raised to species level, under the name *Anemonia rustica*. The other morphs had been regrouped into *Anemonia sulcata*. However, subjected to more thorough genetic analysis, the differences among the

morphs were not so clear cut: the colourless morph var. *rustica* had been shown to still express at very low level both the GFP and the pink pigment diagnostic of the other morphs (Leutenegger et al., 2007). Our phylogenetic results confirm the lack of genetic differentiation among the morphs. Indeed, none of the gene trees displayed a morph based clustering (Figs 2-6 and Supplementary Fig 1), and the two coalescent analyses agreed on pooling two of the morphs (var. *rustica*, *smaragdina*) in the same species, while clearly identifying the *P. cinerea* outgroup despite obvious incomplete lineage sorting (Table 3 and Supplementary Table 1).

One may argue that the apparent genetic homogeneity among the morphs could be a consequence of a lack of resolution due to the nature of our markers (introns or even coding sequences of stress response genes). However, divergent species as proposed for the *Anemonia* morphs should be readily discriminated with very few markers (Bensch et al., 2002; Garvin et al., 2010; C. T. Smith, Templin, Seeb, & Seeb, 2005), all the more with loci under divergent selection, which could be efficient in detecting locally adapted species (Bensch et al., 2002). None of our markers displayed clear cut segregation among morphs, as one could expect from adaptive loci in locally adapted species (see Bensch et al., 2002 for an example). Even the outgroup *Paranemonia cinerea* was not totally differentiated as in many cases, alleles were shared between this species and *Anemonia* individuals (Figs 2-6). As such, the repeated lack of differentiation is not *per se* a proof of absence of reproductive barrier among the morphs. As it has been shown in *Ciona*, parts of the genome can display such a lack of differentiation even among established species (Sato, Satoh, & Bishop, 2012). The sharing of alleles among independent lineages could also be due to incomplete sorting of ancestral alleles, a pervasive phenomenon among recently derived species, the so-called “grey zone” (De Queiroz, 2007), and a major source of incongruence among gene trees and species trees (Fujita, Leaché, Burbrink, McGuire, & Moritz, 2012). In such cases, the coalescent approach can recover the true species tree, even from poorly resolved gene trees (Carstens, Pelletier, Reid, & Satler, 2013; Yang, 2015). Applying both SpedeSTEM (Ence & Carstens, 2011) and BPP (Yang, 2015) analyses (Table 3 and Supplementary Table 1) to our data set, this approach clearly identified *P. cinerea* as a divergent species from *A. viridis* var. *smaragdina* and *rustica*. In contrast, the two *A. viridis* morphs were clearly merged into a single lineage. The only separation among *A. viridis* individuals that was picked up by these analyses was not among morphs, but between

Mediterranean and English Channel populations. Again, the level of separation was not indicative of speciation. In summary, the erection of the *A. viridis* morph *rustica* to the rank of separate species *Anemonia rustica*, ((Bulnheim & Sauer, 1984), is not supported by the present analysis.

We confirm by microsatellite diversity analysis that the var. *smaragdina* ecotype I is as clonal as the other morphs of the same ecotype (Supplementary Table 3). It should however be noted that in our clonality analysis, we only sampled individuals that were present in patches or occurred very close to each other, as our aim was to detect the occurrence of clonality in *A. viridis* var. *smaragdina* ecotype I. The highly clonal nature of the morphs observed here and in previous studies (Sauer, 1986; Sauer et al., 1986; Wiedenmann et al., 2000b, the present study) may have led the authors of the previous studies (Bulnheim & Sauer, 1984; Sauer, 1986; Wiedenmann et al., 2007) to interpret within species clonal genotype competition as among species niche exclusion. Indeed, the results of our species delimitation analysis clearly show that genetic differentiation among *A. viridis* colour morphs is definitely more akin to population processes than to species divergence. Unravelling the mechanisms of local adaptation in *Anemonia viridis* may therefore provide the answer to the question of the exact nature of these colour morphs. Even if microsatellites loci could be used to describe the population genetic structure, genotype environment associations detection needs a deeper genome coverage, that is more easily achieved today by SNPs mass genotyping approaches. This is the technical option we chose to develop in our future studies of *Anemonia viridis* morphs.

Conclusion

Why are there so many different colour morphs? All FPs and CPs discovered so far in cnidarians have originated from the same ancestor protein but multiple parallel evolution of different pigment colours occurred in this gene family (Alieva et al., 2008; Kelmanson & Matz, 2003; Shagin et al., 2004). Several functions have been suggested for GFP-like proteins (Eyal et al., 2015; Roth, Fan, & Deheyn, 2013). Among them, the initially proposed photoprotective function of FPs and CPs in zooxanthellate, shallow water cnidarians (Kawaguti, 1944; Salih, Larkum, Cox, Köhl, & Hoegh-Guldberg, 2000; Wiedenmann et al., 1999) has been supported by experimental evidence

(D'Angelo et al., 2012; Gittins et al., 2015; E. G. Smith, D'Angelo, Salih, & Wiedenmann, 2013). Colour polymorphism is commonly found among these taxa with *A. viridis* providing a striking example (Field et al., 2006; Kelmanson & Matz, 2003; Leutenegger et al., 2007; Oswald et al., 2007). Despite being responsible for strong phenotypic differences, the variable FP and CP content in *A. viridis*, does not delineate different species. However clear this result is, the sample number in our study is not high enough to assess the level of genetic diversity within *A. viridis* and the biogeographical structure, especially at the local scale. Therefore, we cannot test for alternative hypotheses on the exact origin of the morphs. Do they correspond to different cohorts with distinct strategies of adaptive plasticity (a possible hypothesis in this highly clonal long-lived species) (Foo & Byrne, 2016)? Can the different morphs belong to a same cohort, split into different morphs by local plastic response at larval settlement and developmental canalization (Kawecki & Ebert, 2004; Kinne, 1962; Zamer & Mangum, 1979)? Are the different morphs due to different alleles maintained through local balanced selection acting on FPs and CPs loci (Gittins et al., 2015)? Again, a more thorough genetic exploration, in terms of number of individuals sampled and genome coverage, is still needed to reveal the exact nature of *A. viridis* morphs.

Acknowledgements

The authors would like to thank R. Rodolfo-Metalpa, P. Robvieux, M. Gonzalez-Wangüemert, A. Pey, F. Priouzeau and P. Ventura for providing us with samples. Cedric Mallien 's PhD grant and lab support were provided by the ANR Bioadapt research program « AdaCni » (ANR-12-ADAP-0016) ([ADACNI project](#)). JW acknowledges funding from Natural Environment Research Council (NE/I01683X/1, NE/I01683X/1 & NE/I012648/1), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Wi1990/2-1), and the European Research Council (ERC Grant Agreement no. 311179). The authors would like to dedicate this article to the memory of their friend and colleague, Dr Pierre Laurent Merle, who left this world before we could answer his long standing question of the nature of the morphs of *Anemonia viridis*.

References

- Alieva, N. O., Konzen, K. A., Field, S. F., Meleshkevitch, E. A., Hunt, M. E., Beltran-Ramirez, V., ... Matz, M. V. (2008). Diversity and Evolution of Coral Fluorescent Proteins. *Public Library of Science ONE*, 3, e2680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002680>
- Andres, A. (1881). *Intorno alla scissiparita delle attinie*. Mitt. Zool. Stat. Neapel.
- Andres, A. (1883). *Le Attinie, Memoria* (Vol. Primo). Accademia dei Licei.
- Arnaud-Haond, S., & Belkhir, K. (2006). genclone: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization: Program note. *Molecular Ecology Notes*, 7, 15–17. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01522.x>
- Bensch, S., Åkesson, S., & Irwin, D. E. (2002). The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. *Molecular Ecology*, 11, 2359–2366.
- Bensoussan, N., Romano, J.-C., Harmelin, J.-G., & Garrabou, J. (2010). High resolution characterization of northwest Mediterranean coastal waters thermal regimes: To better understand responses of benthic communities to climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87, 431–441. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.01.008>

- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., ... Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Bulnheim, H.-P., & Sauer, K. P. (1984). *Anemonia sulcata* - two species? Genetical and ecological evidence. *Verhandlungen Der Deutschen Zoologische Gesellschaft*, , 264.
- Canales-Aguirre C.B., Quiñones A., Hernández C.E., Neill P.E., Brante A. (2015) Population genetics of the invasive cryptogenic anemone, *Anemonia alicemartinae*, along the southeastern Pacific coast. *Journal of Sea Research*, 102, 1-9.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22, 4369–4383.
- Chintiroglou, C. C., Karalis, P. (2000). Biometric investigations on the cnidae of the Aegean colour morphs of *Anemonia viridis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80, 543-544.
- Choresh, O., Ron, E., & Loya, Y. (2001). The 60-kDa Heat Shock Protein (HSP60) of the Sea Anemone *Anemonia viridis*: A Potential Early Warning System for Environmental Changes. *Marine Biotechnology*, 3, 501–508.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1659.
- D'Angelo, C., Denzel, A., Vogt, A., Matz, M., Oswald, F., Salih, A., ... Wiedenmann, J. (2008). Blue light regulation of host pigment in reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*, 364, 97–106.
- D'Angelo, C., Smith, E. G., Oswald, F., Burt, J., Tchernov, D., & Wiedenmann, J. (2012). Locally accelerated growth is part of the innate immune response and repair mechanisms in reef-building corals as detected by green fluorescent protein (GFP)-like pigments. *Coral Reefs*, 31, 1045–1056.
- Daly M., Gusmao L.C., Reft A.J., Rodriguez E. (2010) Phylogenetic signal in mitochondrial and nuclear markers in sea anemones (Cnidaria, Actiniaria). *Integrative and Comparative Biology*, 50, 371-388.
- Daly, M., Crowley, L.M., Larson, P., Rodríguez, E., Heestand Saucier, E., Fautin, D. G. (2017) *Anthopleura* and the phylogeny of Actinioidea (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Organisms Diversity & Evolution*, doi:10.1007/s13127-017-0326-6

- Dani, V., Priouzeau, F., Pagnotta, S., Carette, D., Laugier, J.-P., & Sabourault, C. (2016). Thermal and menthol stress induce different cellular events during sea anemone bleaching. *Symbiosis*, *69*.
- Dawson, M. N., & Jacobs, D. K. (2001). Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *The Biological Bulletin*, *200*, 92–96.
- De Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, *56*, 879–886.
- Dohna, T. A., & Kochzius, M. (2015). Obstacles to molecular species identification in sea anemones (Hexacorallia: Actiniaria) with COI, a COI intron, and ITS II. *Marine Biodiversity*, *46*, 291–297
- Ence, D. D., & Carstens, B. C. (2011). SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation: Technical advances. *Molecular Ecology Resources*, *11*, 473–480.
- Eyal, G., Wiedenmann, J., Grinblat, M., D'Angelo, C., Kramarsky-Winter, E., Treibitz, T., ... Loya, Y. (2015). Spectral Diversity and Regulation of Coral Fluorescence in a Mesophotic Reef Habitat in the Red Sea. *Public Library of Science ONE*, *10*, e0128697.
- Faircloth, B. C. (2008). MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, *8*, 92–94.
- Field, S. F., Bulina, M. Y., Kelmanson, I. V., Bielawski, J. P., & Matz, M. V. (2006). Adaptive Evolution of Multicolored Fluorescent Proteins in Reef-Building Corals. *Journal of Molecular Evolution*, *62*, 332–339.
- Flot, J.-F. (2010). SEQPHASE: a web tool for interconverting phase input/output files and fasta sequence alignments: Computer program note. *Molecular Ecology Resources*, *10*, 162–166.
- Foo, S. A., & Byrne, M. (2016). Acclimatization and Adaptive Capacity of Marine Species in a Changing Ocean. *Advances in Marine Biology*, *76*, 69–116
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., & Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, *27*, 480–488.
- Ganot, P., Moya, A., Magnone, V., Allemand, D., Furla, P., & Sabourault, C. (2011). Adaptations to Endosymbiosis in a Cnidarian-Dinoflagellate Association:

- Differential Gene Expression and Specific Gene Duplications. *Public Library of Science Genetics*, 7, e1002187.
- Garvin, M. R., Saitoh, K., & Gharrett, A. J. (2010). Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review: Invited technical review. *Molecular Ecology Resources*, 10, 915–934.
- Gittins, J. R., D'Angelo, C., Oswald, F., Edwards, R. J., & Wiedenmann, J. (2015). Fluorescent protein-mediated colour polymorphism in reef corals: multicopy genes extend the adaptation/acclimatization potential to variable light environments. *Molecular Ecology*, 24, 453–465. <https://doi.org/10.1111/mec.13041>
- González-Muñoz R., Simões N., Mascaró M., Tello-Musi J.L., Brugler M.R., Rodríguez E. (2015) Morphological and molecular variability of the sea anemone *Phymanthus crucifer* (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria, Actinoidea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95, 69-79.
- Gosse, P. H. (1860). *A historie of the british sea anemones and corals*. London: Van Voorst, Paternoster Row.
- Grajales A, Rodríguez E (2016) Elucidating the evolutionary relationships of the *Aiptasiidae*, a widespread cnidarian–dinoflagellate model system (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria: Metridioidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 252-263.
- Grigoriev, I. V., Nordberg, H., Shabalov, I., Aerts, A., Cantor, M., Goodstein, D., ... Dubchak, I. (2012). The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Research*, 40, D26–D32.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95, 98, NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, (41), 95–98.
- Kawaguti, S. (1944). On the physiology of reef corals. VII. Zooxanthellae of the reef corals is *Gymnodinium* sp. Dinoflagellata; its culture in vitro. *Palao Tropical Biological Station Studies*, (2), 265–275.
- Kawecki, T. J., & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7, 1225–1241.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop

- software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649.
- Kelmanson, I. V., & Matz, M. V. (2003). Molecular Basis and Evolutionary Origins of Color Diversity in Great Star Coral *Montastraea cavernosa* (Scleractinia: Faviida). *Molecular Biology and Evolution*, 20, 1125–1133.
- Keshavmurthy, S., Yang, S.-Y., Alamaru, A., Chuang, Y.-Y., Pichon, M., Obura, D., ... Chen, C. A. (2013). DNA barcoding reveals the coral ‘laboratory-rat’, *Stylophora pistillata* encompasses multiple identities. *Scientific Reports*, 3, 1520
- Kinne, O. (1962). Irreversible nongenetic adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 5, 265–282.
- Ladner, J. T., & Palumbi, S. R. (2012). Extensive sympatry, cryptic diversity and introgression throughout the geographic distribution of two coral species complexes: geographic patterns of diversity and introgression. *Molecular Ecology*, 21, 2224–2238.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1110–1116.
- Leutenegger, A., Kredel, S., Gundel, S., D’Angelo, C., Salih, A., & Wiedenmann, J. (2007). Analysis of fluorescent and non-fluorescent sea anemones from the Mediterranean Sea during a bleaching event. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 353, 221–234. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.09.013>
- Lukyanov, K. A., Fradkov, A. F., Gurskaya, N. G., Matz, M. V., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., ... Lukyanov, S. A. (2000). Natural Animal Coloration Can Be Determined by a Nonfluorescent Green Fluorescent Protein Homolog. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 25879–25882.
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2017. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.2 <http://mesquiteproject.org>.
- Manuel, R. L. (1988). *British Anthozoa. Synopses of the British Fauna (new series)*. Leiden: D. M. Kermack & R. S. K. Barnes.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
- Moya, A., Ganot, P., Furla, P., & Sabourault, C. (2012). The transcriptomic response to thermal stress is immediate, transient and potentiated by ultraviolet radiation in

- the sea anemone *Anemonia viridis*: Molecular basis of cnidarian bleaching. *Molecular Ecology*, *21*, 1158–1174.
- Oswald, F., Schmitt, F., Leutenegger, A., Ivanchenko, S., D'Angelo, C., Salih, A., ... Wiedenmann, J. (2007). Contributions of host and symbiont pigments to the coloration of reef corals: Coloration of reef corals. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, *274*, 1102–1122.
- Palumbi, S. R., & Baker, C. S. (1994). Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, *11*, 426–435.
- Pfenninger, M., & Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BioMed Central Evolutionary Biology*, *7*, 121.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, *111*, 229–233.
- Rannala, B., & Yang, Z. (2013). Improved Reversible Jump Algorithms for Bayesian Species Delimitation. *Genetics*, *194*, 245–253.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). An Exact Test for Population Differentiation. *Evolution*, *46*, 1280–1283.
- Revel, J., Massi, L., Mehiri, M., Boutoute, M., Mayzaud, P., Capron, L., & Sabourault, C. (2016). Differential distribution of lipids in epidermis, gastrodermis and hosted Symbiodinium in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *191*, 140–151.
- Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P.-L., & Allemand, D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, *208*, 277–285.
- Rosser, N. L. (2015). Asynchronous spawning in sympatric populations of a hard coral reveals cryptic species and ancient genetic lineages. *Molecular Ecology*, *24*, 5006–5019.
- Roth, M. S., Fan, T.-Y., & Deheyn, D. D. (2013). Life History Changes in Coral Fluorescence and the Effects of Light Intensity on Larval Physiology and Settlement in *Seriatopora hystrix*. *Public Library of Science ONE*, *8*, e59476.

- Rozen, S., & Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365–386). Springer.
- Sabourault, C., Ganot, P., Deleury, E., Allemand, D., & Furla, P. (2009). Comprehensive EST analysis of the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *BioMed Central Genomics*, *10*, 333.
- Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kühl, M., & Hoegh-Guldberg, O. (2000). Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature*, *408*(6814), 850–853.
- Sato, A., Satoh, N., & Bishop, J. D. D. (2012). Field identification of ‘types’ A and B of the ascidian *Ciona intestinalis* in a region of sympatry. *Marine Biology*, *159*, 1611–1619.
- Sauer, K. P. (1986). Strategien zeitlicher und räumlicher Einnischung. *Verhandlungen Der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, *79*, 11–30.
- Sauer, K. P., Müller, M., & Weber, M. (1986). Alloimmune memory for glycoprotein recognition molecules in sea anemones competing for space. *Marine Biology*, *92*, 73–79.
- Schmidt, H. (1972). Prodrömus zu einer Monographie der mediterranen Aktinien. *Zoologica*, *121*, 1–146.
- Shagin, D. A., Barsova, E. V., Yanushevich, Y. G., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Labas, Y. A., ... Matz, M. V. (2004). GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily: Evolution of Functional Features and Structural Complexity. *Molecular Biology and Evolution*, *21*, 841–850.
- Shearer, T. L., & Coffroth, M. A. (2008). Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources*, *8*, 247–255.
- Shearer, T. L., Van Oppen, M. J. H., Romano, S. L., & Wörheide, G. (2002). Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*, *11*, 2475–2487.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, *59*, 223–239.

- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., ... Satoh, N. (2011). Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*, *476*, 320–323.
- Smith, C. T., Templin, W. D., Seeb, J. E., & Seeb, L. W. (2005). Single Nucleotide Polymorphisms Provide Rapid and Accurate Estimates of the Proportions of U.S. and Canadian Chinook Salmon Caught in Yukon River Fisheries. *North American Journal of Fisheries Management*, *25*, 944–953.
- Smith, E. G., D'Angelo, C., Salih, A., & Wiedenmann, J. (2013). Screening by coral green fluorescent protein (GFP)-like chromoproteins supports a role in photoprotection of zooxanthellae. *Coral Reefs*, *32*, 463–474.
- Solé-cava, A., & Thorpe, J. P. (1991). High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. *Biological Journal of the Linnean Society*, *44*, 65–80.
- Stephens, M., Smith, N. J., & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, *68*(), 978–989.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*, 2725–2729.
- Todd, P. A. (2008). Morphological plasticity in scleractinian corals. *Biological Reviews*, *83*, 315–337.
- Toonen, R. J., & Hughes, S. (2001). Increased throughput for fragment analysis on an ABI Prism® 377 automated sequencer using a membrane comb and STRand software. *Biotechniques*, *31*, 1320–1325.
- Warner, P. A., van Oppen, M. J. H., & Willis, B. L. (2015). Unexpected cryptic species diversity in the widespread coral *Seriatopora hystrix* masks spatial-genetic patterns of connectivity. *Molecular Ecology*, *24*, 2993–3008.
- Wiedenmann, J., Elke, C., Spindler, K.-D., & Funke, W. (2000). Cracks in the β -can: fluorescent proteins from *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actinaria). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*, 14091–14096.
- Wiedenmann, J., Kraus, P., Funke, W., & Vogel, W. (2000). The relationship between different morphs of *Anemonia* aff. *sulcata* evaluated by DNA fingerprinting. *Ophelia*, *52*, 57–64.

- Wiedenmann, J., Leutenegger, A., Gundel, S., Schmitt, F., D'Angelo, C., & Funke, W. (2007). Long-term monitoring of space competition among fluorescent and nonfluorescent sea anemones in the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 87, 851.
- Wiedenmann, J., Rocker, C., & Funke, W. (1999). The morphs of *Anemonia* aff. *sulcata* (Cnidaria, Anthozoa) in particular consideration of the ectodermal pigments. *Verhandlungen Der Gesellschaft Fur Okologie*.
- Yang, Z. (2015). The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Current Zoology*, 61(5), 854–865.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 9264–9269.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2014). Unguided Species Delimitation Using DNA Sequence Data from Multiple Loci. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 3125–3135.
- Zamer, W. E., & Mangum, C. P. (1979). Irreversible nongenetic temperature adaptation of oxygen uptake in clones of the sea anemone *Haliplanella Luciae* (Verrill). *The Biological Bulletin*, 157, 536–547.

Table 1: Sampling Population details

Sampling of individuals used in the phylogenetic analysis. Table shows the species and morphs identifications, the sampling origins in term of regions (Mediterranean Sea, Med or English Channel, EnC), sites and GPS coordinates, the year of sampling, the number of individuals sampled per population (N).

Species	Morph	N	Region	Origin	Site code	Coordinates	Year
<i>A. viridis</i>	smaragdina (S)	2	Med	Banyuls-sur-mer (France)	Ban	42°28'50''N	2013
	rustica (R)	2	Med			03°07'50''E	
<i>A. viridis</i>	rufescens (U)	4	Med	Collioure (France)	Col	42°31'52''N	2006
						03°04'68''E	
<i>A. viridis</i>	smaragdina (S)	2	Med	Antibes (France)	Alp	43°33'32''N	2013
	rustica (R)	2	Med			07°07'16''E	
<i>A. viridis</i>	smaragdina (S)	2	Med	Portofino (Italy)	Prt	44°18'14''N	2010
	rustica (R)	2	Med			09°12'49''E	
<i>A. viridis</i>	smaragdina (S)	2	Med	Vulcano (Italy)	Vul	38°21'14''N	2011
	rustica (R)	2	Med			14°59'22''E	
<i>A. viridis</i>	smaragdina (S)	2	Med	Lošinj (Croatia)	Cro	44°31'53''N	2009
	rustica (R)	2	Med			14°28'19''E	
<i>A. viridis</i>	rustica (R)	2	EnC	Plymouth (UK)	Ply	50°16'40''N	2014
	rufescens (U)	4	EnC			03°54'49''W	
<i>A. viridis</i>	smaragdina (S)	2	EnC	Southend (UK)	Sou	50°44'14''N	2013
	rustica (R)	2	EnC			01°23'39''W	
<i>P. cinerea</i>	(P)	1	Med	Culatra (Portugal)	Por	36°59'13''N	2014
						07°49'57''W	
<i>P. cinerea</i>	(P)	1	Med	Los Urrutias (Spain)	Por	37°41'03''N	2014
						00°49'19''W	
<i>P. cinerea</i>	(P)	1	Med	Leucate (France)	Por	42°51'07''N	2013
						03°00'00''E	
<i>P. cinerea</i>	(P)	1	Med	Nubia (Italy)	Por	37°58'50''N	2014
						12°29'34''E	

Table 2: Molecular markers details

Name of the markers, designed by their specific primers, optimal PCR hybridizing temperature, and either the observed nucleotidic diversity and intron size (for the EPICs) or the repeated motif, the number of alleles observed and the size variation of the amplification product (for the microsatellites).

Locus name	Gene name	Primers (5'-3')	Tm (°C)	Nucleotidic diversity (%)	Intron size (bp)	Repeat	Allele Nb	Size variation
Ca2m	Carbonic anhydrase 2 membrane	F: CCCCAGTGAAAGTGAACATTAAG R: TCTTTGACTTTGAGTGGTTTTGA	63	2.4	0	-	-	-
Ca2c	Carbonic anhydrase 2 cytosolic	F: GACCAGCGAAGGAAATCACTTA R: TGAAGAGATCTGTGTTCCAGTGA	62	0.0	0	-	-	-
TyrK	Tyrosine kinase receptor	F: GTTATGAAAGCGTTTATGAAGACAGA R: CAGTTCTGCTAGAAATTCCTTCTTG	66	2.7	520-540	-	-	-
RNAbind5	RNA-binding motif protein 5	F: TACAATGGCACAACCTGGACAATA R: TTCAGTAGCAGATGTCGTAGCTGT	62	2.5	260-270 440-550	-	-	-
Sym32	Putative cell adhesion protein Sym32	F: GACTTTTGGAGTAAATACACTTTGTCA R: ATTTGGCAACTTCTGCAAGATT	63	1.3	0	-	-	-
DUF140	DNA unwinding factor 140	F: CTCTCTTCTTCGGATGGTTCAT R: GCGAAAATCATGAAGACAATCA	54	2.7	535-545 595-605	-	-	-
RNF34	E3 ubiquitin-protein ligase RNF34-like	F: GCTAGTCGGCTGTAGCTTTTCG R: GGGTTGCTTGTGTTGTAATGGTA	66	0.0	0	-	-	-
L19	Microsatellite	F : GATGCAATGACAAGGCCTACC R : GTATACGTCATTTCCGGCCTC	62	-	-	(ACAG)	12	100-457
L42	Microsatellite	F: CCCAAACTTGTCATCACCGAC R: ATCATGTTTGAGGCCACCTTG	51	-	-	(AT)	8	215-223
L47	Microsatellite	F: CCTGATCATTCTGGTCGAAAGC R: TCCATGGCAACCGATTCAAAG	66	-	-	(AT)	9	288-320

Table 3: SpedeSTEM validation results.

The SpedeSTEM software was used to evaluate by coalescence analysis the likelihood of different species trees considering the gene trees observed. Only the four best biologically relevant scenarios are shown in the table. Origin codes (Morph x Sampling): Ruf, A.v. var. *rufescens*; Sma, A.v. var. *smaragdina*; Rus, A.v. var. *rustica*; Med, Mediterranean Sea; Enc, English Channel; Pcin, *P.cinerea* outgroup. LnL, logarithm of the likelihood, k number of parameters for the likelihood ratio test

Species Tree Topologies	lnL	k
Pcin, (RufMed+SmaMed+RusMed+RufEnC+SmaEnC+RusEnC)	-34745.86	1
RufMed, (Pcin, (SmaMed+RusMed) (RufEnC+SmaEnC+RusEnC))	-39994.15	3
RufMed (Pcin, (SmaMed+RusMed), (RufEnC, (SmaEnC+RusEnC))	-40324.37	4
Pcin, (RufMed+SmaMed+RusMed), (RufEnC+SmaEnC+RusEnC)	-40107.16	2
Pcin, (RufMed+RufEnC), (SmaMed+SmaEnC), (RusMed+RusEnC)	-40438.23	3
Pcin, RufMed, RufEnC, SmaMed, SmaEnC, RusMed, RusEnC	-40324.45	6

Supplementary Table 1: Identification of clonal and sexual genotypes in *A. viridis* var. *rustica* and *smaragdina* in Saint-Jean-Cap-Ferrat

Genclone analysis of the multilocus genotypes (MLG) obtained using three microsatellite loci (L19, L42 and L47). The probability of obtaining each MLG is computed from the allelic frequencies at each locus, assuming linkage equilibrium among loci and either panmixia or a systematic heterozygote deficiency (*Fis*) estimated from the data. The probability of obtaining these genotypes as many times as observed in the data assuming sexual reproduction (*i.e.* panmixia, either complete or *Fis* corrected) is then computed from this value. A given MLG was considered as clonal when the corrected probability of being obtained as many times as observed through sexual reproduction was inferior to 0,05 (MLG id. marked with *) or to 0,01 (MLG id. Marked with **)

Loci			MLG	p _{gen}	p _{gen} (fis)	Nb ramets	reencounter	p _{sex} reencounter	p _{sex} (fis) reencounter	Morph
L47	L42	L19								
108/109	216/221	296/308	1**	4.89E-006	2.93E-006	2	1	3.76E-004	2.25E-004	Rustica
106/107	216/221	304/316	2	7.73E-006	8.81E-006	1	0	-	-	Smaragdina
107/108	216/220	292/296	3	3.79E-006	4.32E-006	1	0	-	-	Rustica
107/109	216/221	304/316	4	1.85E-004	2.11E-004	1	0	-	-	Smaragdina
108/109	215/216	296/304	5**	1.21E-004	1.38E-004	8	7	9.13E-019	2.29E-018	Smaragdina
108/109	216/216	300/308	6**	2.35E-003	1.41E-003	6	5	1.22E-006	9.95E-008	Rustica
108/109	216/219	300/316	7	6.59E-004	7.52E-004	1	0	-	-	Rustica
108/109	216/221	288/292	8	3.25E-005	3.71E-005	1	0	-	-	Smaragdina
108/109	216/221	292/292	9	4.88E-005	-5.28E-005	1	0	-	-	Smaragdina
108/109	216/221	296/304	10	8.78E-004	1.00E-003	1	0	-	-	Smaragdina
108/109	216/221	296/308	11	1.70E-003	1.94E-003	1	0	-	-	Smaragdina
108/109	216/221	304/304	12	7.81E-004	4.56E-004	1	0	-	-	Smaragdina

Délimitation d'espèces au sein d'*Anemonia viridis*

108/109	216/221	304/308	13	3.02E-003	3.45E-003	1	0	-	-	Smaragdina
108/109	216/221	304/316	14**	1.85E-003	2.11E-003	8	7	1.62E-010	3.99E-010	Smaragdina
108/109	216/221	308/308	15	2.93E-003	2.50E-003	1	0	-	-	Smaragdina
108/109	217/221	308/312	16	4.73E-005	5.39E-005	1	0	-	-	Smaragdina
108/109	218/223	304/316	17	1.33E-006	1.52E-006	1	0	-	-	Smaragdina
109/109	216/216	300/308	18	1.41E-003	1.54E-003	1	0	-	-	Rustica
109/438	216/220	292/296	19	3.63E-005	4.14E-005	1	0	-	-	Rustica
109/443	216/219	300/316	20	6.26E-004	7.14E-004	1	0	-	-	Rustica
109/443	216/221	300/308	21*	2.69E-003	3.07E-003	3	2	1.86E-002	2.37E-002	Rustica
109/443	219/221	308/316	22	7.82E-004	8.92E-004	1	0	-	-	Smaragdina
111/111	219/221	308/316	23	3.43E-006	4.27E-005	1	0	-	-	Smaragdina
121/443	219/221	308/316	24	3.26E-005	3.72E-005	1	0	-	-	Smaragdina
122/443	219/221	308/316	25	3.26E-005	3.72E-005	1	0	-	-	Smaragdina
438/438	216/217	308/308	26**	1.62E-004	3.09E-004	7	6	4.19E-015	2.04E-013	Rustica
438/438	216/220	292/296	27**	1.21E-005	3.10E-005	4	3	1.30E-010	2.17E-009	Rustica
438/438	216/220	300/316	28	9.59E-005	2.45E-004	1	0	-	-	Rustica
438/438	216/220	308/320	29	1.39E-005	3.55E-005	1	0	-	-	Rustica
443/443	216/219	300/316	30	2.48E-004	5.78E-004	1	0	-	-	Rustica
443/443	216/219	304/316	31	2.64E-004	6.17E-004	1	0	-	-	Rustica
443/443	216/221	300/308	32*	1.07E-003	2.49E-003	3	2	3.16E-003	1.60E-002	Rustica

Délimitation d'espèces au sein d'*Anemonia viridis*

443/443	217/221	308/312	33	1.78E-005	4.15E-005	1	0	-	-	Smaragdina
443/443	219/221	308/316	34**	3.10E-004	7.22E-004	4	3	2.13E-006	2.65E-005	Smaragdina
443/457	216/221	300/308	35**	4.49E-004	5.12E-004	5	4	5.36E-008	9.04E-008	Rustica
443/457	219/221	308/316	36*	1.30E-004	1.49E-004	2	1	9.99E-003	1.14E-002	Smaragdina

MLG, multilocus genotype id.; **p_{gen}**, genotype probability assuming sexual reproduction; **p_{gen} (fis)**, genotype probability assuming sexual reproduction with a deviation from Hardy Weinberg equilibrium frequencies; **Nb ramets**, number of individuals observed for the MLG, **reencounter**, number of observed repeated occurrences of the MLG; **p_{sex} reencounter**, probability of observing the number of repeated occurrences assuming sexual reproduction; **p_{sex} (fis) reencounter**, probability of observing the number of repeated occurrences assuming sexual reproduction with a deviation from Hardy Weinberg equilibrium frequencies; **Morph**, Morph of the animals with the MLG.

Supplementary Table 2: BPP delimited species and their posterior probabilities

Mean posterior probabilities over two replicates of two seed values of BPP analysis with the parameters described in the text. Only the species with posterior probabilities higher than 1% are shown, except for the two last ones, which would correspond to species regrouping all the individuals from the var. *rustica* and *smaragdina* respectively. Origin codes (Morph x Sampling): Ruf, *A.v.* var. *rufescens*; Sma, *A.v.* var. *smaragdina*; Rus, *A.v.* var. *rustica*; Med, Mediterranean Sea; Enc, English Channel; Pcin, *P.cinerea* outgroup.

Posterior Probability	Species
0.8393	RusMed+SmaMed+RusEnC+SmaEnC+RufEnC
0.6519	RufMed+Pcin
0.3477	RufMed+SmaEnC+Pcin
0.1550	Pcin
0.0888	SmaEnC+RufEnC
0.0817	RusMed+SmaMed+RusEnC
0.0572	SmaMed+SmaEnC=RufEnC
0.0288	SmaEnC
0.0254	RufEnC
0.0202	RusMed+SmaMed+RusEnC+RufEnC
0.0164	RusMed+SmaMed+RusEnC+SmaEnC

0.0121	RusEnC
0.0117	SmaMed
0.0101	RusMed+SmaMed+RufEnC
...	...
0.0072	RusMed+RusEnC
0.0005	SmaMed+SmaEnC

Supplementary Table 3: Analysis of clonal genotypes for var. *rustica* and var. *smaragdina* morphs

Each individual was scored as clonal or sexual if it displayed a clonal or sexual multilocus genotype (MLG). An MLG was defined as clonal according to Genclone analysis, if the probability of obtaining by sexual recombination as many individuals as observed with this genotype was below 5%. MLGs, Multilocus genotypes.

Reproduction Modes	Number of individuals		Number of MLGs	
	<i>rustica</i>	<i>smaragdina</i>	<i>rustica</i>	<i>smaragdina</i>
Clonal	30	22	7	4
Sexual	9	16	9	16
Total	39	38	16	20

MLGs, Multilocus genotypes

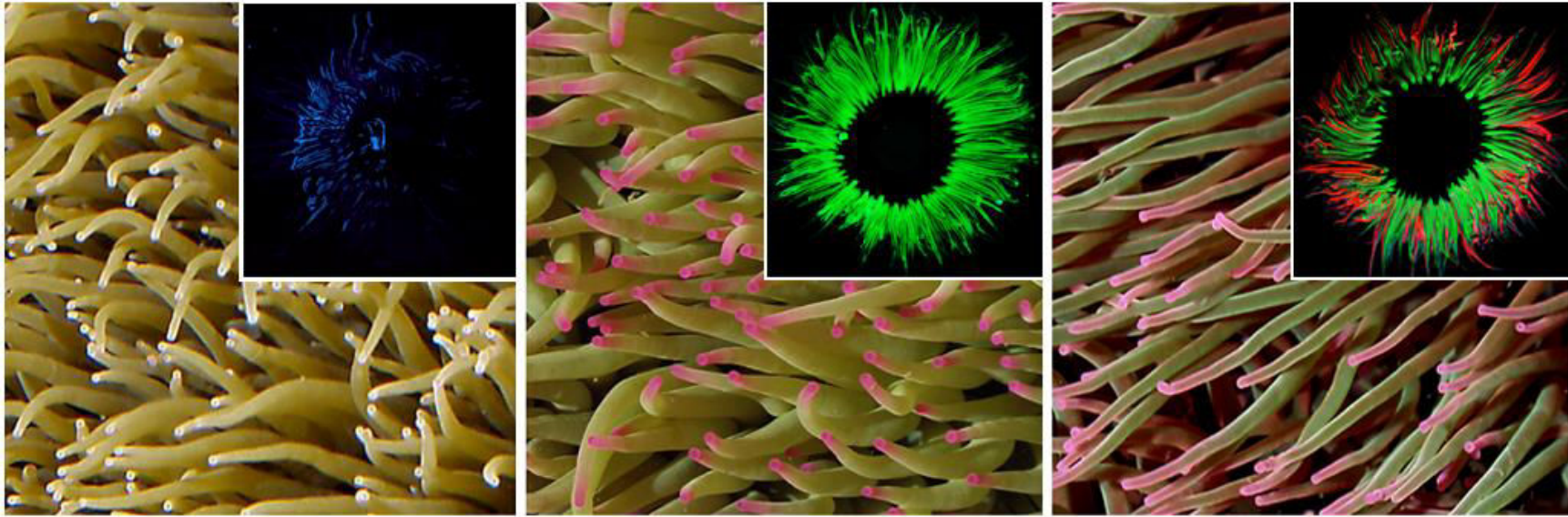


Figure 1: Colour morphs of *A. viridis* defined by the content of GFP-like proteins. The inset shows the fluorescence of the animals excited by ultraviolet light (366 nm). From left to right: var. *rustica*, var. *smaragdina*, var. *rufescens*.

Figure 2: TCS Haplotype Network of TyrK, drawn in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

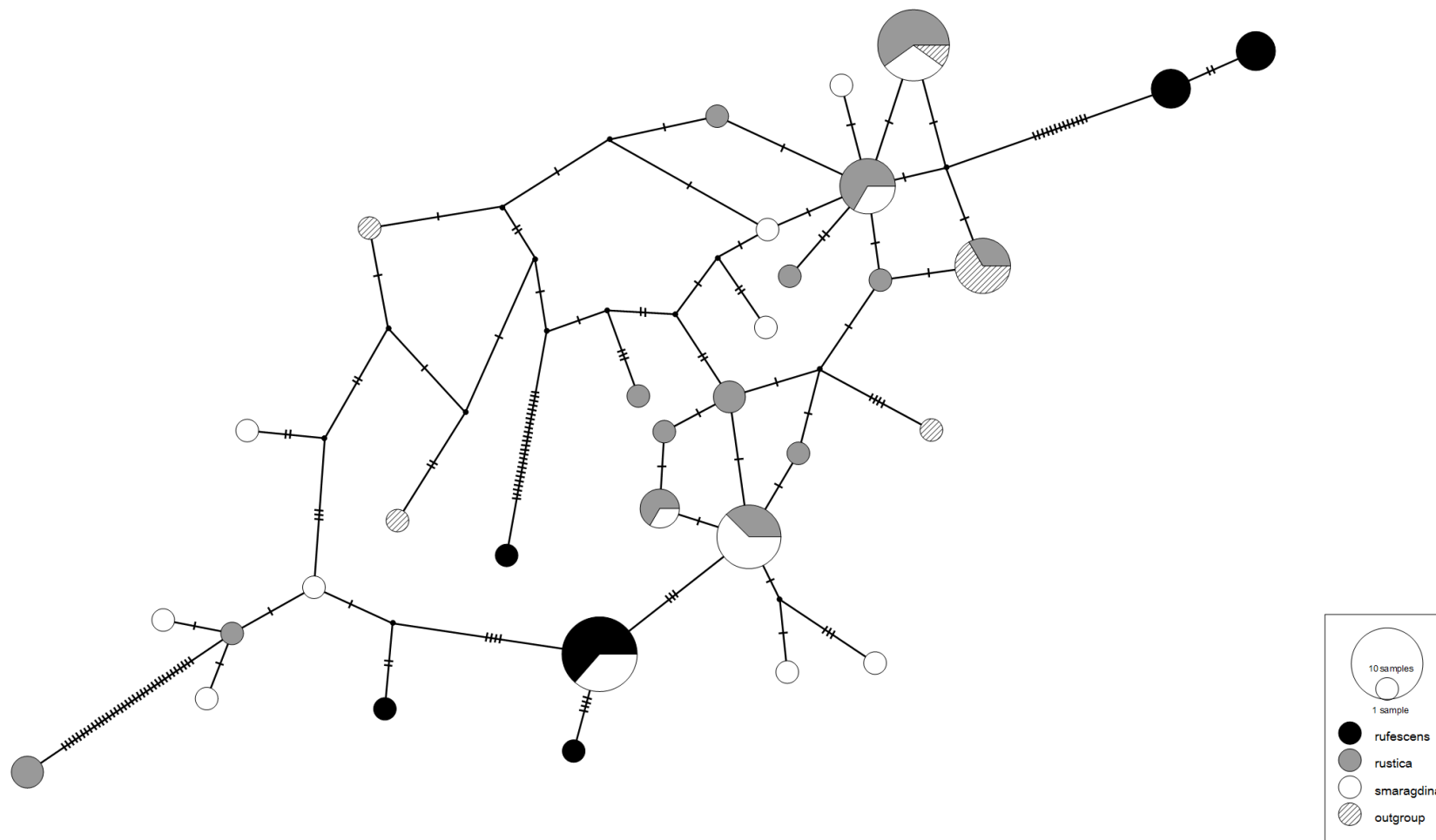


Figure 3: Haplotype Network for DUF140, drawn in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

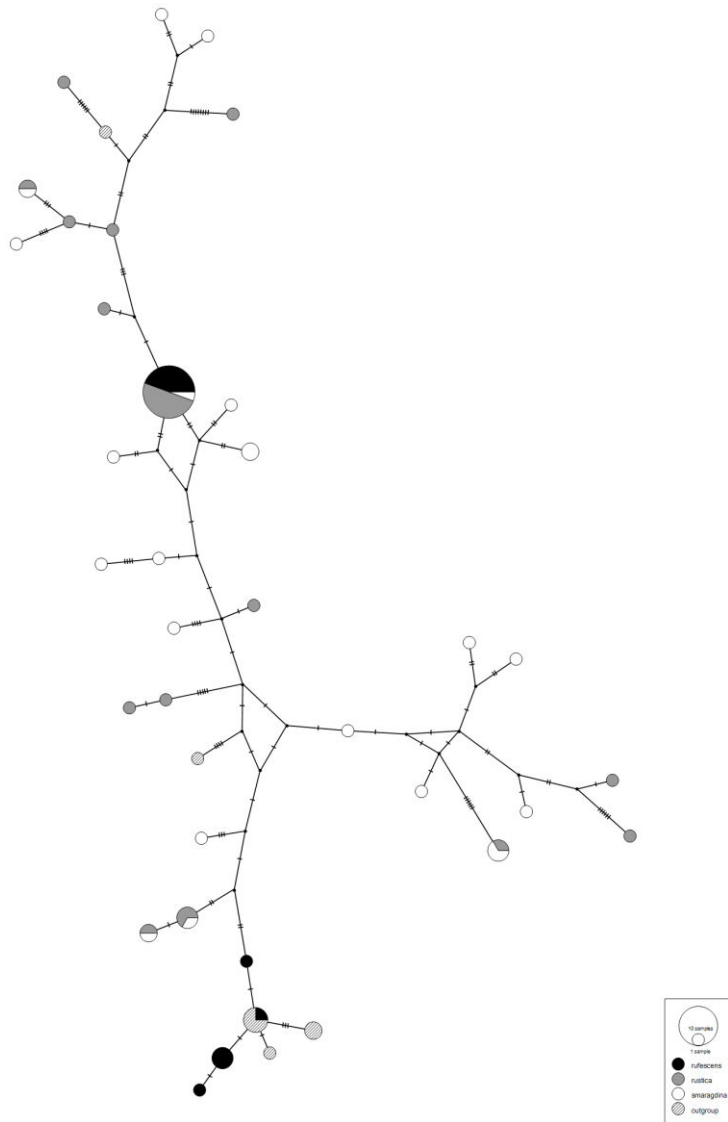


Figure 4: Haplotype Network for RNAbinding5, drawn in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

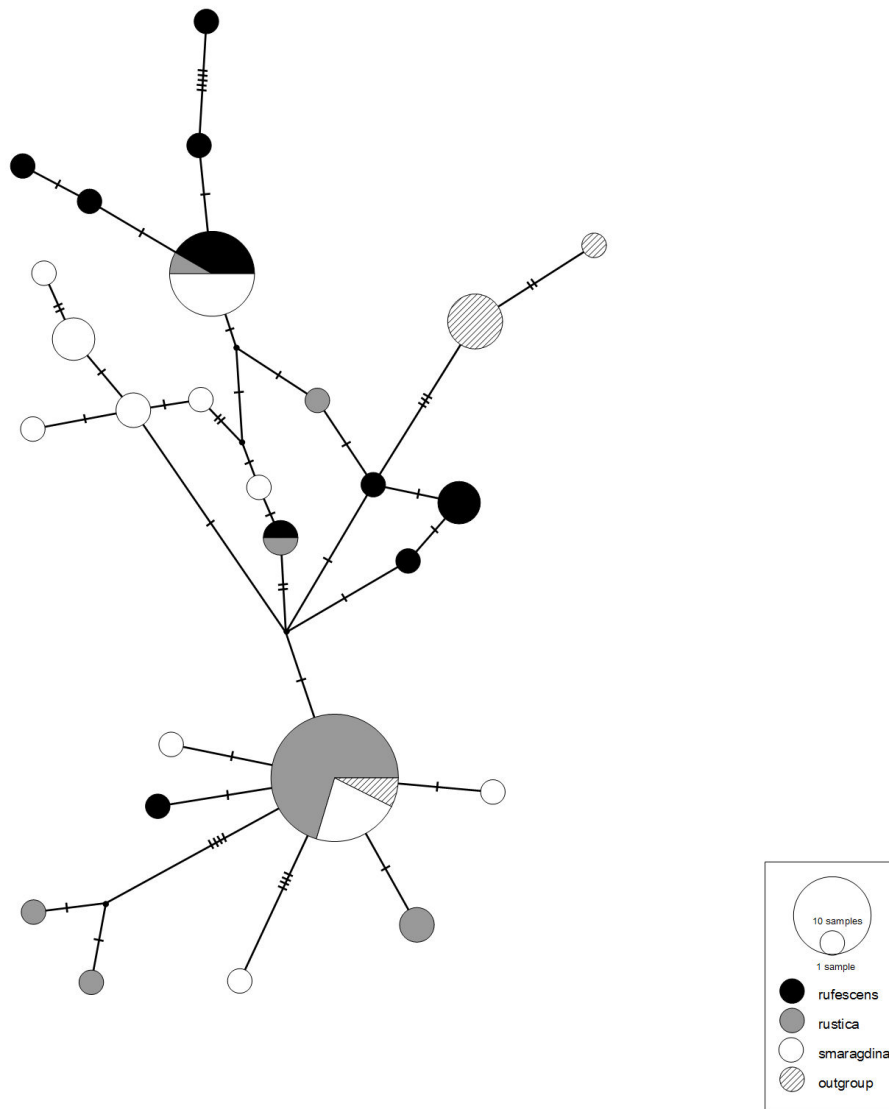


Figure 5: Haplotype Network for CA2m, drawn in PopART. Colours represent morph occurrences for each haplotype, according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

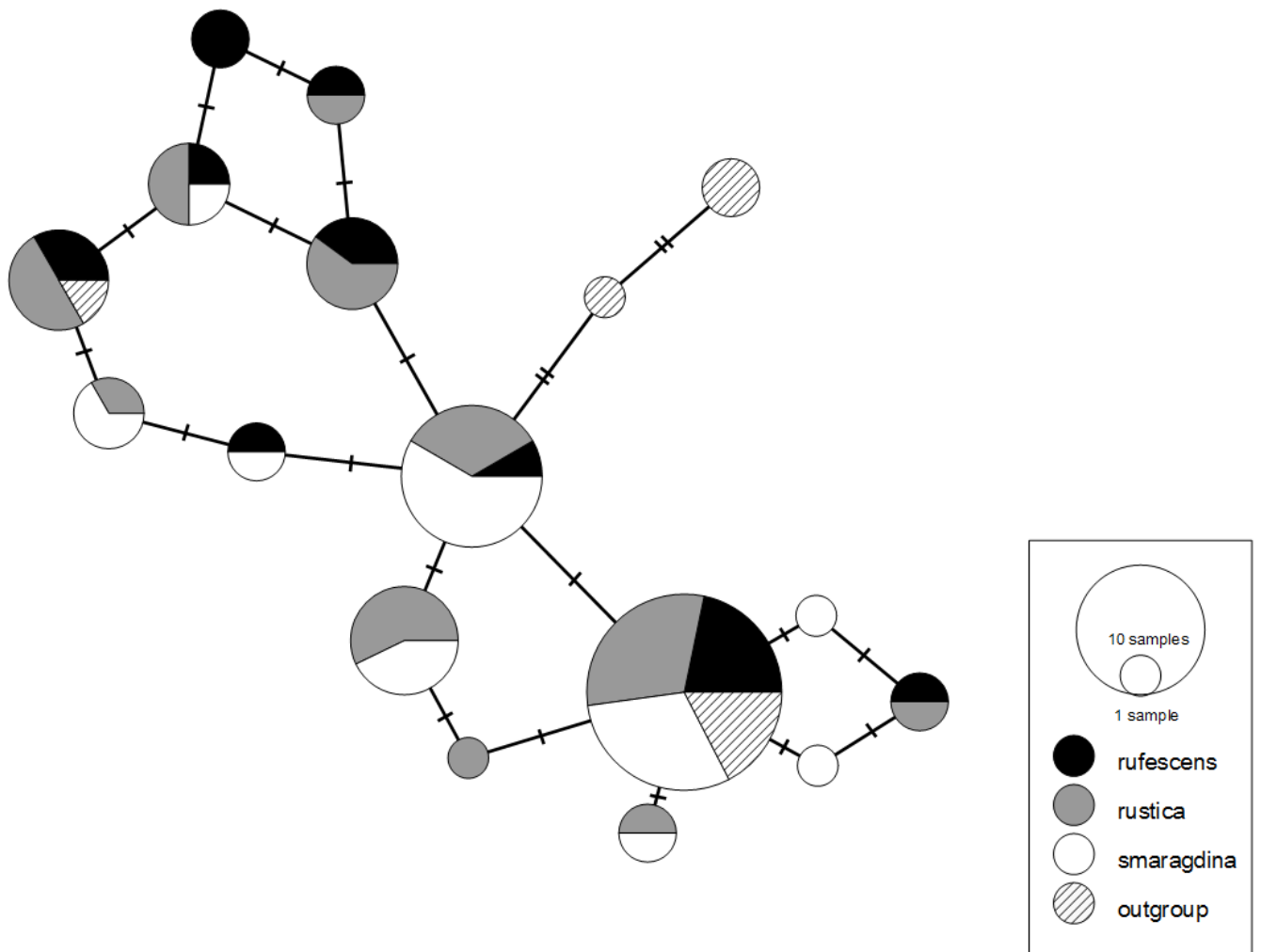
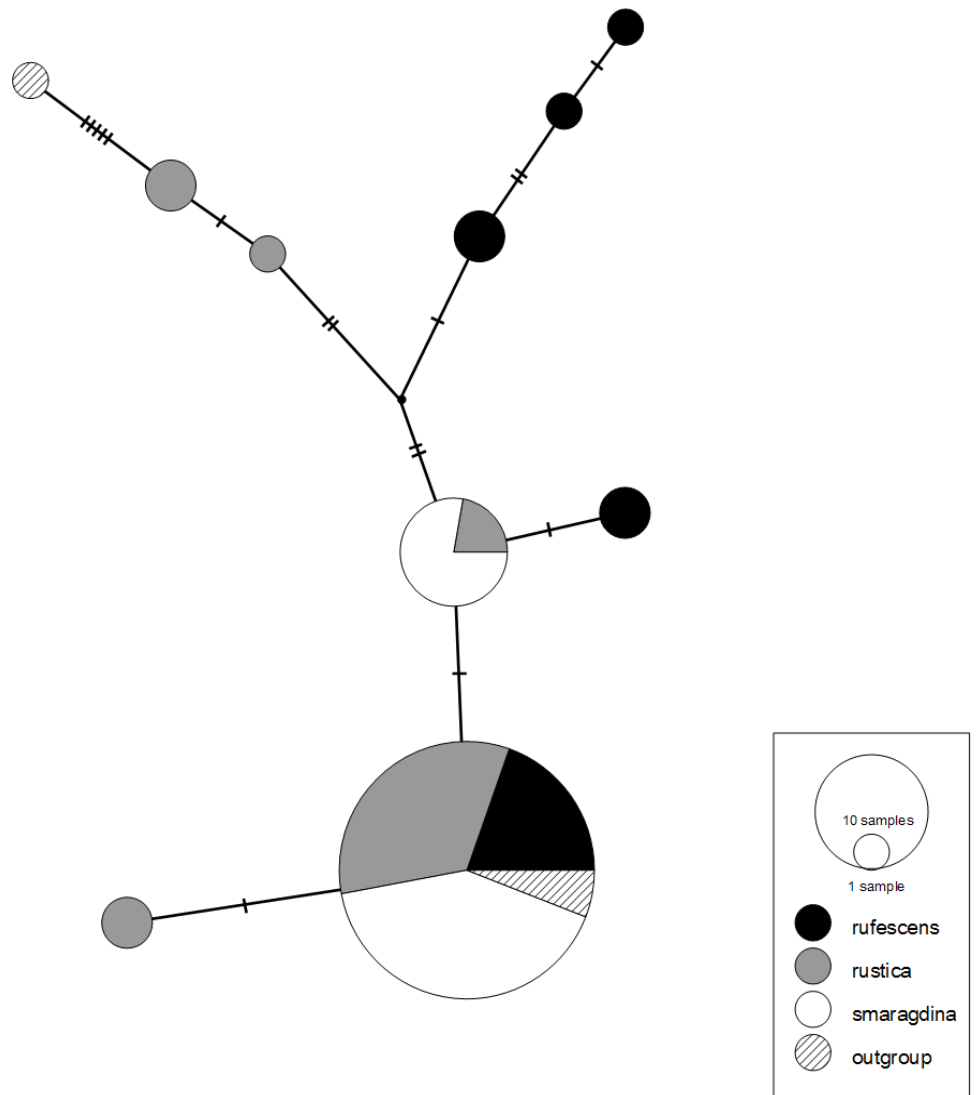


Figure 6: Haplotype network Sym32, drawn in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

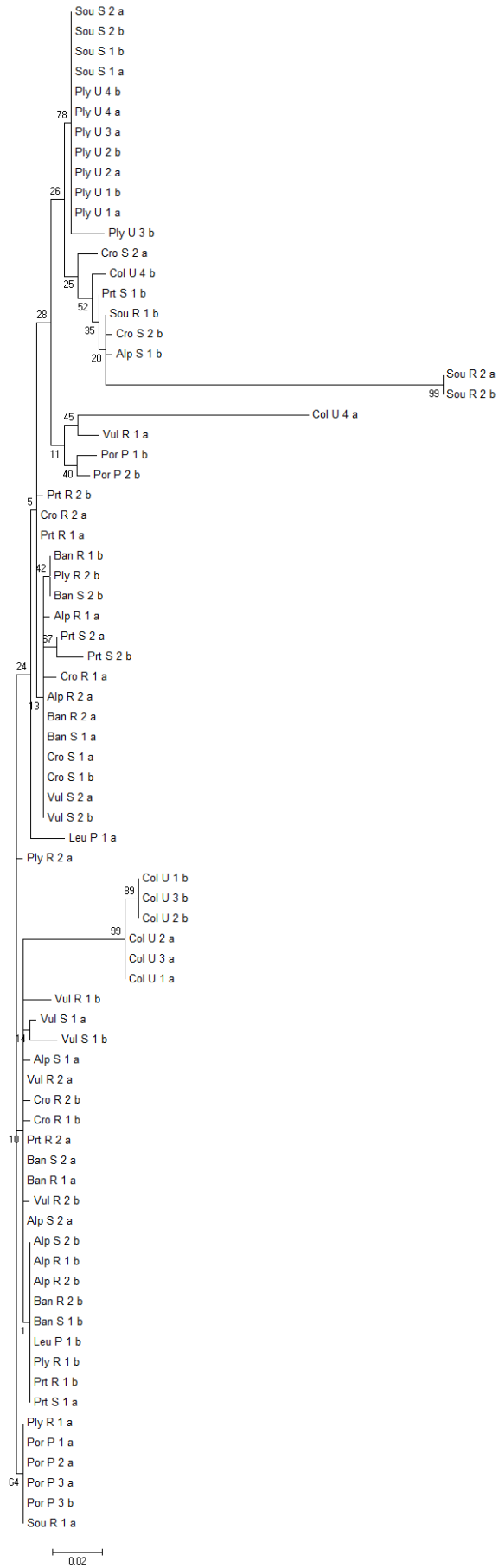


Supplementary figure S1 Maximum Likelihood phylogenies

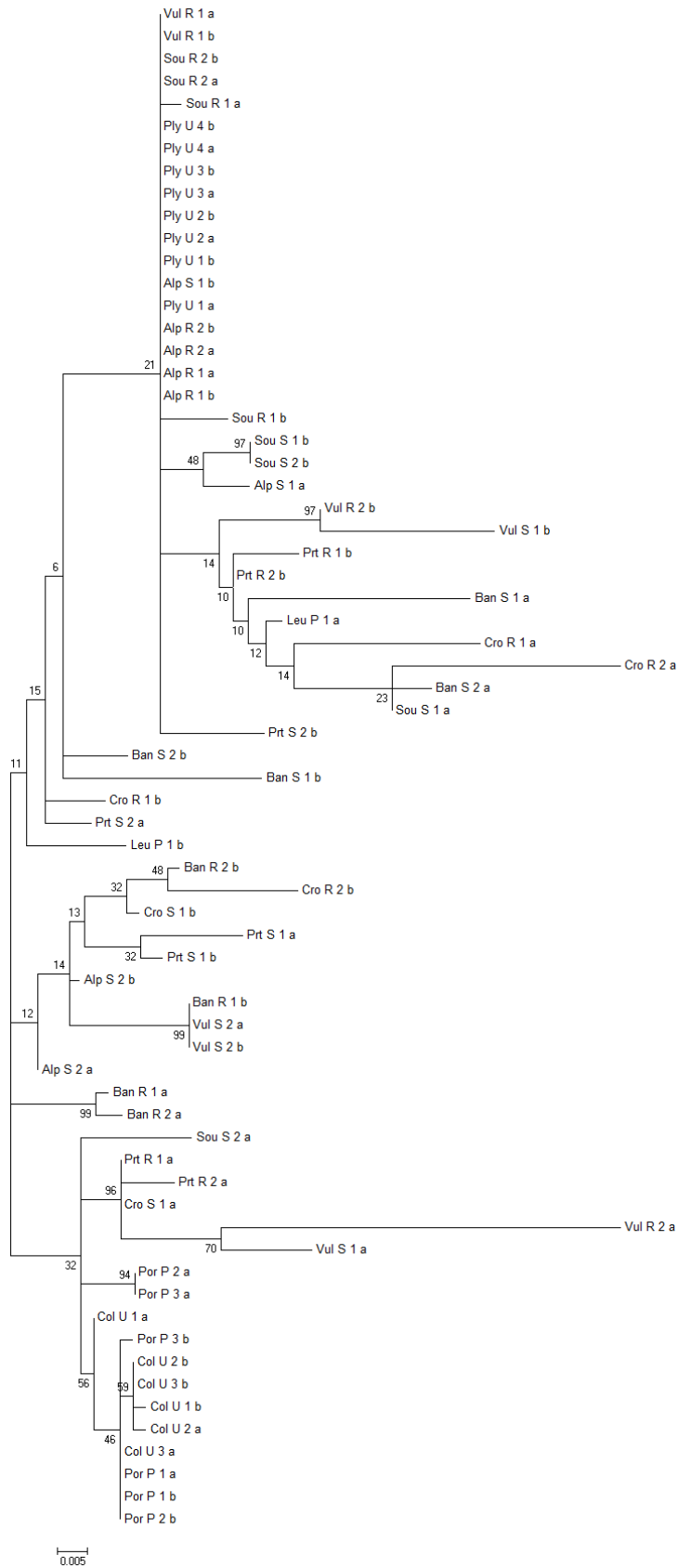
For each locus a ML tree was built using the best substitution model as defined in MEGA6. These models were JC (Sym32), JC+I (CA2m), T92+ Γ (TyrK, RNAbinding5), T92+ Γ +I (DUF140). Each allele for each individual is designated in the tree as follows: Site (3 letters, see table 1) + morph (1 letter, see table 1) + individual ID number + allele (a or b).

TyrK

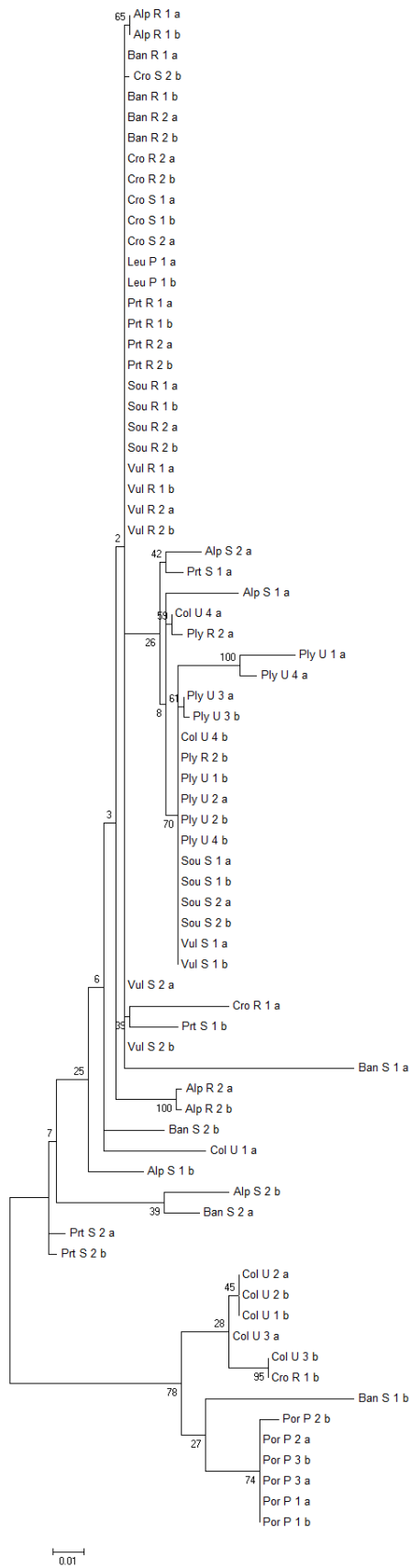
Délimitation d'espèces au sein d'*Anemonia viridis*



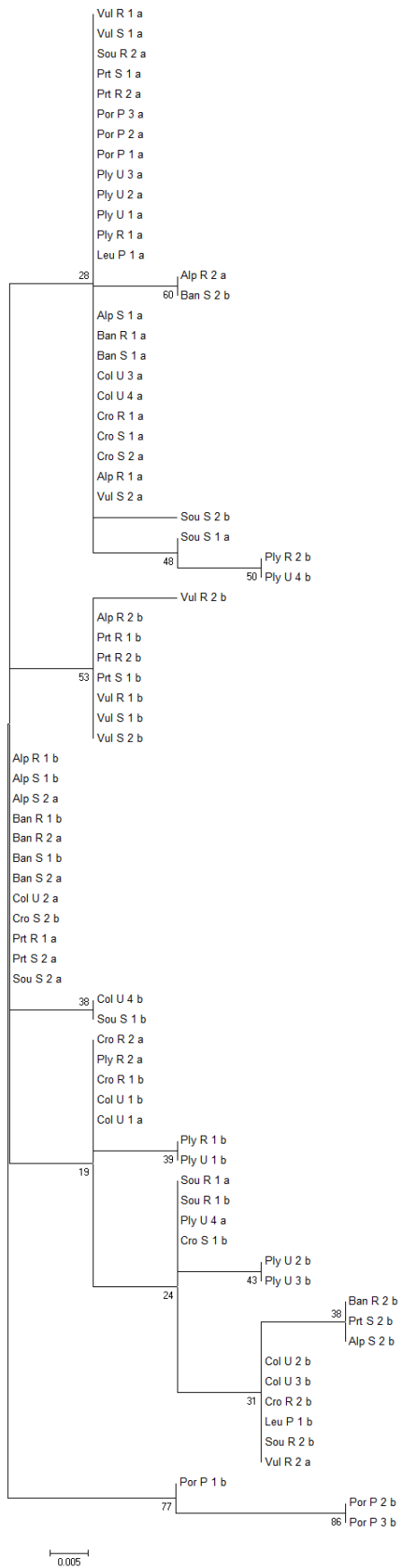
DUF140



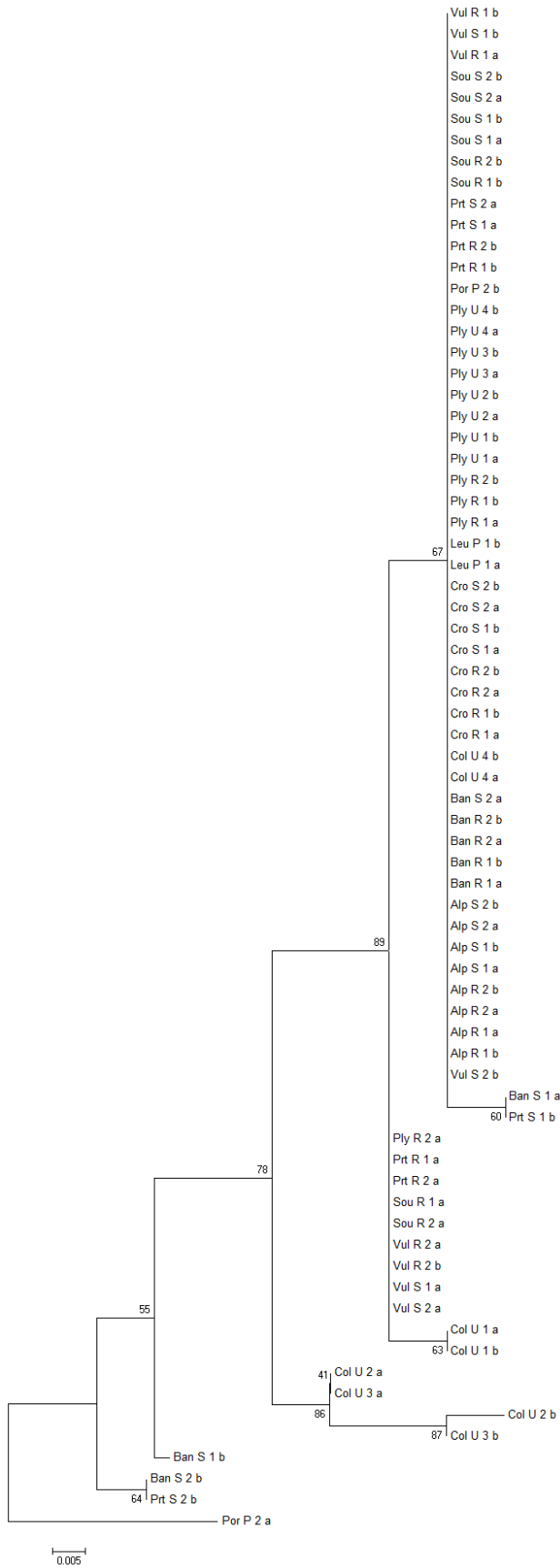
RNAbinding5



CA2m



Sym32



3.3.2 Article 2

Morphological differentiation and species delimitation within the holobiont *Anemonia viridis*

Cédric Mallien^{*1}, Barbara Porro^{*1}, Alexis Pey², Emilie Aubin¹, Richard Christen¹, Paola Furla¹⁺,
Didier Forcioli^{1+°}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Univ Antilles, Univ Nice Sophia Antipolis, CNRS, Symbiose Marine, Evolution Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (EPS - IBPS), 75005 Paris, France

² Centre National de la Recherche Scientifique, ECOMERS, Université Côte d'Azur, Nice, France

*Co-authors

+Co-contributing authors

°Corresponding author:

Email: forcioli@unice.fr

UMR 7138 EPS, Marine Symbiosis Team, Faculté des Sciences, Université Nice Sophia Antipolis, 06108 Nice cedex 02.

Colour morphs of *Anemonia viridis* are described based on the pigment protein content, one of which had been raised to the species level by some authors. However, a recent study showed that the morphs of *A. viridis* belonged to a single species using stress genes markers. We used a highly powerful RADsequencing analysis on 140 sea-anemones from the English Channel and the Mediterranean Sea to validate this species hypothesis. This polymorphism in *A. viridis* could also be due to genetic differentiation of the *Symbiodinium* populations harboured by each animal host. To estimate the influence of the symbionts on the host morph, we analysed the *Symbiodinium* ITS2 variation by targeted amplicon sequencing and an *ad hoc* analysis pipeline. No genetic differentiation among *A. viridis* colour morphs was observed, either at the animal host or the symbiont levels. However, we identified four independent geographically distributed animal host genetic lineages in *A. viridis*, that diverged also for their associated symbiont populations.

Keywords: Temperate sea anemones, *Symbiodinium* sp., RADsequencing, ITS2, Symbiosis, Genetic diversity.

Introduction

Species delimitation has long been a subject of debate (De Queiroz 2007). For example, in scleractinians species, morphological variability is often not genetically determined. In the species *Pocillopora damicornis*, ecomorphs had been described based on skeleton morphology (Veron and Pichon 1976). However, Schmidt-Roach et al. (2013) showed incongruence between morphology and the genetic markers used. Furthermore, the morphological species *Stylophora mordax* (Dana 1846) comprised in fact two independent genetic lineages, one of which was common with another morphological species *S. pistillata* (Esper 1797). (Flot et al. 2011). In actinarians, the two species of sea anemone *Actinia equina* (Linnaeus, 1767) and *Actinia fragacea* (Tugwell, 1856) are differentiated by the colour, but, the analysis of nuclear and mitochondrial sequences identified two different genetic units shared by the two morphs (Pereira et al. 2014).

Anemonia viridis (Forskål 1775) displays five colour morphs, characterised by the expression pattern of genes coding for fluorescent and non-fluorescent proteins: the three most frequent of these morphs are var. *rustica* (no detectable fluorescence and no pink tentacle apex), var. *smaragdina* (green fluorescent proteins expression and pink tentacle apices) and var. *rufescens* (green and red-orange fluorescent proteins expression and pink tentacle apices) (Wiedenmann et al. 1999, 2000a). The taxonomic nature of these morphs had been debated for a long time, and some authors raised the var. *rustica* to species level, based on allozyme differentiation evidences, differential bathymetric distribution and presumed different reproduction strategies (Bulnheim and Sauer 1984; Sauer 1986; Sauer et al. 1986). However, as recently demonstrated using exon-primed intron-crossing (EPIC) markers from stress response genes, there are not enough genetic differences among these three common morphs (var. *rustica*, *smaragdina* and *rufescens*) for them to be considered as different species (Mallien et al. 2017). However, the gene stress markers used by Mallien et al. (2017) are not standard markers for species delimitation studies and their conclusions could therefore still be debated (Bensch et al. 2002; Garvin et al. 2010).

RADsequencing (RADseq) is an efficient method to generate from hundred to thousand genetic markers for numerous individuals. Many of these loci reveal the neutral genetic diversity and can be used to describe patterns of population structure, delimit species, and investigate phylogenetic relationships (Pante et al. 2015; Ree and Hipp 2015). In the pitcher

plant mosquito for example, RADseq contributed to reveal unknown genetic structure due to recent divergent populations (Emerson et al. 2010). RADseq could then be very useful when morphological criteria or classical molecular markers are not discriminant enough, as it could be the case for many cnidarians and could therefore settle the question of the species delimitation of *A. viridis* colour morphs.

Previous studies investigating the nature of *A. viridis* morphs did not systematically consider *A. viridis* as a holobiont (*i.e.* a complex organism with associated symbionts including unicellular eukaryotes and prokaryotes). Although, two of the seven morphs described by Andres (Andres 1881) were recognized as bleached individuals from two other morphs (Wiedenmann et al. 2000b), no further exploration of the role of the symbionts in the morph differentiation was performed. An essential symbiont of *A. viridis*, is a photosynthetic dinoflagellate belonging to the genus *Symbiodinium*. In *A. viridis*, this symbiont can transfer more than 90% of its photosynthetates to the animal host (Davy et al. 1996). In addition, many studies have demonstrated that, in *A. viridis*, several physiological and biochemical adaptations led to a stable relationship between the dinoflagellate and its host (see Furla et al. 2000; Richier et al. 2003, 2005).

The *Symbiodinium* sp. associated to *A. viridis* belongs to the temperate A (or A') sub-clade (Savage et al. 2002; Visram et al. 2006). Within this sub-clade, previous studies, based on ribosomal nuclear markers, revealed a genetic diversity partially structured by the host species but also an intra-host genetic diversity (Visram et al. 2006; Forcioli et al. 2011; Casado-Amezúa et al. 2014). However, no study provided a clear view of the symbiont genetic diversity distribution at the scale of European coast and among *A. viridis* morphs. One of the markers commonly used to assess within clade diversity is the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2). In *Symbiodinium*, the ITS2 sequences characterize genetic lineages close to the species level (see Coffroth and Santos 2005; completed by Thornhill et al. 2017). Moreover, Casado-Amezúa et al. (2014) revealed genetic diversity within the temperate A sub-clade using ITS2 sequences. Identifying the composition of symbiont populations of *A. viridis* and their distribution among the host-morphs, with ITS2, could then provide a new insight on symbiont specificity and transmission mode (Fabina et al. 2012). Indeed, symbiont populations could be a driver of the morphological differentiation of *A. viridis* morphs as it is the case in other symbiotic invertebrates. A classic example of the role of the symbiont in the functional morphological variability of the holobiont is found in aphids. For example, the presence of the symbiotic bacteria *Rickettsiella* assorting with specific host genotypes induced

a green-colour (rather than brown) in the pea aphid, which results in a lower predation (Tsuchida et al. 2010). In cnidarians, it has been shown that the symbiont can have a similar role. In the coral *Madracis pharensis*, Frade et al. (2008) showed a correlation between the *Symbiodinium* sp. present in the host cells and the colour morph of the host probably due to a functional response to light.

In the present study, we proposed to validate the species delimitation study of Mallien et al. (2017), through a RADseq approach, on a broader sample encompassing Mediterranean and English Channel populations of the var. *smaragdina*, *rustica* and *rufescens* of *Anemonia viridis*. Because of the primordial role of the *Symbiodinium* endosymbiosis in *A. viridis*, we also studied the within host *Symbiodinium* diversity in relation to these three morphs, by identifying symbiont ITS2 sequence variation on the same sample.

Materials and Methods

Sampling

We sampled 177 individuals of *Anemonia viridis* belonging to the three most frequent morphs (25 var. *rufescens*, 74 var. *rustica* and 78 var. *smaragdina*) sampled from five locations (three in the Mediterranean Sea and two in the English Channel) between 2011 and 2014. To identify the morphotypes, we detected their respective diagnostic fluorescence patterns using a fluorescence torch (Tekna T6, FireDiveGear, the Netherlands). In addition, four individuals of *Paranemonia cinerea* were used as an outgroup. The sampling description is detailed in table 1 and figure S1. For each specimen, a dozen of tentacles was cut, fixed as soon as possible in 70% ethanol and preserved at -80°C until DNA extraction.

DNA extraction

All DNA extractions were processed as in Mallien et al. (2017) using a modified “salting out” protocol (Miller et al. 1992). To test for *Symbiodinium* sp. DNA influence on RADseq efficiency, we isolated symbiont-free epidermal tissue from a subset of 63 *A. viridis* samples following Richier et al. (2003) and performed DNA extraction following the same procedure. Extracted DNA concentrations were determined by Quant-it Picogreen kit (Invitrogen).

Host RADsequencing

Library preparation

Libraries were prepared following the protocol described in Etter et al. (2011) with the following modifications: (i) Individuals were classified depending on DNA quality (measured by electrophoresis of the total DNA) and *Symbiodinium sp.* contamination using primers from Santos et al (2003) and split into 9 libraries containing between 32 and 44 individuals; (ii) Libraries were constructed using a quantity of 0.6 to 1 µg of DNA per individual digested using *Pst*I-HF enzyme (New England Biolabs) and sample specific RADseq adapters were ligated; (iii) After the multiplexing step, samples were sheared for 60 seconds using the S220 Focused-ultrasonicator (Covaris); (iv) After ligation of the second RADseq adapter, a final amplification of 16 cycles was carried out for each library. Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2000 (100-bp, single read format) at MGX, Montpellier (France).

De novo RAD locus identification

Raw reads were demultiplexed, filtered and clustered with iPyRAD v0.3.41 (Eaton 2014) in the 181 initial individuals. Briefly, restriction sites and adapters were trimmed out and raw reads were regrouped under individual names using their sample specific barcode. Base mismatches were not allowed in those barcodes. The clustering threshold was set to 90%. A minimum of five individuals were needed to validate a locus and the maximum proportion of shared polymorphic sites within a locus was set to 50%. Based on locus count in all individuals, some individuals revealed to be almost unamplified and consequently discarded from the following analyses.

A second run of iPyRAD was then performed with the same parameters, excluding individuals with low locus count (less than 4000) and using a clustering threshold of 90%. This led us with a final analysed dataset of 137 *A. viridis* individuals (25 from var. *rufescens*, 48 from var. *rustica*, 64 from var. *smaragdina*) and three *P. cinerea* individuals. The iPyRAD loci were filtered using VCFTools v0.1.15 (Danecek et al. 2011) to keep only bi-allelic loci present in at least 70% of all individuals. This file was converted in R using the package SNPRelate v1.11.1 (Zheng 2012).

Symbiodinium ITS2 variation

ITS2 amplification and sequencing

To infer the genetic diversity of the *Symbiodinium* sp. populations, nuclear DNA ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) region was amplified by PCR using primers from Stat et al. (2009): the forward itsD (5'-GTGAATTGCAGAACTCCGTG-3') and the reverse its2rev2 (5'-CCTCCGCTTACTTATATGCTT-3'). PCR amplifications were performed by Access Array (FLUIDIGM) PCR and the amplicons were sequenced by MiSeq Illumina Technology (2x250bp paired-end) at the Brain and Spine Institute (ICM, Paris, France).

Genotyping of the symbiont populations

We assembled forward and reverse reads using OBITools scripts (Boyer et al. 2016). To identify the locus corresponding to each read, we aligned, using BWA MEM v0.7.12-5 (Li 2013), the assembled reads to a temperate A reference ITS2 sequence obtained in the laboratory.

To separate the real ITS2 alleles from sequencing errors in the reads which mapped to the reference, we used a three-step protocol. For the first step, we choose a threshold of 80% of identity among read sequences to cluster them. We conserved only clusters which represented more than 5% of the total number of reads to exclude the most divergent sequences. For the second step, we collected all the sequences that passed the first step and applied a clustering identity threshold of 100% to identify unique sequences. Finally, a last step was necessary to determine which unique sequence was a true ITS2 allele. For this, we considered (i) the number of hosts harbouring the unique sequence (with a minimum of two individuals) and (ii) the number of reads per host, to obtain:

$$Q_{50}(\text{reads})_i \times N_i \geq 50$$

Where $Q_{50}(\text{reads})_i$ is the median number of reads for the putative ITS2 allele i and N_i the number of hosts in which we found it.

Host species delimitation

To identify genetic lineages in *A. viridis*, we used the unlinked SNPs from iPyRAD output and analysed this dataset with SVDQuartets software from Chifman and Kubatko (2014) implemented in PAUP v4.0a152 (Swofford 1998) using default parameters. This non bayesian approach infers the relationship among quartets of taxa under a coalescent model. *P. cinerea*

individuals were identified as outgroups. We performed 500 bootstrap replicates analysis. An individual based tree was also built from the same dataset and with the same parameters to test if individuals grouped among morphs within each site.

Host genetic distance

An individual based tree was built using RAxML v8.2.4 (Stamatakis 2014). The phylip output of iPyRAD was used for the analysis with a GTRGAMMA model of evolution and 10 bootstraps. Dendroscope v3.5.9 (Huson and Scornavacca 2012) was used to visualize the output of RAxML.

Population genetic analysis

Host genetic diversity

To estimate the differentiation among morphs and sampling sites with no assumption on the type of data used, we performed a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) on the RAD loci using the package adegenet (Jombart 2008; Jombart and Ahmed 2011). The best number of genetic clusters (K) was estimated with a k-mean approach using the lowest information criteria (BIC), computed with the same package. Results were visualized using a STRUCTURE-like representation showing the probability that an individual was assigned to one of the inferred clusters (i.e. group of genetically similar individuals with no assumption about their origin).

Symbiodinium sp. genetic diversity

Because each anemone is a population of symbionts, we genotyped these populations according the presence or the absence of alleles. For each animal host, we thus obtained an AFLP-like genotype corresponding to the ITS2 alleles found in its symbiont population. Consequently, the genetic diversity in symbiont populations (expected heterozygosity) and the genetic differentiation among populations (estimated with Wright's fixation index) were computed with AFLP-surv v1.0 (Vekemans 2002; Vekemans et al. 2002).

To visualise the host-symbiont associations, especially in relation to the host's morph, geographic origin or genetic lineage, we first built a *Symbiodinium* ITS2 TCS maximum

parsimony haplotype network (Clement et al. 1999) implemented in PopART v1.7 (Leigh and Bryant 2015).

We tested the difference in the composition of symbiont populations among sea anemones depending on (i) the morph of the host, (ii) the sampling site or (iii) the host genetic lineage by PERMANOVA with the R package *vegan* (Oksanen et al. 2016). When these factors had an effect on the distribution of the genetic diversity of symbionts, we then computed pairwise PERMANOVAs between each level of the given factor with a FDR correction to avoid false positives.

Results

Genetic diversity in the animal host populations

We obtained from the host an average of 41,168 (\pm 229 SD) RAD loci per individual. After the different filtering steps, these RAD loci provided 45,499 bi-allelic SNPs shared by at least 70% of the 140 selected individuals. Among the different sampled populations, the allelic richness ranged from 0.462 to 1.135 (for the populations VulRus and BanRuf respectively; table 1). Three populations exhibited a deficit in heterozygotes (VulRus, BanRus and SteSma), with respectively H_o values of 0.007, 0.013 and 0.036 for H_e of 0.024, 0.035 and 0.073.

Genetic differentiation of the host morphs

To identify independent genetic lineages, we used SVDQuartets and represented the output as a tree (figure 1). The first split separated with high support BanRuf and all the other populations and indicated that *var. rufescens* individuals from Banyuls were as divergent as the outgroup (100% of the quartets including BanRuf anemones supported this split). In addition, two lineages were identified irrespective of the morphs, one grouping the other Banyuls individuals and the Vulcano ones, and the second grouping all populations from the English Channel and Thau. This last lineage was split in two by SVDQuartets separating English Channel populations from Thau. An additional analysis at the individual level confirmed that the populations from the English Channel and Thau were clearly split into different genetic lineages (figure S2). At population and individual levels (figure 1 and S2),

the nodes within the Banyuls/Vulcano group were less supported and the sea anemones from both locations clustered mainly together (few supported splits with a value higher than 70%, figure S2). Hence, we identified five genetic lineages in the dataset: (i) *P. cinerea*, (ii) BanRuf, (iii) English Channel (EngCh), and two main Mediterranean groups (iv) Med1 (with mostly anemones from Thau), and (v) Med2 (with mostly anemones from Banyuls and Vulcano). These five genetic lineages were mainly split by the geographic origin of the anemones, and not according to their morphs.

To measure the actual genetic differentiation among host individuals, we computed a RAxML individual tree and performed a DAPC analysis of their genetic diversity. Concerning the RAxML tree (figure 2A), the observed genetic distances among individuals were consistent with the lineage delimitations. First of all, there was a clear cut between individuals from the English Channel, and the Mediterranean Sea. Within the Mediterranean Sea, three groups were readily identifiable and globally corresponded to the genetic lineages identified with SVDQuartets (Med1, Med2 and BanRuf – each with a bootstrap value of 100). Again, the morphs var. *smaragdina* and *rustica* were not monophyletic, irrespective of their geographic origin. However, the var. *rufescens* and *rustica* from Plymouth were well differentiated (bootstrap value of 100). Three *smaragdina* from Banyuls branched with the EngCh lineage and not with the Med1 as was expected from the SVDQuartets individual analysis (figure S2). The other anemones from Banyuls attributed by SVDQuartets to the Med1 lineage and the Thau anemones attributed to the Med2 lineage retained their grouping in the RAxML tree.

The membership of the anemones to a consistent group was less clear in the DAPC (figure 2B). For this last analysis, we determined $K = 8$ as the optimal number of clusters in the dataset based on the BIC value (figure S3A). However, the DAPC analysis failed to detect any differences among most of our samples, that were grouped in a single cluster (inferred cluster 2 in figure S3B). Two clusters corresponded exclusively to the BanRuf and PlyRuf populations respectively, which could indicate differentiated genetic pools for the var. *rufescens* (corresponding to the inferred cluster 1 and 8 in the figure S3B). The var. *rustica* individuals from Plymouth also belonged for the most part to isolated clusters as well (clusters 3 and 7, figure S3B). The var. *smaragdina* individuals from Banyuls were split into four different clusters, which made BanSma the most diversified population (as measured with allelic richness in the table 1). The DAPC analysis also singled out the Thau individuals from the Med2 lineage (figure 2B) that did not belong to the same cluster than the majority of Thau individuals (that belonged to the Med1 lineage).

Influence of the symbiont on morphs differentiation

We identified 92 ITS2 alleles from the populations of *A. viridis* symbionts (table 2). Most of the sampled populations harboured more than half of this allelic diversity: between 54 and 90 alleles were present within each population (table 1). Similarly, each anemone harboured on average 32.4 ± 1.6 ITS2 alleles. Individuals from Banyuls appeared more differentiated. Many alleles were found in this population (46 to 72 alleles) but each anemone from Banyuls on the average contained only seven to 23 alleles. *P. cinerea* harboured less alleles than *A. viridis* (ten alleles from three individuals).

As shown on the ITS2 haplotype network, all the morphs shared the same allelic diversity and there was no ITS2 allele specific to one morph (figure 3A). Furthermore, there was no private allele specific to any of the genetic lineages identified at the host level (figure 3B). There was no geographically diagnostic allele either, as shown by the distribution of the geographical origins in the haplotype network (figure S4), except at Vulcano, where we found a unique private allele.

The main factors shaping the distribution of *Symbiodinium* diversity among the anemones (host morph, geography, SVD lineage) were tested using PERMANOVA. A statistically significant effect of the geographical origin of the anemones and of the host genetic lineage has been found (with a p-value < 0.001) while there was no effect of the morphs of the anemones (table 3). More specifically, the anemones from Banyuls harboured a different composition of symbionts compared to the other sampled populations (p-value from 0.000019 to 0.000444, table S2). Concerning the genetic host lineages (table 4), the two main Mediterranean lineages had significantly different compositions of symbiont populations (Med1 vs Med2, p-value = 0.006). In addition, the symbiont populations from the English Channel had a different composition compared to all other symbiont populations (p-values from <0.0001 to 0.003, table 4). In the PERMANOVA there was a significant combined effect of lineages x morphs (table 3). Indeed, in the Med2 lineage but not in the others, the morphs var. *rustica* and var. *smaragdina* had significantly different symbiotic compositions (FDR adjusted p-value = 0.004). Despite the lack of private alleles, *P. cinerea* symbiont populations were among the most differentiated (table S1).

Discussion

Species identification in cnidarians is challenging especially because of their high morphological plasticity (Flot et al. 2011; Schmidt-Roach et al. 2013; Pereira et al. 2014). The different colour morphs of the sea anemone *Anemonia viridis* could either be produced by phenotypic plasticity or, as suggested by the literature (Sauer et al. 1986), correspond to divergence within a species complex. To decipher the taxonomic status of the *A. viridis* colour morphs, a previous work had analysed the genetic differentiation of Mediterranean and English Channel populations based on 5 stress genes markers. By using RADseq, a proven technique for species delimitation (Ree and Hipp 2015), we confirmed and extended the previous identification of independent genetic lineages within *A. viridis*.

Our RADseq analyses confirmed the result of Mallien et al. (2017): the morphs of *A. viridis* are not independent genetic lineages. The five stress gene markers were therefore discriminant enough to show that var. *rustica* was not an independent species. This confirms that the use of a small number of loci under selection is sufficient to test species hypothesis (as proposed by Bensch et al. 2002; and Garvin et al. 2010). However, the RADseq approach proved to be more powerful in this instance as it detected independent genetic lineages within *A. viridis* that were not found with the stress genes markers.

As already suggested by Mallien et al. (2017), we detected a clear split between English Channel and Mediterranean anemones using RAD loci. In fact, we were even able to identify four independent genetic lineages within *A. viridis*: EngCh (English Channel anemones), BanRuf (*rufescens* from Banyuls), Med1 (mostly Thau anemones), and Med2 (mostly Banyuls and Vulcano anemones) (figure 1). However, six individuals from Banyuls populations grouped in Med1 and three individuals from Thau grouped in Med2 (figure 2A). This was probably indicative of an exchange of migrants between the two genetic Mediterranean lineages. Using these individuals, it may be possible to assess the level of introgression between these two lineages and thus to precise the strength of isolation between them.

As five genetic clusters were found by DAPC in Banyuls, we visibly sampled disconnected genetic groups and revealed a strong micro-structure within this locality (figure 2B). The var. *smaragdina* from Banyuls were split among four DAPC clusters. BanRuf individuals were actually differentiated from all the other anemones from the Mediterranean Sea (figure 2B and

table S1), a situation already observed by Mallien et al. (2017) for the var. *rufescens* anemones from the nearby locality of Collioure. Therefore, var. *rufescens* individuals formed a genetically differentiated group within the North Western Mediterranean basin as divergent as the outgroup *P. cinerea*. This group could belong to an unsampled divergent genetic pool from the Northern coast of Africa or from the Atlantic Ocean. All these results show that the Mediterranean coast around Banyuls harboured highly diverse *A. viridis* populations. This strong differentiation among the animal hosts from Banyuls may explain the higher variance in the composition of their symbiont populations (each Banyuls anemone harboured only a small portion of the allelic diversity from this site).

No genetic differentiation among the morphs was found at the animal host level. However, in cnidarians, symbiont diversity can be linked to morphological variation at the holobiont level (Frade et al. 2008). We therefore tested the role of the symbiont diversity in the *A. viridis* morph differentiation. Our analysis of ITS2 sequences from the symbionts of *A. viridis* individuals allowed the identification of 92 ITS2 alleles. We cannot exclude that some of these alleles are in fact intragenomic variants. However, we filtered the ITS2 unique sequences on their abundance, and we thus removed sequences that were underrepresented in our dataset. This removed not only the background sequencing noise but also rare intragenomic variants that are not found in many individuals. This implies that the genetic structure we revealed was not to an effect of random detection of rare intragenomic variants and reflect actually the different genetic compositions of symbiont populations.

Contrary to what Frade et al. (2008) observed in *Madracis pharensis*, in *A. viridis*, the genetic diversity of the symbionts was not correlated to the host morphs. Even the private ITS2 allele from Vulcano was found in both the var. *rustica* and *smaragdina* morphs. Thus, the morphs shared a same symbiotic genetic diversity at the ITS2 level. However, we cannot exclude that an association between the animal host morphs and their symbiont population could still be revealed by assessing the symbiont genetic diversity at a finer evolutionary scale, for example with microsatellite markers. Microsatellite differentiated *Symbiodinium* strains could be at the origin of the functional divergence among the *A. viridis* host morphs suggested by their bathymetric distribution (Wiedenmann et al. 1999). Indeed, Howells et al. (2012) showed that microsatellite differentiated *Symbiodinium* strains conferred different thermotolerance patterns to the holobiont they were transferred to. However, we did detect differentiated symbiotic compositions already at the ITS2 level among the host lineages (table 3). As each

of these lineages harboured several morphs such differentiation at the microsatellite level would need to occur independently several times. The differentiation in the symbiotic composition we detected at the ITS2 level among the morphs within the Med2 lineage could be indicative of such a local differentiation. However, we cannot exclude that it was rather because the Med2 lineage comprised samples from many different localities.

Geographic origin was the main structuring factor of *Symbiodinium* genetic diversity, as this diversity was mostly correlated to the host SVDQuartets genetic lineages (table 3) that strongly overlapped with the host geographical origin. This could indicate that each genetic lineage had evolved with its own cortege of symbionts. Using the ThaSma individuals belonging to the Med2 lineage, it could be possible to compare their symbiotic composition to the symbiotic composition of the lineage they belong to and of the lineage of their neighbours (Med1). This would allow to test for horizontal transfer of *Symbiodinium* in *A. viridis*.

Looking at the large ribosomal subunit sequence, Forcioli et al. (2011) detected host-specific alleles in the symbionts from *A. viridis* and from the gorgonian *Eunicella singularis*. The ten ITS2 alleles found in *P. cinerea* symbionts were all shared by *A. viridis* symbionts. The mean number of alleles per animal host was lower in *P. cinerea* (table1). This could reflect a less diverse symbiont population in this species.

The question ‘*Why so many different colour morphs?*’ asked by Mallien et al. (2017) still remains. The photoprotective functions of fluorescent proteins (Salih et al. 2000) can explain the bathymetric distribution of the morphs (Gittins et al. 2015), or the consequence of a local plastic response at the larval settlement and development canalization (Zamer and Mangum 1979; Kawecki and Ebert 2004). In any case, with this study, we can rule out the implication of *Symbiodinium* sp. in the morphological variation of *A. viridis*.

Figure legends

Figure 1: Non bayesian species delimitation among host morphs (SVDQuartets). The values on the tree show the proportion of computed quartets, which were consistent with each node. The coloured bars on the right side correspond to the five identified genetic lineages (i) *P. cinerea* (black), (ii) BanRuf (green), (iii) English Channel (EngCh, purple), (iv) Med1 (yellow), (v) Med2 (orange).

Figure 2: Animal host RAD differentiation at the individual (RAxML tree) and population (DAPC) levels. (a) Maximum likelihood phylogeny of the 137 *A. viridis* individuals and three *P. cinerea* individuals using RAxML with GTRGAMMA model of evolution and 10 bootstrap replicates. Support values at the nodes are shown if equal or superior to 50%. For each individual, the origin is coded by colour (red: Vulcano, orange: Thau, green: Banyuls, blue: Plymouth, pink: Southend and black: *P. cinerea* outgroup) and its morph by symbol (square: *A. viridis* var. *rufescens*, triangle: *A. viridis* var. *rustica*, circle: *A. viridis* var. *smaragdina*, diamond: *P. cinerea* outgroup). The coloured bars on the side of the tree correspond to the five identified genetic lineages (i) *P. cinerea* (black), (ii) BanRuf (green), (iii) English Channel (EngCh, purple), (iv) Med1 (yellow), (v) Med2 (orange). (b) DAPC Structure-like analysis on the same individuals with an optimal K of eight clusters, showing probability membership to each cluster for each individual. Clusters are identified by colours. On RAxML and DAPC results, the black arrows point to the anemones from Banyuls attributed by SVDQuartets to the Med1 lineage and to the Thau anemones attributed to the Med2 lineage.

Figure 3: TCS maximum parsimony network of the ITS2 symbiont haplotypes. The networks were computed with PopART. Each circle represents an allele and its size is proportional to the number of host individuals with this allele. Substitution events are represented by bars on the edges. a) Distribution of the animal host morphs among the *Symbiodinium* ITS2 haplotypes. b) Distribution of the animal host lineages among the *Symbiodinium* ITS2 haplotypes.

References

- Andres A (1881) Interno alla scissiparità delle attinie.
- Bensch S, Åkesson S, Irwin DE (2002) The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. *Mol Ecol* 11:2359–2366.
- Boyer F, Mercier C, Bonin A, et al (2016) OBITOOLS: a UNIX -inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour* 16:176–182. doi: 10.1111/1755-0998.12428
- Bulnheim HP, Sauer KP (1984) *Anemonia sulcata*-two species? Genetical and ecological evidence. *Verhandlungen Dtsch Zool Ges* 77:264.
- Casado-Amezúa P, Machordom A, Bernardo J, González-Wangüemert M (2014) New insights into the genetic diversity of zooxanthellae in Mediterranean anthozoans. *Symbiosis* 63:41–46. doi: 10.1007/s13199-014-0286-y
- Chifman J, Kubatko L (2014) Quartet Inference from SNP Data Under the Coalescent Model. *Bioinformatics* 30:3317–3324. doi: 10.1093/bioinformatics/btu530
- Clement M, Posada D, Crandall K (1999) TCS: A computer program to estimate gene genealogies.
- Coffroth MA, Santos SR (2005) Genetic Diversity of Symbiotic Dinoflagellates in the Genus *Symbiodinium*. *Protist* 156:19–34. doi: 10.1016/j.protis.2005.02.004
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, et al (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27:2156–2158. doi: 10.1093/bioinformatics/btr330
- Davy SK, Lucas IAN, Turner JR (1996) Carbon budgets in temperate anthozoan-dinoflagellate symbioses. *Mar Biol* 126:773–783.
- De Queiroz K (2007) Species Concepts and Species Delimitation. *Syst Biol* 56:879–886. doi: 10.1080/10635150701701083
- Eaton DAR (2014) PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 30:1844–1849. doi: 10.1093/bioinformatics/btu121
- Emerson KJ, Merz CR, Catchen JM, et al (2010) Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 107:16196–16200. doi: 10.1073/pnas.1006538107
- Etter PD, Preston JL, Bassham S, et al (2011) Local De Novo Assembly of RAD Paired-End Contigs Using Short Sequencing Reads. *PLOS ONE* 6:e18561. doi: 10.1371/journal.pone.0018561
- Fabina NS, Putnam HM, Franklin EC, et al (2012) Transmission Mode Predicts Specificity and Interaction Patterns in Coral-*Symbiodinium* Networks. *PLoS ONE* 7:e44970. doi: 10.1371/journal.pone.0044970
- Flot J-F, Blanchot J, Charpy L, et al (2011) Incongruence between morphotypes and genetically delimited species in the coral genus *Stylophora*: phenotypic plasticity,

- morphological convergence, morphological stasis or interspecific hybridization? *BMC Ecol* 11:22.
- Forcioli D, Merle P, Caligara C, et al (2011) Symbiont diversity is not involved in depth acclimation in the Mediterranean Sea whip *Eunicella singularis*. *Mar Ecol Prog Ser* 439:57–71. doi: 10.3354/meps09314
- Frade PR, Englebert N, Faria J, et al (2008) Distribution and photobiology of *Symbiodinium* types in different light environments for three colour morphs of the coral *Madracis pharensis*: is there more to it than total irradiance? *Coral Reefs* 27:913–925. doi: 10.1007/s00338-008-0406-3
- Furla P, Galgani I, Durand I, Allemand D (2000) Sources and mechanisms of inorganic carbon transport for coral calcification and photosynthesis. *J Exp Biol* 203:3445–3457.
- Garvin MR, Saitoh K, Gharrett AJ (2010) Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review: Invited technical review. *Mol Ecol Resour* 10:915–934. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02891.x
- Gittins JR, D'Angelo C, Oswald F, et al (2015) Fluorescent protein-mediated colour polymorphism in reef corals: multicopy genes extend the adaptation/acclimatization potential to variable light environments. *Mol Ecol* 24:453–465. doi: 10.1111/mec.13041
- Howells EJ, Beltran VH, Larsen NW, et al (2012) Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nat Clim Change* 2:116–120. doi: 10.1038/nclimate1330
- Huson DH, Scornavacca C (2012) Dendroscope 3: An Interactive Tool for Rooted Phylogenetic Trees and Networks. *Syst Biol* 61:1061–1067. doi: 10.1093/sysbio/sys062
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24:1403–1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129
- Jombart T, Ahmed I (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27:3070–3071. doi: 10.1093/bioinformatics/btr521
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecol Lett* 7:1225–1241. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x
- Leigh JW, Bryant D (2015) popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6:1110–1116. doi: 10.1111/2041-210X.12410
- Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM.
- Mallien C, Porro B, Zamoum T, et al (2017) Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria). *Syst Biodivers*. doi: Draft

- Miller D, Brown BE, Sharp VA, Nganro N (1992) Changes in the expression of soluble proteins extracted from the symbiotic anemone *Anemonia viridis* accompany bleaching induced by hyperthermia and metal stressors. *J Therm Biol* 17:217–223. doi: 10.1016/0306-4565(92)90058-N
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, et al (2016) *vegan*: Community Ecology Package.
- Pante E, Abdelkrim J, Viricel A, et al (2015) Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity* 450–459.
- Pereira AM, Brito C, Sanches J, et al (2014) Absence of consistent genetic differentiation among several morphs of *Actinia* (Actiniaria: Actiniidae) occurring in the Portuguese coast. *Zootaxa* 3893:595. doi: 10.11646/zootaxa.3893.4.9
- Pochon X, Pawlowski J, Zaninetti L, Rowan R (2001) High genetic diversity and relative specificity among Symbiodinium-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Mar Biol* 139:1069–1078. doi: 10.1007/s002270100674
- Ree RH, Hipp AL (2015) Inferring phylogenetic history from restriction site associated DNA (RADseq). -*Gener Seq Plant Syst E Hörandl MS Appelhans* 181–204.
- Richier S, Furla P, Plantivaux A, et al (2005) Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *J Exp Biol* 208:277–285. doi: 10.1242/jeb.01368
- Richier S, Merle P-L, Furla P, et al (2003) Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 1621:84–91. doi: 10.1016/S0304-4165(03)00049-7
- Salih A, Larkum A, Cox G, et al (2000) Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408:850–853. doi: 10.1038/35048564
- Santos SR, Gutierrez-Rodriguez C, Coffroth MA (2003) Phylogenetic Identification of Symbiotic Dinoflagellates via Length Heteroplasmy in Domain V of Chloroplast Large Subunit (cp23S) - Ribosomal DNA Sequences. *Mar Biotechnol* 5:130–140. doi: 10.1007/s10126-002-0076-z
- Sauer KP (1986) Strategien zeitlicher und räumlicher Einnischung. In: *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*. Fischer, pp 11–30
- Sauer KP, Müller M, Weber M (1986) Alloimmune memory for glycoprotein recognition molecules in sea anemones competing for space. *Mar Biol* 92:73–79.
- Savage AM, Goodson MS, Visram S, et al (2002) Molecular diversity of symbiotic algae at the latitudinal margins of their distribution: dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* in corals and sea anemones. *Mar Ecol Prog Ser* 244:17–26.
- Schmidt-Roach S, Lundgren P, Miller KJ, et al (2013) Assessing hidden species diversity in the coral *Pocillopora damicornis* from Eastern Australia. *Coral Reefs* 32:161–172. doi: 10.1007/s00338-012-0959-z
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033

- Stat M, Pochon X, Cowie R, Gates R (2009) Specificity in communities of *Symbiodinium* in corals from Johnston Atoll. *Mar Ecol Prog Ser* 386:83–96. doi: 10.3354/meps08080
- Swofford DL (1998) Phylogenetic analysis using parsimony (paup). Sunderland, MA: Sinauer Associates
- Thornhill DJ, Howells EJ, Wham DC, et al (2017) Population genetics of reef coral endosymbionts (*Symbiodinium*, Dinophyceae). *Mol Ecol* 26:2640–2659. doi: 10.1111/mec.14055
- Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, et al (2010) Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color. *Science* 330:1102–1104. doi: 10.1126/science.1195463
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV 1.0: A program for genetic diversity analysis with AFLP (and RAPD) population data. Laboratoire de Génétique et d'Ecologie Végétales, Université Libre de Bruxelles
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldán-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol Ecol* 11:139–151. doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01415.x
- Veron J (JEN), Pichon M (m) (1976) Scleractinia of eastern Australia. Part I : Families Thamnasteriidae, Astrocoeniidae, Pocilloporidae. Australian Government Publishing Service
- Visram S, Wiedenmann J, Douglas AE (2006) Molecular diversity of symbiotic algae of the genus *Symbiodinium* (Zooxanthellae) in cnidarians of the Mediterranean Sea. *J Mar Biol Assoc UK* 86:1281. doi: 10.1017/S0025315406014299
- Wiedenmann J, Elke C, Spindler KD, Funke W (2000a) Cracks in the β -can: fluorescent proteins from *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actinaria). *Proc Natl Acad Sci* 97:14091–14096.
- Wiedenmann J, Kraus P, Funke W, Vogel W (2000b) The relationship between different morphs of *Anemonia* aff. *sulcata* evaluated by DNA fingerprinting (Anthozoa, Actinaria). *Ophelia* 52:57–64. doi: 10.1080/00785236.1999.10409419
- Wiedenmann J, Röcker C, Funke W (1999) The morphs of *Anemonia* aff. *sulcata* (Cnidaria, Anthozoa) in particular consideration of the ectodermal pigments. In: Pfadenhauer J (ed) *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*. Spektrum Akademischer Verlag, pp 497–503
- Zamer WE, Mangum CP (1979) Irreversible nongenetic temperature adaptation of oxygen uptake in clones of the sea anemone *Haliplanella luciae* (verrill). *Biol Bull* 157:536–547. doi: 10.2307/1541036
- Zheng X (2012) SNPRelate: parrallel computing toolset for genome-wide association studies.

Tables

Table 1: Host and symbiont genetic diversities

Populations			Host				Symbionts			
Site	Morphs	Name	N	Ar	Ho	He	N	Number of ITS2 alleles	Gene diversity	ITS2 alleles/anemone (mean \pm sd)
Vulcano	<i>rustica</i>	VulRus	6	0.462	0.007	0.024	7	85	0.449	44.9 \pm 4.7
	<i>smaragdina</i>	VulSma	2	0.780	0.005	0.004	2	41	0.334	61.5 \pm 13.4
Thau	<i>rustica</i>	ThaRus	8	0.788	0.036	0.052	8	85	0.421	32.9 \pm 4.7
	<i>smaragdina</i>	ThaSma	24	1.004	0.064	0.081	18	90	0.431	34.2 \pm 4.2
Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	13	1.135	0.074	0.086	4	43	0.236	14.8 \pm 6
	<i>rustica</i>	BanRus	6	0.529	0.013	0.035	6	72	0.332	23 \pm 4.2
	<i>smaragdina</i>	BanSma	25	1.130	0.082	0.087	12	54	0.125	7.3 \pm 2.5
Plymouth	<i>rufescens</i>	PlyRuf	12	1.037	0.045	0.044	12	88	0.447	43.2 \pm 4.3
	<i>rustica</i>	PlyRus	15	1.090	0.061	0.065	15	90	0.424	35.9 \pm 4.4
South End	<i>rustica</i>	SteRus	13	1.039	0.046	0.071	13	89	0.444	37.1 \pm 2.4
	<i>smaragdina</i>	SteSma	13	0.895	0.036	0.073	13	87	0.442	38.6 \pm 3.1
	outgroup	Pcinerea	3	0.640	0.031	0.028	3	10	0.064	5.3 \pm 0.8

N is the number of analysed sea anemones in each population. **Ar** corresponds to the allelic richness per animal host. **Ho** and **He** are respectively the observed and expected heterozygosity within each population.

Table 2: *Symbiodinium* sp. ITS2 alleles validation

Filters		Number of ITS2 alleles	Total number of reads	Number of reads per ITS2 allele (mean \pm sd)
Raw sequences			175933	
Step 1	Identification of ITS2 sequences	1	172592	
Step 2	Identification of unique ITS2 sequences	95881	172592	1.8 \pm 74.45
Step 3 (i)	Identification of shared alleles	4814	78443	16.29 \pm 4.78
Step 3 (ii)	Identification of most abundant shared alleles	92	30365	330.05 \pm 193.67

Table 3: Partitioning of the *Symbiodinium* ITS2 diversity among *A. viridis* morphs, genetic lineages or origin site.

	df	Sums of squares	F	P(>F)	significance
Genetic lineage	3	2.2577	3.8688	3.333e-05	***
Site	3	2.0214	3.4638	6.666e-05	***
Morph	2	0.3667	0.9425	0.52792	
Genetic lineage x Morph	2	0.6416	1.6493	0.0274	*
Site x Morph	1	0.3325	1.7095	0.06113	
Residual	98	19.0635			
Total	109	24.6834			

PERMANOVA test using 30000 permutations with p-value thresholds of 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***)

Table 4: PERMANOVA pairwise comparisons of the partitioning of the *Symbiodinium* ITS2 diversity among the different *A. viridis* genetic lineages.

Pairs	F	P(>F)	Adjusted P	significance
Banruf vs Engch	3.8895	1.728e-03	0.003	**
Banruf vs Med1	2.3207	1.464e-02	0.017	*
Banruf vs Med2	1.0774	3.557e-01	0.355	
EngCh vs Med1	2.7122	3.056e-04	<0.001	***
EngCh vs Med2	6.3536	1.111e-05	<0.0001	***
Med1 vs Med2	2.9164	3.867e-03	0.006	**

Pairwise PERMANOVAs computed from 180000 permutations. Adjusted P: p-value after a False Discovery Rate correction was applied with thresholds of 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***)

Figures

Figure 1

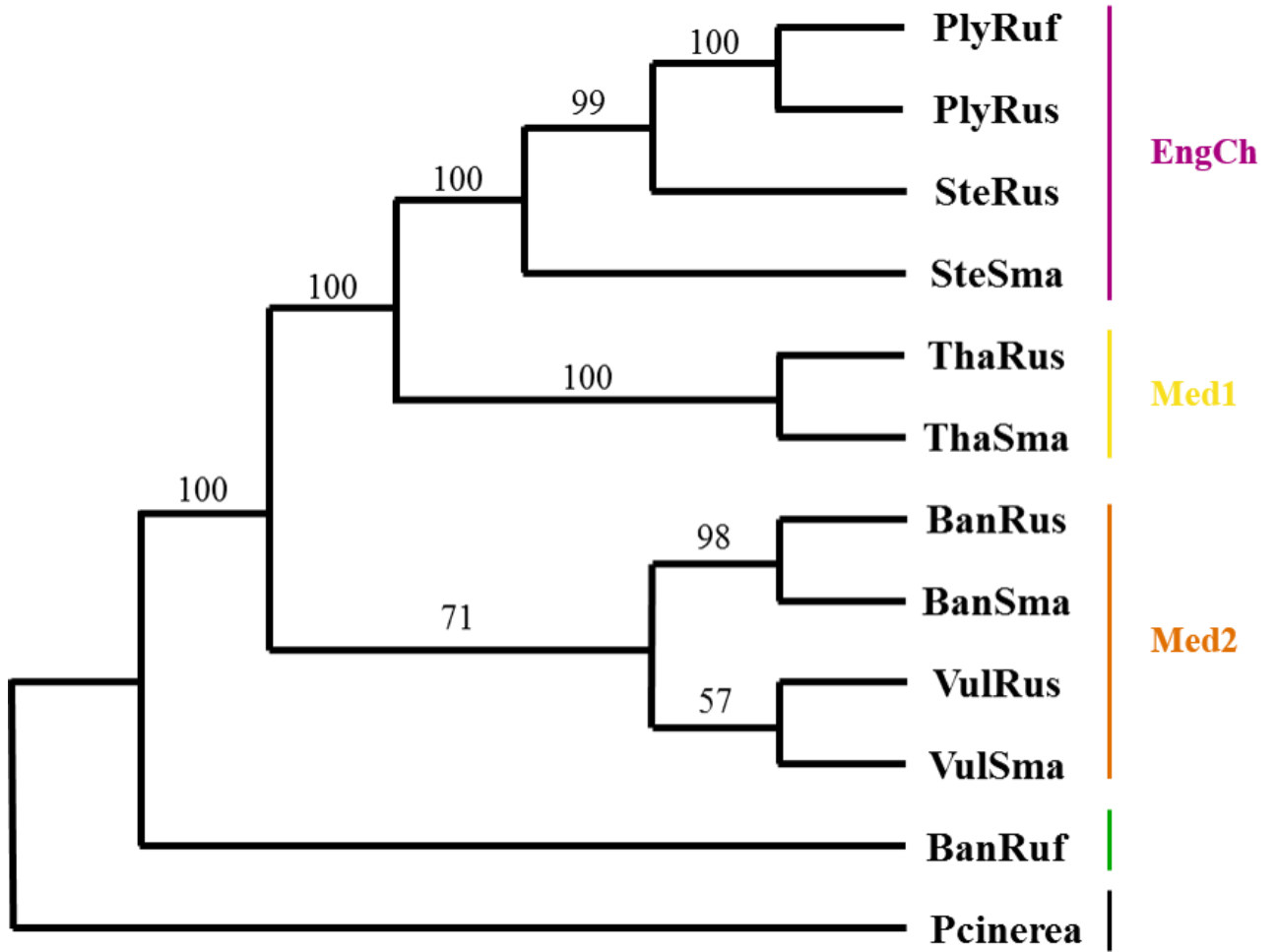


Figure 2

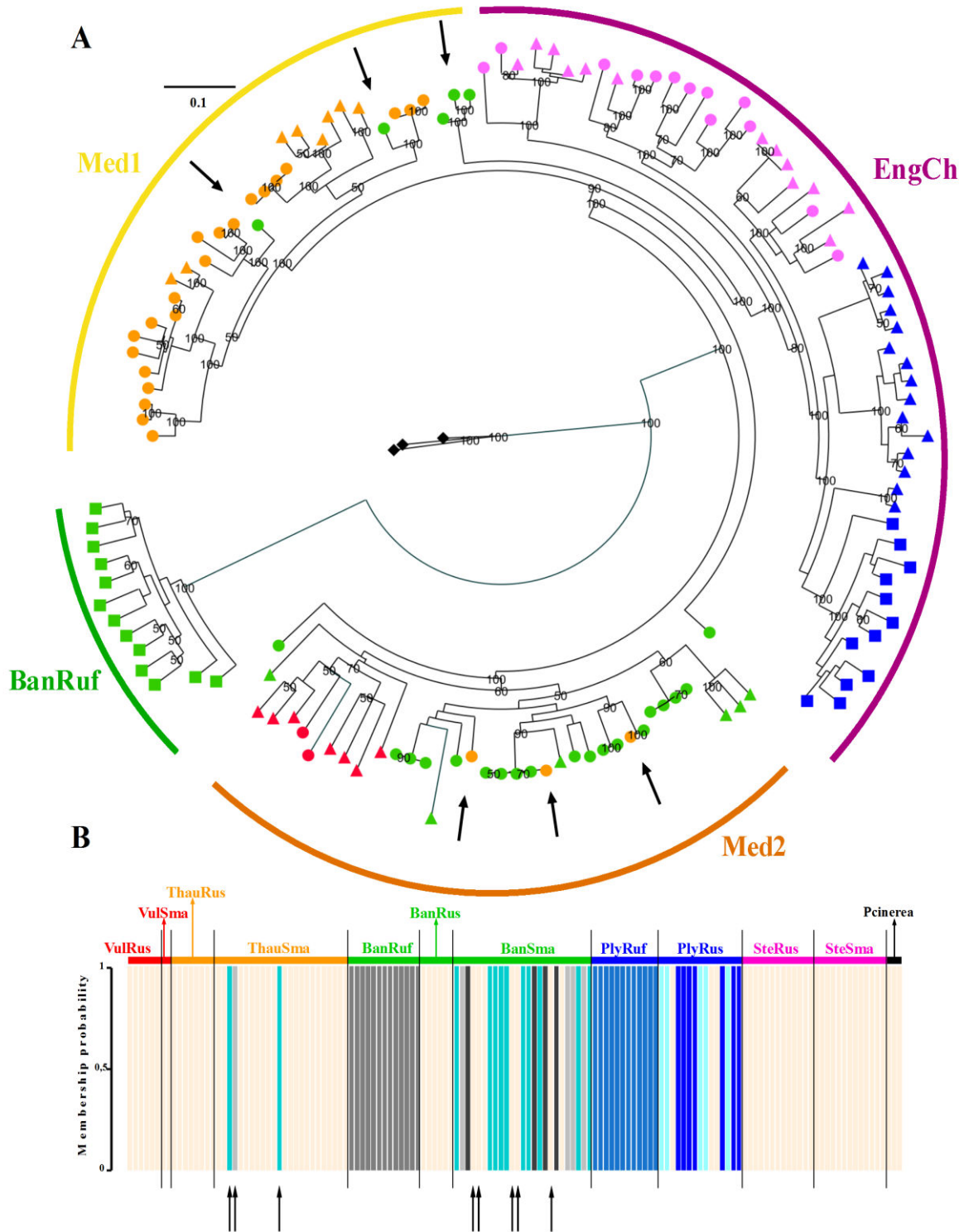
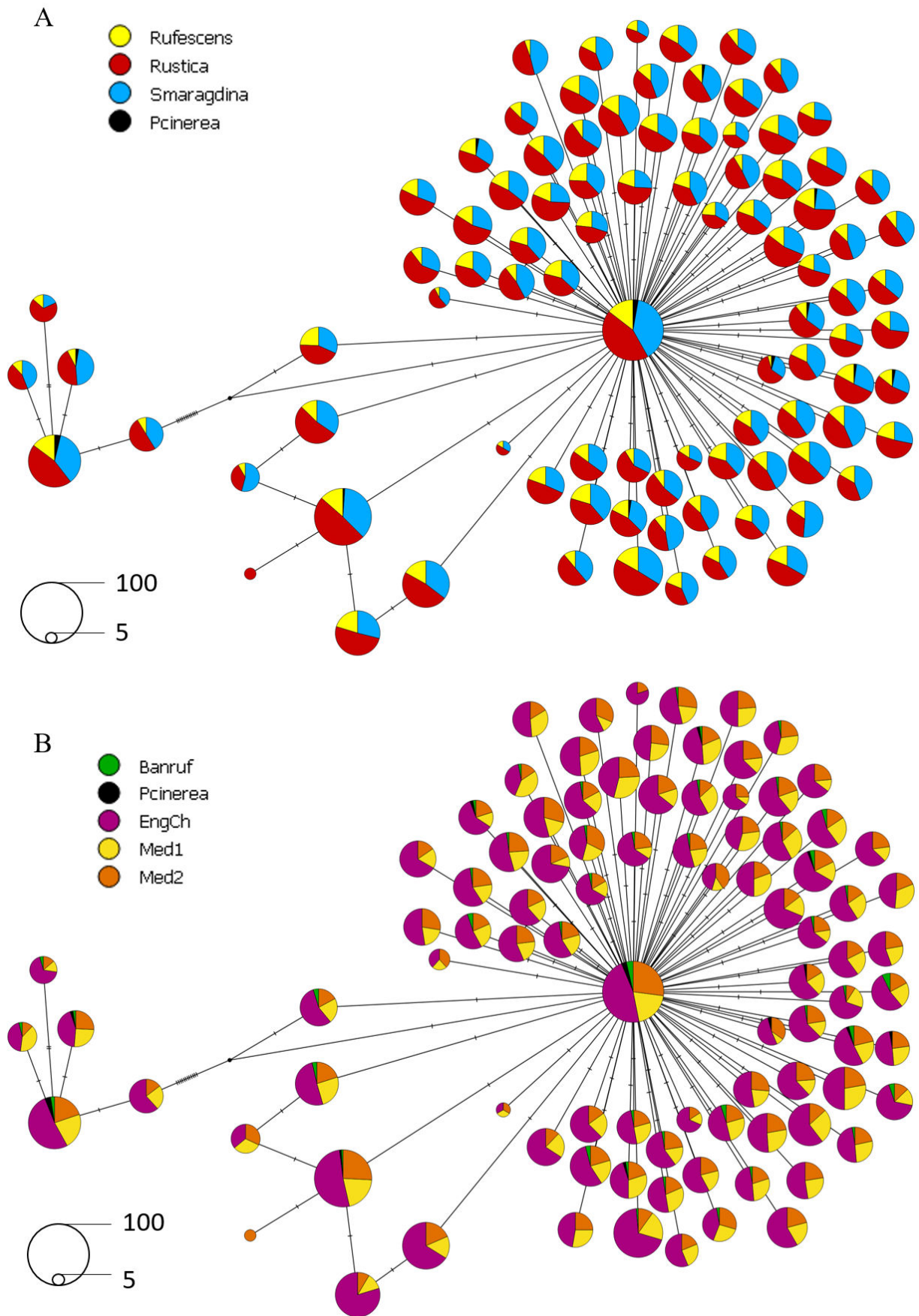


Figure 3



Supplementary data

Table S1: Host and symbiont pairwise F_{ST} values among populations

	VulRus	VulSma	ThaRus	ThaSma	BanRuf	BanRus	BanSma	PlyRuf	PlyRus	SteRus	SteSma	Pcinerea
VulRus		0.161	0.075	0.064	0.284	0.173	0.393	0.029	0.094	0.043	0.035	0.437
VulSma	0.039		0.293	0.257	0.521	0.418	0.634	0.185	0.291	0.244	0.248	0.688
ThaRus	0.238	0.251		0.011	0.124	0.054	0.240	0.057	0.036	0.023	0.017	0.293
ThaSma	0.355	0.394	0.083		0.152	0.058	0.256	0.047	0.036	0.029	0.027	0.324
BanRuf	0.535	0.538	0.527	0.499		0.040	0.095	0.263	0.172	0.186	0.212	0.113
BanRus	0.097	0.179	0.324	0.203	0.518		0.140	0.149	0.081	0.064	0.076	0.157
BanSma	0.200	0.232	0.185	0.078	0.488	0.151		0.369	0.297	0.284	0.313	0.139
PlyRuf	0.562	0.597	0.450	0.288	0.598	0.528	0.302		0.019	0.002	0.000	0.439
PlyRus	0.414	0.419	0.310	0.200	0.551	0.377	0.226	0.297		0.000	0.001	0.362
SteRus	0.319	0.329	0.234	0.141	0.518	0.284	0.181	0.26	0.143		0.000	0.357
SteSma	0.258	0.265	0.197	0.116	0.502	0.238	0.159	0.245	0.128	0.045		0.365
Pcinerea	0.480	0.366	0.630	0.556	0.582	0.472	0.538	0.744	0.644	0.586	0.553	

Upper part: Symbiont Pairwise F_{ST} Lower part: Host Pairwise F_{ST} **Table S2:** Pairwise comparisons of the partitioning of the *Symbiodinium* ITS2 diversity among the different *A. viridis* sampling sites.

Pairs	F	$P(>F)$	Adjusted P	significance
Ban vs Ply	8.009	5.556e-06	1.852e-05	***
Ban vs Ste	9.102	5.556e-06	1.852e-05	***
Ban vs Tha	6.018	5.556e-06	1.852e-05	***
Ban vs Vul	5.827	1.778e-04	4.444e-04	**
Ply vs Ste	1.003	4.634e-01	4.634e-01	
Ply vs Tha	2.283	2.006e-03	3.343e-03	*
Ply vs Vul	2.266	1.397e-02	1.747e-02	*
Ste vs Tha	2.177	5.278e-04	1.056e-03	**
Ste vs Vul	1.821	1.037e-02	1.481e-02	*
Tha vs Vul	1.626	4.254e-02	4.727e-02	*

Pairwise PERMANOVAs computed from 180000 permutations. Adjusted P: p-value after a False Discovery Rate correction was applied with thresholds of 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.001 (***).

Figure S1: Sampling sites in the Mediterranean Sea (Vulcano: 38°21'14''N 14°59'22''E; Thau: 43°23'32.82''N 3°36'1.43''E; Banyuls: 42°28'50''N 03°07'50''E) and in the English Channel (Plymouth: 50°16'40''N 03°54'49''W; Southend: 50°44'14''N 01°23'39''W)

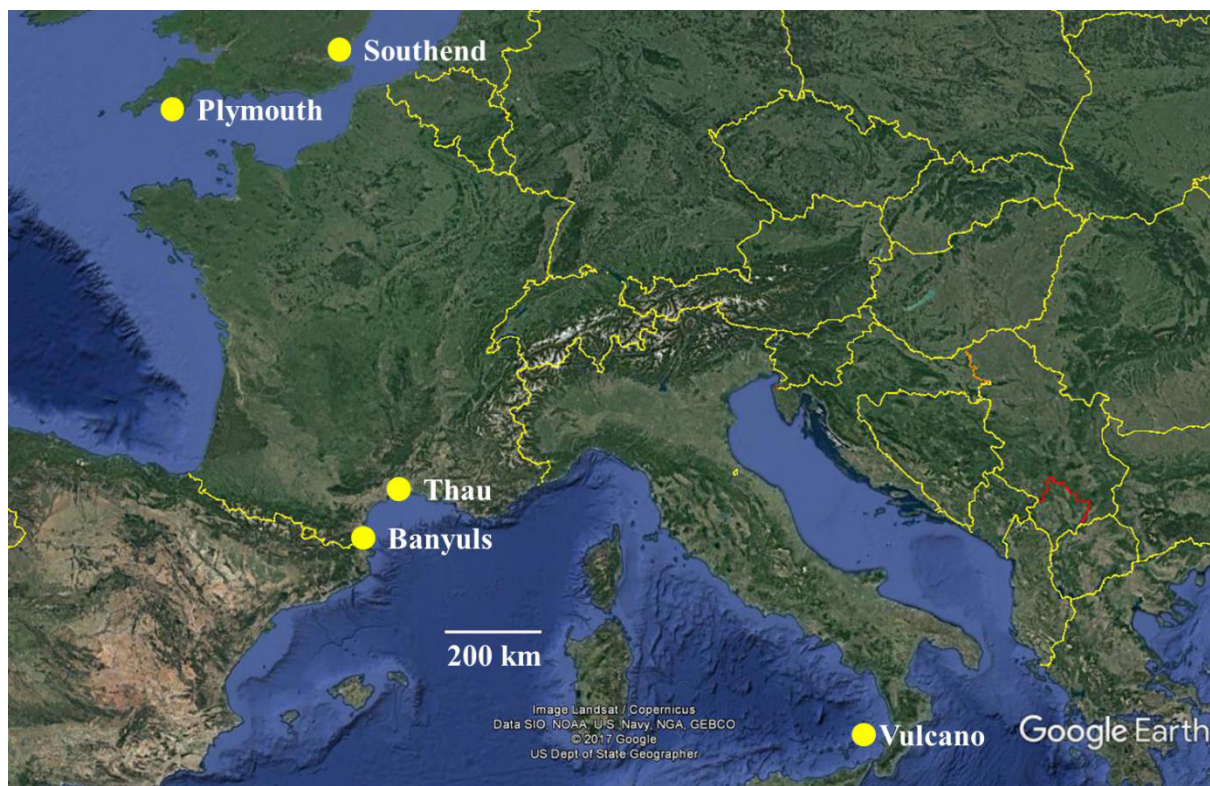


Figure S2: Non bayesian species delimitation among *A. viridis* morphs (SVDQuartets) at the individual level. Values on the nodes show the proportion of computed quartets which are consistent with each node. Support values at the nodes are shown only if equal or superior to 70%. The coloured bars on the right side correspond to the five identified genetic lineages (i) *P. cinerea* (black), (ii) BanRuf (green), (iii) English Channel (EngCh, purple), (iv) Med1 (yellow), (v) Med2 (orange).

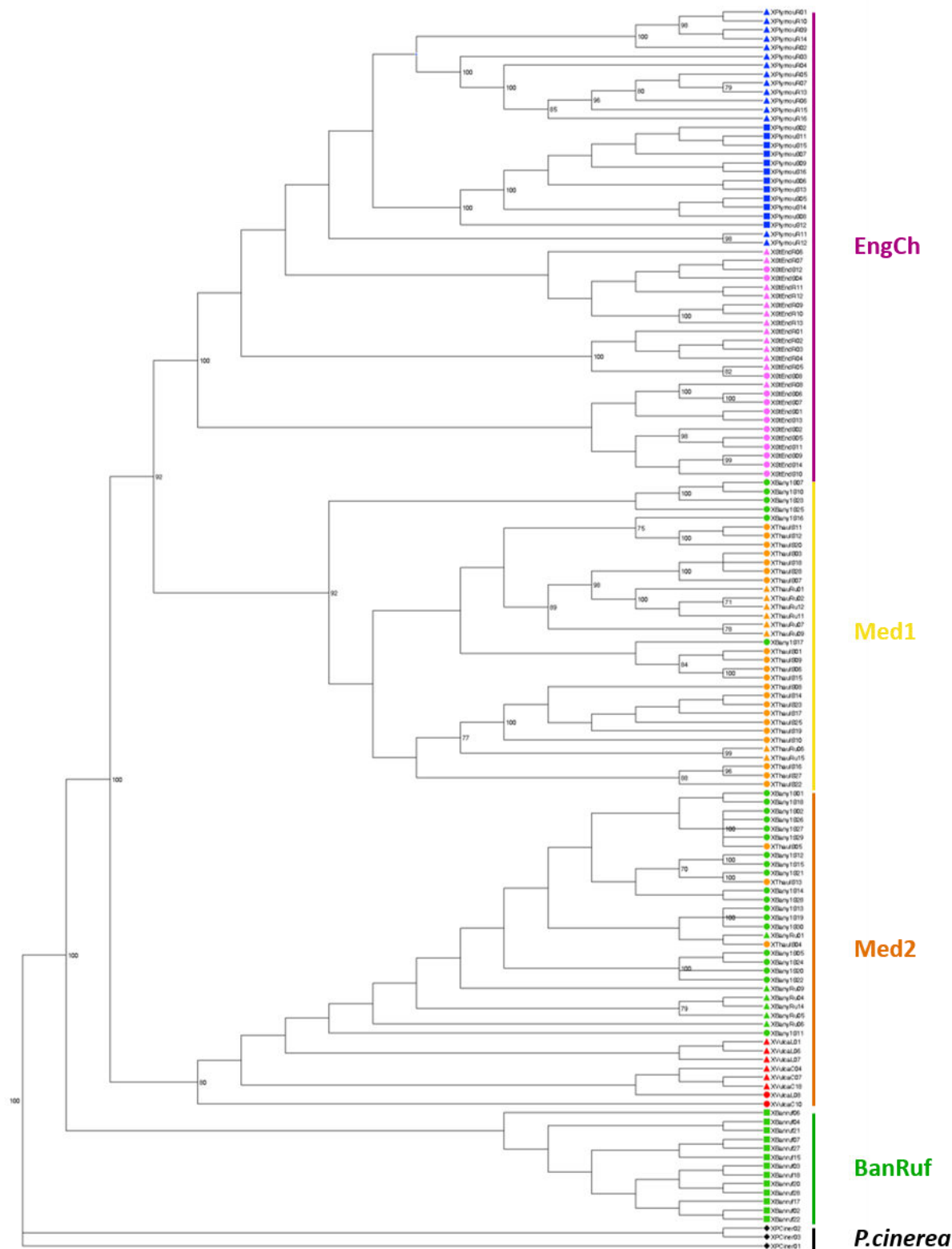


Figure S3: Optimal K-cluster determination prior to structure like analysis. (a) Graph showing the BIC value for a number of K-cluster between 1 and 30. Optimal values are between 6 and 10. (b) Table value showing individuals origin (vertical axe) vs. individual cluster attribution (inf1-8, horizontal axe). The square size represents the number of individuals.

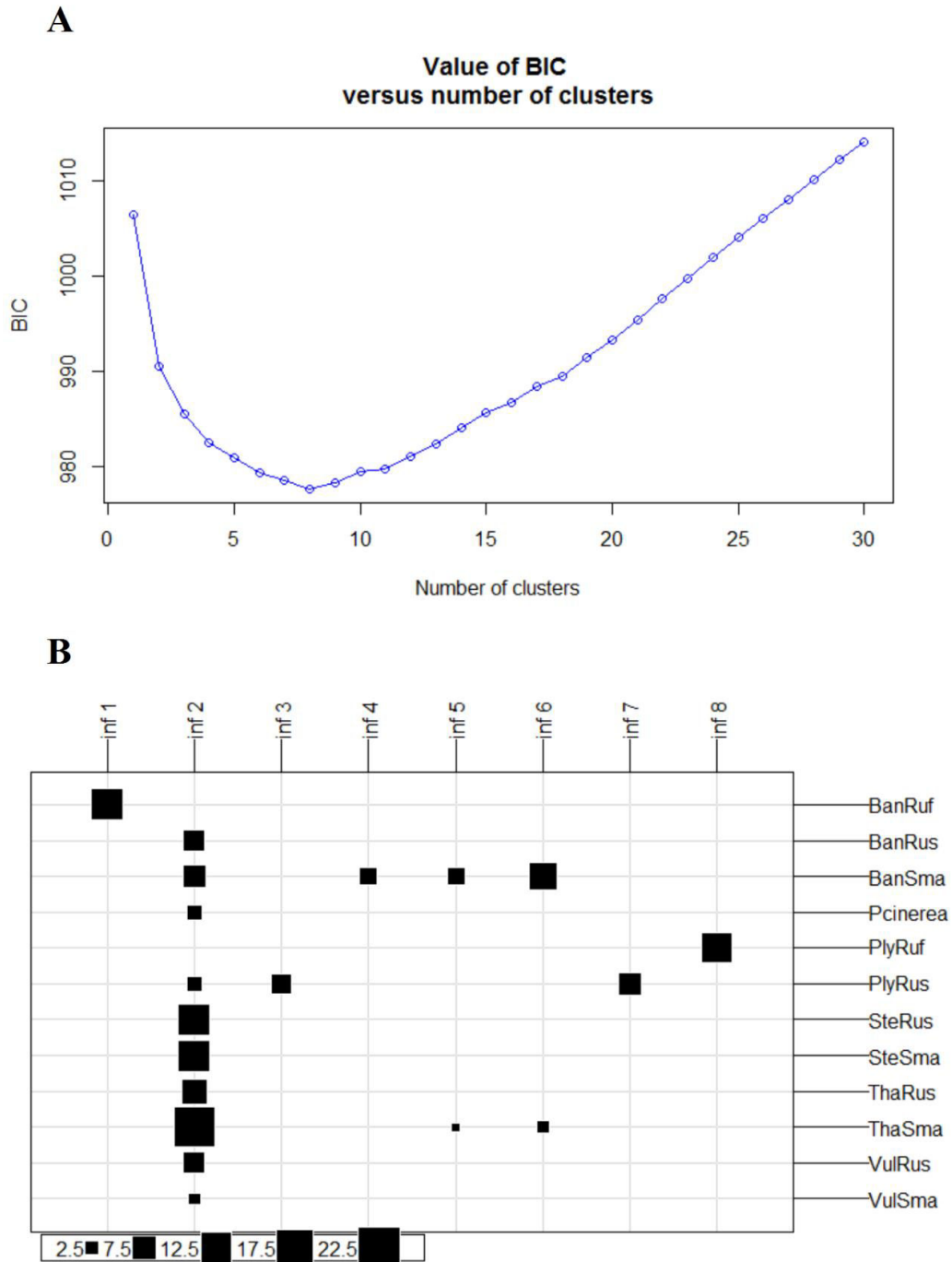
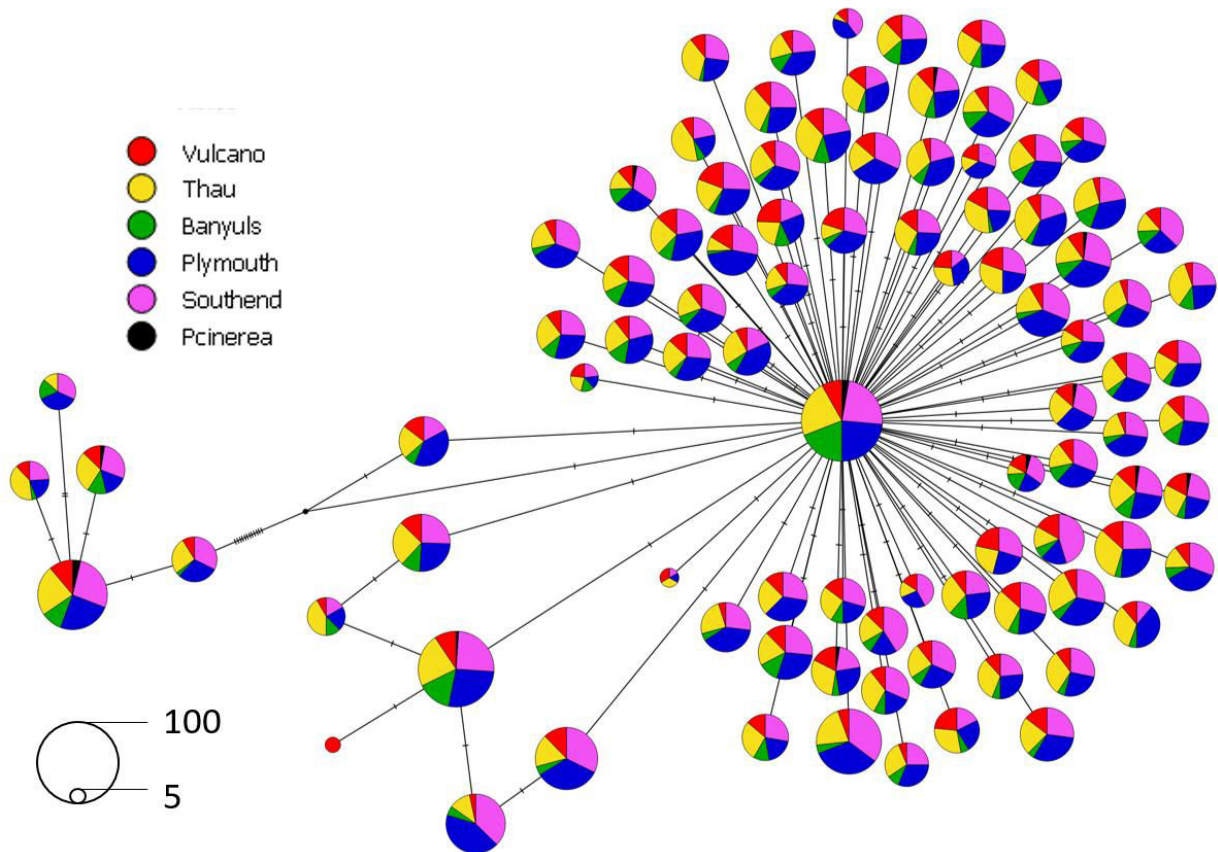


Figure S4: Distribution of the animal host geographic origin among the *Symbiodinium* ITS2 haplotypes. TCS maximum parsimony network of the ITS2 symbiont haplotypes. The network was computed with PopART. Each circle represents an allele and its size is proportional to the number of host individuals with this allele. Substitution events are represented by bars on the edges.



3.3.3 Résultats majeurs et conclusion synthétique

Dans l'**Article 1**, l'étude réalisée sur des marqueurs de gènes de stress en Sanger sur les 38 anémones de mer (34 *A. viridis* et 4 *P. cinerea*) a révélé une diversité génétique suffisante pour montrer qu'*A. viridis* var. *rufescens*, *rustica* et *smaragdina* ne forment pas des lignées indépendantes. De plus, cette variabilité a montré une structuration entre les individus de la Mer Méditerranée et les individus de la Manche.

L'**Article 2**, par l'utilisation des marqueurs RAD, montre que les marqueurs de gènes de stress sont des marqueurs valides pour la délimitation d'espèces. En effet, les marqueurs RAD montrent également que les morphes ne sont pas des espèces. Les RAD ont permis par ailleurs d'identifier quatre lignées génétiques au sein d'*A. viridis*, lignées dépendant essentiellement de l'origine géographique et non du morphe. De plus, l'analyse de la diversité génétique symbiotique au sein des morphes n'a montré aucune spécificité entre le génotype de l'hôte animal et le génotype du symbiote.

a. Approche « EPIC Sanger » vs. approche RADseq

Les marqueurs RAD sont couramment utilisés pour déterminer la variabilité tant inter (Herrera et al., 2015; Pante et al., 2015; Wagner et al., 2013) qu'intraspécifique (Leache et al., 2014; Nadeau et al., 2013). Notre étude (**Article 2**) montre l'efficacité de la méthode quant à la délimitation d'espèces. L'approche RADseq a de plus permis d'identifier des lignées génétiques séparées indépendamment de la différenciation morphologique au sein même de certaines populations de la Mer Méditerranée.

Par ailleurs, l'analyse en coalescence de seulement cinq marqueurs de gènes de stress nous avait déjà révélé que le scénario de spéciation le plus probable était celui qui séparait les anémones selon leur origine géographique et non selon les morphes (**Article 1**). Même si l'approche RADseq est puissante à détecter la diversité génétique intraspécifique, au final, cinq marqueurs tirés de gènes de stress donnent suffisamment de résolution pour répondre à notre question. Nous confirmons donc la littérature (Bensch et al., 2002; Garvin et al., 2010) qui avançaient qu'une poignée de gènes soumis à sélection suffisaient à la délimitation d'espèces. Cependant, il faut noter que les marqueurs de gènes de stress étaient moins résolutifs au sein de la Mer

Méditerranée, ceci pouvant être lié à la profondeur d'échantillonnage moins importante dans l'**Article 1**.

b. Que sont les lignées génétiques indépendantes au sein d'*A. viridis* ?

L'analyse SVDQuartets de la diversité révélée par RADseq a délimité quatre lignées génétiques indépendantes (**Article 2**) : la première échantillonnée à Thau, la seconde à Banyuls et Vulcano, la troisième trouvée dans la Manche (Plymouth et Southend) et la quatrième représentée par les individus du morphe var. *rufescens* de Banyuls. Ce résultat reste toutefois à être confirmé par une autre approche de délimitation d'espèce, comme par exemple BFD (Grummer et al., 2014).

D'après les valeurs pairwise- F_{st} entre les sites, variant de 0,097 à 0,598 (Article 2, table S1), la structuration géographique peut être très forte ce qui est assez surprenant par rapport à son mode de vie. En effet, le stade larvaire semble durer plusieurs semaines à plusieurs mois en laboratoire (T. Zamoum, comm. personnelle) ce qui confère à l'anémone un grand potentiel de dispersion larvaire. En effet, chez un autre Cnidaire, le stade larvaire *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758) est de 16 à 42 jours (Martínez-Quintana et al., 2015) ce qui, en théorie, peut amener à une distance de dispersion potentielle de 10km à 30km (Guizien et al., 2012). Toutefois, il existe aussi une forte structuration génétique pour les populations de surface sur une distance de 10m entre deux colonies (Costantini et al., 2016). Ceci montre bien qu'il existe probablement des stratégies de rétention larvaire empêchant celles-ci de se disperser (Martínez-Quintana et al., 2015). Un phénomène similaire pourrait être présent chez *A. viridis*.

Par ailleurs, la valeur F_{st} moyenne entre le groupe externe (*P. cinerea*) et les autres populations d'*A. viridis* est de 0,559 ($\pm 0,003$ ES) ce qui est du même ordre voire inférieur à certaines valeurs de F_{st} entre populations d'*A. viridis*, démontrant qu'il y a probablement des espèces cryptiques au sein d'*A. viridis*. Le cas de la lignée *A. viridis* var. *rufescens* de Banyuls illustre cette hypothèse. En effet, les analyses de délimitation utilisées pour les données RADseq montrent clairement que cette population pourrait se retrouver au rang d'espèce au même niveau que le groupe externe *P. cinerea*. Cette population pourrait être le produit d'un phénomène fondateur dans lequel une anémone provenant d'une autre origine, d'un autre refuge par exemple, se serait multipliée au niveau de ce site, sans pour autant se mélanger avec les individus endémiques. L'origine

de cette divergence est encore inconnue et nécessite des échantillonnages supplémentaires.

c. Que sont les morphes d'*Anemonia viridis* ?

« Lorsque deux populations vivent dans des conditions environnementales différentes, des régimes de sélection locaux peuvent amener à une divergence phénotypique et moduler l'architecture génomique sous-jacente, promouvant ainsi l'adaptation locale et initiant la spéciation. »

Cette phrase tirée de (Schluter, 2000) illustre parfaitement pourquoi on pouvait s'attendre à ce que les morphes représentent différentes espèces, dont l'origine serait issue d'une spécialisation fonctionnelle en fonction du milieu par spéciation écologique. Toutefois, l'étude de la diversité génétique des trois morphes d'*A. viridis* réfute cette hypothèse. En effet, la distribution de la diversité génétique qui existe au sein de l'anémone ne se fait pas en fonction de la morphologie mais de la géographie. C'est aussi le cas pour var. *rufescens* car la population de Plymouth (PlyRuf) est plus proche génétiquement de var. *rustica* de Plymouth (PlyRus) que de var. *rufescens* de Banyuls (BanRuf) (**Article 2**, figure 2).

L'origine des morphes n'est donc pas une divergence génétique. *A. viridis* n'est pas la seule anémone chez laquelle il existe une variation morphologique sans aucune corrélation avec la diversité génétique au sein de l'espèce. C'est le cas aussi d'*Actinia equina* (Linnaeus, 1758) et d'*Actinia fragacea* (Tugwell, 1856) (Pereira et al., 2014), deux espèces qui montrent trois morphes colorés le long des côtes portugaises. Pourtant, les morphes de couleur ne correspondent pas aux espèces décrites génétiquement.

Quelle pourrait être, en ce cas, l'origine des morphes ? La première hypothèse viendrait de la relation entre l'hôte et ses symbiotes associés. Chez *Madracis pharensis* (Heller, 1868), (Frade et al., 2008) ont montré que les différents morphotypes de couleur avaient des compositions différentes de populations de *Symbiodinium*. Par ailleurs, le génotype du symbiote peut aussi conférer différentes capacités fonctionnelles. En effet, Howells et al. (2011) ont montré que la thermotolérance d'un holobionte corallien pouvait changer en fonction du symbiote qu'il abritait. De plus, Leal et al. (2015), ont montré que chaque type de symbiote a une capacité à fixer et transférer le carbone qui lui est

propre. Ainsi, la diversité de symbiotes au sein d'*A. viridis* pourrait être corrélée à une différenciation des morphes, voire à une différenciation fonctionnelle.

Toutefois, les analyses faites sur le marqueur ITS2 des *Symbiodinium* d'*A. viridis* n'a révélé aucune correspondance entre le génotype de l'hôte et le génotype du symbiote, et ce malgré la diversité qui a été détectée. La diversité symbiotique est significativement structurée géographiquement, mais pas selon les morphes.

Une seconde hypothèse quant à l'origine des morphes repose sur la fonction des protéines fluorescentes et autres pigments (PF) présentes chez les morphes var. *rufescens*, *smaragdina*, *viridis* et absentes chez var. *rustica* et *vulgaris*. Ces PF pourraient conférer des capacités adaptatives variables aux morphes, résultant en une structuration des morphes en fonction des conditions environnementales (Hansson, 2004). Par exemple, chez le corail *Acropora millepora* (Ehrenberg, 1834), les différents morphes variant au niveau de l'expression des PF ont été reliés au nombre de copies des gènes codant pour les PF présentes dans le génome et à leur régulation par l'intensité lumineuse (Gittins et al., 2015). Dans le cas d'*A. viridis*, les morphes pigmentés seraient plus présents en surface (Wiedenmann et al., 1999) suggérant une origine évolutive similaire à *A. millepora*. L'autre fonction possible des PF serait une protection contre les ROS (Reactive Oxygen Species) produites lors de la photosynthèse ce qui pourrait procurer un avantage pour les morphes avec PF dans les zones exposées à la lumière, les PF étant surtout présentes là où la concentration en ROS est élevée (Dove et al., 2001). Les PF pourraient aussi jouer un rôle d'attraction des proies d'*A. viridis*, comme cela a été démontré chez l'hydroméduse *Olindias formosus* (Goto, 1903) (Haddock et Dunn, 2015). Chez *A. viridis*, on pourrait imaginer que la différence de profil au niveau de PF découlerait d'une variation du régime alimentaire, les PF servant à attirer des proies spécifiques.

Dans le cas d'*A. viridis*, ce rôle des PF comme photoprotecteurs contre les ROS a été évoqué dans le cas de la compétition entre var. *smaragdina* (fluorescent) et *rustica* (non-fluorescent) sur les zones de surface (Leutenegger et al., 2007). Toutefois, les morphes avec et sans PF sont retrouvés côte à côte en surface (Bulnheim et Sauer, 1984; Leutenegger et al., 2007; Sauer, 1986; Wiedenmann et al., 1999, 2000b, **Article 1**) et la compétition agressive est aussi observée entre les deux morphes n'exprimant pas de PF, var. *rustica* et *vulgaris* (Sauer, 1986; Sauer et al., 1986). En conclusion le rôle

photoadaptatif des PF ne peut pas être exclu mais n'est certainement pas la force majeure derrière la différenciation des morphes.

De plus, nous ne pouvons écarter le fait que les morphes d'*A. viridis* seraient le produit d'une plasticité phénotypique conditionnée par l'histoire et le cycle de vie d'un individu donné. Chez le corail *Acropora samoensis* (Brook, 1891), la larve pélagique montre une fluorescence verte mais lorsque celle-ci s'installe, le profil fluorescent vire au bleu (Roth et al., 2013). Il a aussi été démontré que le profil d'expression des PF change lors du développement du corail *Acropora millepora* et l'Actiniaire *Haliplanella luciae* (Verrill, 1898) (Kenkel et al., 2011; Zamer et Mangum, 1979). Les morphes d'*A. viridis* pourraient tout aussi bien correspondre à différents stades de vie d'une espèce potentiellement longévive bien que le changement de morphologie d'une anémone n'a jamais été observé dans nos aquariums alors que certains spécimens aient été gardés plusieurs années. Les morphes pourraient par contre représenter une réponse plastique de la larve qui, lors de l'installation, serait fixée irréversiblement au travers de processus de canalisation (Kinne, 1962; Zamer et Mangum, 1979).

Enfin, la dernière hypothèse est que les morphes pourraient provenir d'une variation allélique intraspécifique sur le promoteur des gènes codant les PF (Gittins et al., 2015) et constitueraient une différence non adaptative entre les morphes.

En conclusion de ce travail, j'ai pu démontrer qu'il existe différentes lignées au sein d'*Anemonia viridis* mais que ces lignées sont corrélées à la géographie et non aux morphes. La large variabilité morphologique au sein de l'anémone serait donc probablement due soit à une plasticité phénotypique, soit à des variants alléliques, mais reste encore à être explorée.

Chapitre 4

Adaptation locale

chez *Anemonia viridis*

4.1 Introduction

Dans le chapitre 1, nous avons décrit que la réponse des organismes à un changement environnemental peut avoir comme origine la plasticité phénotypique de l'espèce ou une adaptation génétique. Néanmoins, il est parfois difficile de dissocier les effets de ces deux mécanismes et leur contribution relative (Palumbi et al., 2014). En effet, toute variation environnementale peut induire un changement phénotypique et cette variation phénotypique peut être le résultat d'une variation génétique ou d'une plasticité phénotypique (Merilä et Hendry, 2014). Toutefois, comprendre les mécanismes de base de l'adaptation en réponse à des variations environnementales est une question clef en biologie évolutive (De Mita et al., 2013; Tenaillon et Tiffin, 2008) pour comprendre les processus évolutifs dans leur ensemble (Blanquart et al., 2013; Lenormand, 2002), mais surtout aujourd'hui dans le contexte du changement climatique qui s'accélère (Berthouly-Salazar et al., 2016; Feder et Mitchell-Olds, 2003). Pour appréhender les impacts du changement climatique, l'étude de l'adaptation locale va ainsi contribuer à améliorer les modèles de prédiction et les stratégies de gestion (Bensoussan et al., 2010; Gagnaire et Gaggiotti, 2016; Mumby et al., 2011).

L'arrivée des NGS et leur application dans le domaine de la génomique des populations (Luikart et al., 2003) ont ouvert de nouvelles voies dans la détection des signatures de sélection, notamment pour l'étude d'espèces « non-modèles » (de Villemereuil et Gaggiotti, 2015), amenant à une meilleure compréhension du fonctionnement de l'adaptation (Davey et al., 2011; Gagnaire et Gaggiotti, 2016; Savolainen et al., 2013).

En moyenne, à l'échelle du génome, les loci vont être affectés de la même manière par la démographie et l'histoire évolutive des populations. Par contre, les loci soumis à sélection de manière directe ou indirecte (en déséquilibre de liaison avec un locus soumis à sélection) auront un comportement différent du reste du génome (Luikart et al., 2003; Storz, 2005 ; figure 4.1). L'intérêt des NGS est de rendre possible la détection de ces loci particuliers appelés « outliers ». Au sein des populations, les loci outliers ont une distribution de leurs allèles différentes du reste des marqueurs génomiques neutres, ce qui révèle la présence de processus particuliers tels que de l'adaptation locale ou d'autres processus liés à l'histoire démographique des populations (Bierne et al., 2013a; Hoban et al., 2016; Joost et al., 2013; de Villemereuil et Gaggiotti, 2015). L'approche par loci outliers pour détecter l'adaptation locale implique qu'il y ait une corrélation entre la variation d'un trait phénotypique et le polymorphisme allélique associé (Hoekstra, 2006; Luikart et al., 2003; Pardo-Diaz et al., 2015).

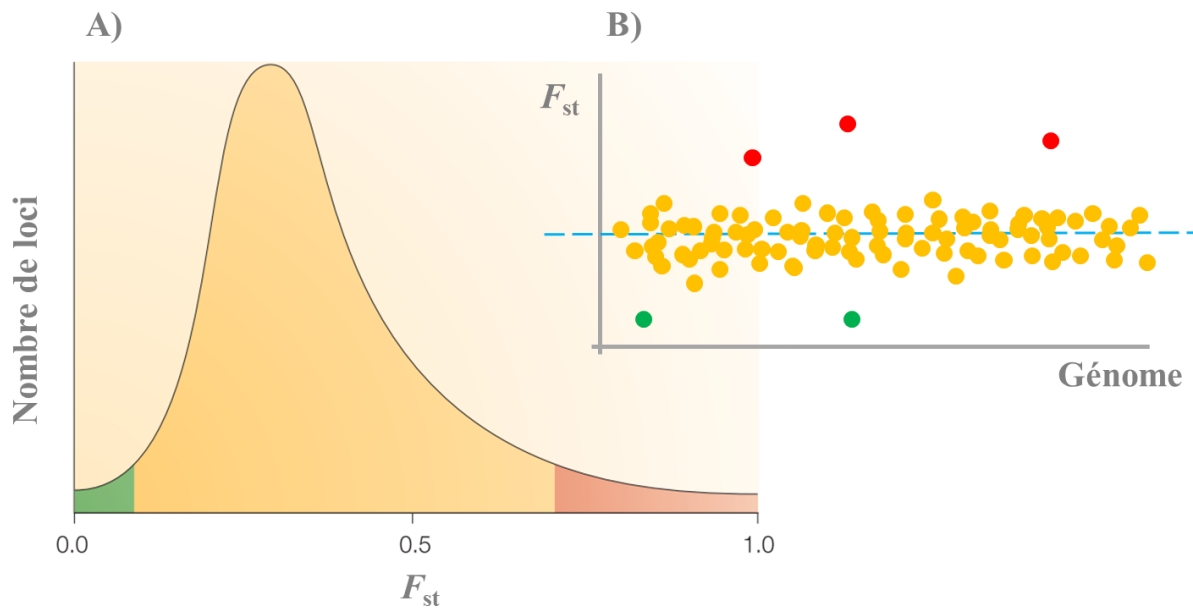


Figure 4.1 : Distribution hypothétique des valeurs F_{st} . Le F_{st} est une mesure de la différence des fréquences alléliques entre populations pour un locus donné. A) Distribution de la fréquence hypothétique des F_{st} des loci de l'ensemble du génome (d'après Luikart et al., 2003). B) Distribution de la valeur des F_{st} de chaque locus le long du génome (ligne en traits bleus = F_{st} moyen). Les loci ayant une distribution particulière (en vert et en rouge) sont soumis à sélection. En vert, les loci sont sous sélection conservatrice. En rouge, les loci sont sous sélection disruptive potentiellement liée à l'adaptation locale.

Il existe deux grandes manières de détecter ces loci outliers (Berthouly-Salazar et al., 2016; de Villemereuil et Gaggiotti, 2015) toutes deux amenant à la découverte de loci candidats dans l'adaptation locale (Nielsen et al., 2009). La première méthode se concentre sur la détection de variables environnementales et consiste à associer un gradient environnemental à la distribution des fréquences alléliques (Coop et al., 2010; Frichot et al., 2013; Gunther et Coop, 2013). La seconde méthode consiste à détecter, par une approche de type Genome-scan, des loci dont la distribution allélique est différente de ce qui est attendu sous un modèle d'évolution neutre, par exemple en comparant leurs valeurs de F_{st} entre populations (F_{st} -scan) (Beaumont et Balding, 2004; Beaumont et Nichols, 1996; Excoffier et al., 2009; Foll et Gaggiotti, 2008). Dans ce type d'analyse, il n'y a pas d'a priori sur les variables environnementales ou traits phénotypiques impliqués dans l'adaptation locale ; l'hypothèse d'une éventuelle adaptation locale est basée sur le fait que les allèles impliqués auront une fréquence plus haute à l'endroit où ils entraînent une augmentation de fitness et une fréquence plus faible où ils diminuent la fitness (Hoban et al., 2016).

De manière générale, dans une population, le flux de gènes est considéré comme une force limitant l'adaptation locale, par l'apport de génotypes maladaptés dans cette population (Kawecki et Ebert, 2004; Lenormand, 2012). Toutefois, il a été avancé que des loci sous

sélection peuvent aussi se manifester sous flux de gènes important (Conover et al., 2006; Hedgecock, 1986). Dans ce cas, cela veut dire que la différenciation est maintenue entre les populations par une sélection forte agissant après l'arrivée du migrant (Sanford et Kelly, 2011). Par exemple, les travaux menés sur la balane *Semibalanus balanoides* (Linnaeus, 1767) par Schmidt et Rand (2001) montrent une homogénéité dans les fréquences génotypiques des populations de haute et basse zones intertidales juste après que les larves planctoniques se soient installées. Toutefois, les juvéniles de balanes ayant subi une période de mortalité post-installation montrent une différence allélique forte dans le gène *Mpi* associé à la tolérance au stress. Il en résulte que, malgré le fort flux de gènes dû à la dispersion larvaire, la force de sélection est telle que seuls les génotypes les mieux adaptés à leur environnement survivent et se reproduisent. En conclusion, la mise en place de l'adaptation locale va dépendre de l'équilibre entre la force de sélection et le taux de migration (Sanford et Kelly, 2011). A l'inverse d'une situation avec un fort flux de gènes, la détection de l'adaptation locale dans le cas d'espèces avec une forte structure génétique peut être difficile. En effet, la valeur haute de la moyenne des F_{st} le long du génome entraîne une variance du F_{st} plus grande, augmentant la détection d'outliers qui n'en sont pas, communément appelés faux positifs (Bierne et al., 2013a; Hoban et al., 2016). L'importance des flux de gènes influence donc fortement la détection des loci outliers en jouant sur le nombre de faux positifs.

Aujourd'hui, les études portant sur l'adaptation locale, notamment chez les espèces marines, sont de plus en plus fréquentes (Araneda et al., 2016; Barshis et al., 2010, 2013; Bay et Palumbi, 2014; Bongaerts et al., 2011; D'Croze et Maté, 2004; Erickson et al., 2016; Foo et Byrne, 2016; Friesen et al., 2014; Funk et al., 2016; Guo et al., 2016; Hume et al., 2016; Lundgren et al., 2013; Mayfield et al., 2012; Sanford et Kelly, 2011; Sherman et Ayre, 2008), notamment à la lumière du changement climatique (Doney et al., 2012; Somero, 2010). Les méthodes de type Genome-scan restent une approche fréquemment utilisée dans le but de déterminer les processus adaptatifs au sein de populations naturelles (Manel et al., 2016). Toutefois, il arrive fréquemment que des études transcriptomiques avancent l'hypothèse que des gènes différenciellement exprimés sont les moteurs de l'adaptation locale, ce qui n'est pas forcément le cas (Evans, 2015; Stillman et Armstrong, 2015).

Anemonia viridis (Forskål, 1775) est une anémone de mer présente de la mer Méditerranée à la Manche, de la surface jusqu'à 30m de profondeur. On la retrouve généralement attachée par le pied à un substrat solide en pleine mer mais aussi dans certaines lagunes de la mer Méditerranée ou dans des cuvettes créées par les marées. Cette espèce peut survivre à de fortes variations environnementales annuelles, comme la température ($\Delta 15^{\circ}\text{C}$, Lacombe et

Tchernia, 1972), la salinité ($\Delta 15$ psu, Isnard et al., 2015) et le pH ($\Delta 1$ pH, Johnson et al., 2013).

De plus, la réponse au stress (température, UV, absence de symbiotes) d'*A. viridis* est d'ores et déjà connue grâce à de nombreuses études fonctionnelles dont des études transcriptomiques ayant révélé des gènes dont l'expression est modifiée en fonction du stress (Ganot et al., 2011; Moya et al., 2012).

Les conditions environnementales contrastées dans lesquelles *A. viridis* prospère ainsi que les études précédentes sur ses capacités fonctionnelles, font de cette anémone un organisme symbiotique idéal pour la compréhension des mécanismes de l'adaptation locale. C'est pour cela qu'*A. viridis* a été choisie comme organisme modèle dans le cadre du projet de recherche ADACNI (ANR Bioadapt research program « AdaCni » ANR1121ADAP10016) qui visait à mesurer le potentiel adaptatif chez les Cnidaires dans le cadre du changement climatique. Les deux autres espèces étudiées dans le cadre de ce projet étaient *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) (Hexacoralliaire Scléactiniaire symbiotique) et *Corallium rubrum* (Octocoralliaire Alcyonacée calcifiant non symbiotique). *A. viridis* (Hexacoralliaire Actiniaire non calcifiant symbiotique) venait ainsi compléter le panel de diversité étudié.

Lors de mon travail de thèse, je me suis intéressé à la détection de l'adaptation locale chez *A. viridis* en comparant des populations provenant d'un même site (partageant donc le même pool génique) et subissant des conditions environnementales contrastées. En effet, le gradient environnemental peut potentiellement exercer des pressions de sélection divergentes sur les populations (Berthouly-Salazar et al., 2016; De Mita et al., 2013; Lotterhos et Whitlock, 2015). Ainsi, deux gradients écologiques ont été étudiés: surface vs. profondeur dans laquelle il y a une variation notamment de la luminosité et la température et lagune vs. mer dans laquelle on peut trouver une variation au niveau de la salinité et de la température. De plus, afin d'éviter tout effet confondant de l'histoire démographique des populations et de facteurs environnementaux covariants, il est conseillé de répliquer les sites réunissant les conditions environnementales testées (Berthouly-Salazar et al., 2016; Le Moan et al., 2016; Narum et Hess, 2011; Poncet et al., 2010; Rougemont et al., 2017). Par conséquent, un échantillonnage de trois sites pour la modalité surface vs. profondeur (Banyuls, Marseille et Scandola) et de deux sites pour la modalité lagune vs. mer (Barcarès et Thau) a été effectué (chapitre 2, figure 2.6, table 4.1). Je me suis employé à mettre en évidence l'existence de loci outliers au sein de ces populations parmi des loci RAD et des marqueurs de gènes de stress. Le détail des

protocoles utilisés se trouve dans l'annexe C. La fin de ce chapitre décrira les résultats obtenus et leur interprétation et sera formulée en anglais.

4.2 Results and discussion

From the Illumina sequencing, we obtained 4 086 151 (± 3 834 869 SD) reads per individual that permitted the detection of 132 995 RAD loci, which represent around 3% of the total genome sequence of *A. viridis* (for a host genome size of 480Mb). Out of these, 5 888 loci were shared by at least 85% of the 238 individuals. After all the filtering steps, we generated a dataset of 30 674 RAD SNPs, to which we added 97 SNPs from the 10 targeted loci mass sequencing. The final dataset contained thus 30 771 SNPs.

The mean allelic richness per locus ranged from 1.13 to 1.22 and all our populations showed observed heterozygosity values close to what was expected under Hardy-Weinberg equilibrium (table 4.1). Controlling for population structure is a major point in detecting outlier loci (Berthouly-Salazar et al., 2016; Pyhäjärvi et al., 2013), as the chosen populations must cross an environmental gradient but must also share the same gene pool. Among our populations, pairwise F_{st} values varied from 0 to 0.226. However, within each site, pairwise- F_{st} values varied between 0 and 0.046 showing that genetic diversity inside each site was on average smaller than among sites in general (table 4.2). The two populations from each site thus seemed to share the same gene pool, allowing the search for outlier SNP between each pair of populations. The two Scandola populations were more divergent from all the other sites, which may be indicative of the presence in this site of a new genetic lineage *sensu* **Article 2**. However, as the two RAD loci datasets were not validated through the same analysis, this hypothesis still requires further analysis to be properly tested. However, outlier SNPs were found using PCAdapt. In this analysis, each site had an optimal K number of clusters that ranged between 2 and 10 resulting in a clustering of the individuals that did not correspond to the two ecological modalities within each site, as can be seen on the PCA analysis of each site shown in figure 4.2. Moreover, the Venn diagrams comparing the outliers from the replicates of our two ecological gradients show that few of them are common among sites (figure 4.3). For the lagoon vs. sea modalities, 370 and 166 SNP outliers were detected in Barcarès and Thau respectively, but only 4 SNP outliers were common between the two sites (figure 4.3). For shallow vs. deep modalities, 571, 133 and 48 SNP outliers were found in Banyuls, Marseille and Scandola respectively. While there were 16 common SNP outliers between Banyuls and Marseille and 7 between Banyuls and Scandola, no outlier was shared among the three sites (figure 4.3).

Table 4.1 : Summary of the characteristics of each population and standard genetic diversity measures.

Population	Site	Ecological specificity (origin and depth)	Number of individuals	Allelic richness	Ho	He
Bany1S	Banyuls	Mer/<1m	25	1.16	0.03	0.04
Bany5S		Mer/5-10m	25	1.22	0.03	0.03
BarcES	Barcarès	Lagune/<1m	25	1.18	0.03	0.03
BarcMS		Mer/ 1-2m	19	1.15	0.03	0.03
MarMaS	Marseille	Mer/1m	25	1.17	0.03	0.03
MarPoS		Mer/30m	25	1.15	0.03	0.03
ScaSSS	Scandola	Mer/3m	21	1.13	0.03	0.02
ScaSDS		Mer/10m	25	1.22	0.03	0.04
ThauIS	Thau	Lagune/ <1m	25	1.15	0.03	0.03
ThauOS		Mer/ 1-2m	23	1.17	0.03	0.03

Table 4.2 : Pairwise F_{st} values among populations. Values between the two populations from the same sites are written in bold.

	Bany1S	Bany5S	BarcES	BarcMS	MarMaS	MarPoS	ScaSDS	ScaSSS	ThauIS	ThauOS
Bany1S										
Bany5S	0.021									
BarcES	0.046	0.000								
BarcMS	0.013	0.020	0.046							
MarMaS	0.063	0.028	0.030	0.056						
MarPoS	0.074	0.050	0.058	0.069	0.000					
ScaSDS	0.106	0.090	0.128	0.114	0.127	0.139				
ScaSSS	0.167	0.147	0.192	0.188	0.190	0.206	0.020			
ThauIS	0.071	0.061	0.091	0.052	0.075	0.093	0.147	0.226		
ThauOS	0.045	0.040	0.065	0.038	0.058	0.073	0.118	0.187	0.044	

Moreover, the way individuals group in the PCA analysis from PCAdapt is not based on the population origin, but rather they group into small patches on the graph (figure 4.3). Thus, we hypothesized that the outlier SNPs discovered might reveal some kind of microstructure within each population. Furthermore, each principal component contribution is low (at the most 3.6% for PC1 in Scandola) and does not explain much of the genotypic variance. This might show that only a partial picture of the microstructure was sampled, which should be normal as the sampling was not made to reveal such microstructure. Therefore, the SNP outliers detected by PCAdapt are not linked to our supposed ecological gradients, in accordance to BAYESCAN results.

A reduced representation approach such as RADseq may not cover the genome enough to detect the loci actually under selection (Catchen et al., 2017; Lowry et al., 2017a, 2017b; McKinney et al., 2017). Thus, the fact that no outlier SNP was discovered does not obligatory mean there is none, but this result may come from potentially poor genome coverage of our RADseq in *A. viridis*. However, our SNP density was higher than the ones from studies that did detect SNPs (1 SNP every 15kb in our study against, for example, 1 SNP every 526kb in Berthouly-Salazar et al., 2016).

Moreover, no outlier SNP was found in the sequences of the 10 stress gene markers either. Although on the whole, these markers bore 97 SNPs. Thus, in the population we tested, none of the targeted stress genes were involved in local adaptation, although they did respond to stress *in aquaria* comparable to the environmental variations they faced in these populations. Indeed, those genes see their expression modified according to environmental conditions, probably to maintain homeostasis, at least at the cellular level. But they may therefore be more implicated in acclimation than in adaptation *sensu stricto*, a confusion that may have occurred in the recent literature (Lundgren et al., 2013; Narum and Campbell, 2015; Palumbi et al., 2014; Porcelli et al., 2015; Romero et al., 2015; other reviewed in (DeBiasse and Kelly, 2016). Adaptation *sensu stricto* requires that a genetic variation is linked to the environmental variation (Genotype Environment Association), not only a variation in the expression level of the adaptive gene. Such genetic variation is rarely checked for in transcriptomics analysis (but see Pratlong et al., 2015; Yang et al., 2015). To check if the variation in gene expression level is due to a fixed mutation, common garden experiments, where two populations living in differential environments are tested under common conditions, should be performed. But even then, fixed divergent expression patterns for a gene does not obligatorily mean that this gene itself is under adaptive selection.

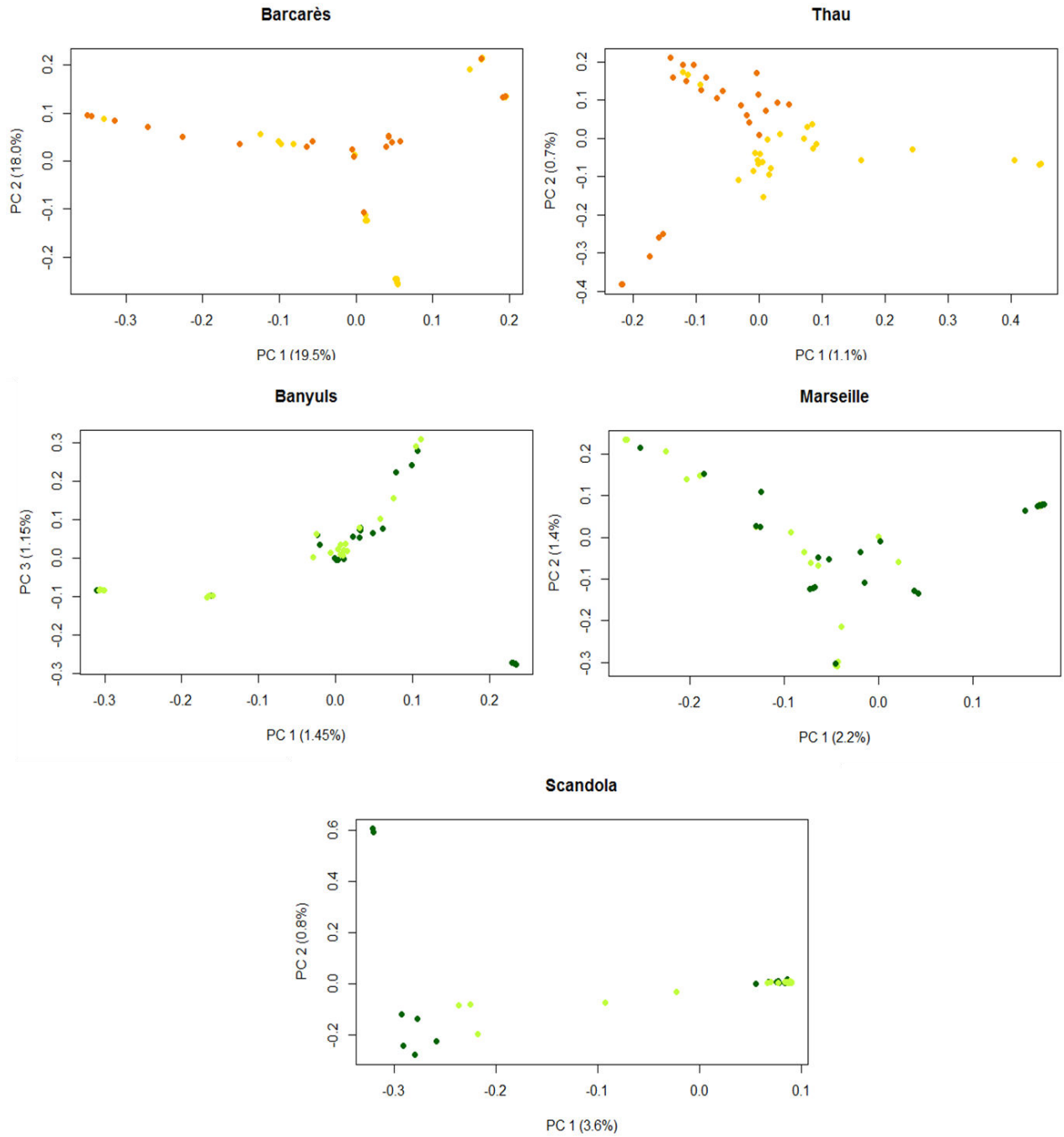


Figure 4.2 : Principal components analysis using PCAdapt package in R. Barcarès and Thau graphs show lagoon (yellow) vs. open water (orange) populations. Banyuls, Marseille and Scandola graphs show shallow (light green) vs. deep water (dark green) populations. Principal component contribution is written on each axe.

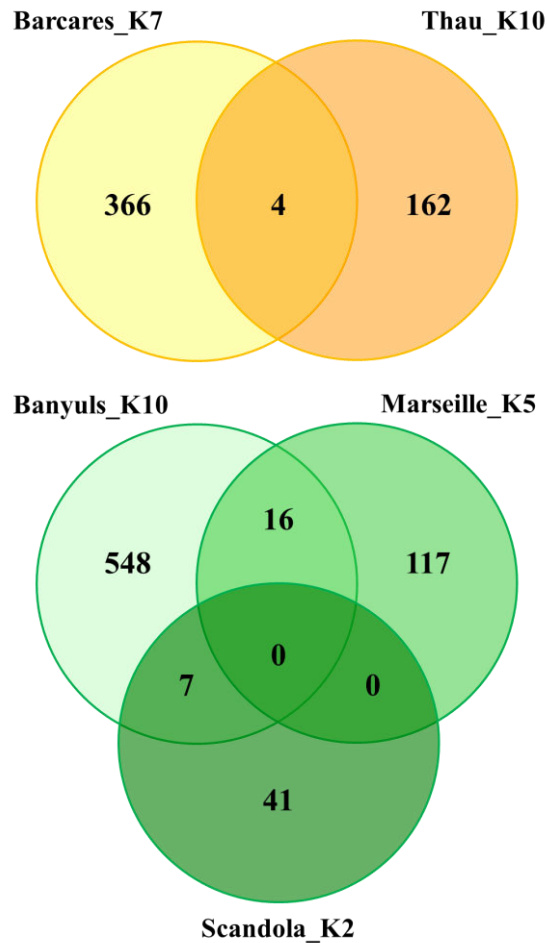


Figure 4.3 : Venn diagram grouping sites with the same ecological patterns. In each circle is written the number of outlier loci detected by PCAadapt and specific to each sites. Numbers within circle intersection shows the number of outlier loci common among populations.

Such genetic variation is rarely checked for in transcriptomics analysis (but see Pratlong et al., 2015; Yang et al., 2015). To check if the variation in gene expression level is due to a fixed mutation, common garden experiments, where two populations living in differential environments are tested under common conditions, should be performed. But even then, fixed divergent expression patterns for a gene does not obligatorily mean that this gene itself is under adaptive selection. This selection could act on the regulator of the expression of this gene, as many biological processes have a polygenic determinism (Rockman, 2012). In conclusion, the use of genome scans to detect outlier loci is a necessary complement to any transcriptomic study that aim at detecting adaptive genes, because the genome scan will point out candidate genes involved in genetic environment associations. Of course, in the light of the coupling hypothesis described by Bierne et al. (2011), candidate genes from genomes scan

still need to be confirmed by testing the allelic variability on the individual fitness in a controlled environment (i.e. common garden experiment).

However, the reason why no outlier was found among our populations could be that these populations did not cross a true ecological gradient. For the shallow *vs.* deep modality, there is no clear variation pattern in the annual temperature profiles between the surface and 10m depth (Bensoussan et al., 2010). However, Davy et al., (1996) showed that due to difference in radiance level, *A. viridis* was more autotrophic in shallow water (1.5m) than in deeper sea water (9m). Nevertheless, no outlier linked to the depth was found in our analysis, suggesting that the physiological variation observed in the literature was due to acclimation processes and not to local adaptation. Concerning the lagoon *vs.* sea modality, our experimental set up followed all recommendations for an efficient detection of outlier loci: i) the two sampled lagoons were ecologically similar compared to other Mediterranean lagoons (Isnard et al., 2015), ii) the *A. viridis* populations from each site were genetically differentiated but belonged to the same gene pool within each site (table 4.2). There again, no outlier linked to this ecological gradient was found. This strengthens the image of *A. viridis* as a plastic organism able to cope with highly variable environments as was shown by Ventura et al. (2016) concerning sea water pH variation tolerance.

4.3 Conclusion

Anemonia viridis does not show any adaptive loci and the lack of outlier specific to one of the environmental gradient in this study shows that the main response of *A. viridis* to changing environmental conditions might be essentially plastic. Alternatively, the lack of outlier in *A. viridis* could also be due to the weak selective pressure exerted by the tested environmental gradients. However, *A. viridis* is a holobionte *i.e.* an association between two partners, an animal host and photosynthetic dinoflagellates. What we detected in this study is a lack of local adaptation in the animal host but the response of its symbionts to the environmental gradients we tested remains to be explored.

Chapitre 5

Conclusions et

Perspectives

5.1 L'origine des morphes d'*Anemonia viridis*

Lors de ce travail de thèse, je me suis intéressé à l'exploration de la diversité génétique neutre et adaptative chez l'anémone de mer *Anemonia viridis* (Forskål, 1775) par l'utilisation de techniques de type Next-Generation Sequencing. La première étape de ce travail a été de déterminer le statut taxonomique des morphes d'*A. viridis*. Nous avons d'abord mis au point des marqueurs de type EPIC sur des gènes dont l'expression est modifiée lors de l'induction d'un stress thermique et/ou UV en aquarium. Par des méthodes d'analyse génétique de délimitation d'espèces, ces marqueurs de gènes de stress nous ont permis de montrer que les morphes *A. viridis* var. *rufescens*, *rustica* et *smaragdina* ne forment pas des lignées indépendantes (**Article 1**). En effet, la différenciation des individus échantillonnés se faisait selon leur origine géographique et non selon leur morphologie. A l'aide d'une analyse complémentaire menée sur des marqueurs RAD, nous avons pu délimiter quatre lignées génétiques réparties géographiquement : une dans la Manche, deux en Méditerranée et une limitée aux var. *rufescens* de Banyuls (**Article 2**). A l'exception de cette dernière, chacune des lignées comprenait plusieurs morphes, montrant ainsi, comme obtenu avec les marqueurs de stress, que la structuration d'*A. viridis* se fait avant tout selon la géographie. Ainsi, par la comparaison des résultats obtenus avec les marqueurs moléculaires a priori non-neutres (marqueurs de gènes de stress) et ceux provenant d'une analyse RADseq plus vaste et moins orientée, nous avons démontré que les marqueurs de gènes de stress sont suffisants pour une étude entrant dans le cadre de la délimitation d'espèces, confortant ce qui n'a été que peu avancé dans la littérature jusqu'à présent (Bensch et al., 2002; Garvin et al., 2010).

La nature des morphes d'*A. viridis* n'étant pas liée à une délimitation entre espèces, quatre hypothèses peuvent être avancées quant à leur origine : i) l'existence de processus de canalisation lors de la croissance ou au stade adulte ; ii) l'existence de variants alléliques sur un nombre de loci limité ; iii) une réponse réversible liée à l'environnement ; iv) l'influence du symbiote dans la différenciation des morphes.

L'hypothèse d'une origine des morphes par un phénomène de canalisation ou celle d'un changement de morphologie en fonction de l'âge de l'anémone est suggérée par la mise en évidence, par une approche de coalescence (SVDQuartets) de quelques sous-groupes mélangeant des individus var. *smaragdina* et var. *rustica*, qui sont, par conséquent, proches génétiquement les uns des autres (**Article 2**). Par exemple, dans la lignée Med1, les individus var. *rustica* et *smaragdina*, provenant de l'étang de Thau, semblent avoir une parenté récente (figure 5.1).

modification du régime alimentaire renforçant la nécessité d'une prédation plus efficace et l'accès à d'autres proies (Haddock et Dunn, 2015). Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer le changement trophique (apport autotrophique vs. prédation hétérotrophique) au sein des deux morphes. Une analyse du pourcentage de la fraction de carbone organique provenant de la photosynthèse des symbiotes pour la respiration animale, i.e. CZAR (Muscatine et al., 1981), pourrait contribuer à vérifier cette stratégie.

Enfin, sachant qu'*Anemonia viridis* est un Cnidaire symbiotique, le rôle potentiel du symbiote dans l'origine des morphes d'*A. viridis* a été testé par l'analyse de la corrélation entre le phénotype de l'hôte animal et le génotype du symbiote *Symbiodinium* sp (**Article 2**). Une fois de plus, nous avons pu mettre en évidence une structuration des populations de *Symbiodinium* au sein des hôtes liée à la géographie et non aux morphes. Le symbiote Dinoflagellé ne semble donc jouer aucun rôle dans la différenciation des morphes d'*A. viridis*. Toutefois, il serait intéressant d'approfondir les études de la diversité génétique des *Symbiodinium* sp. associés. En effet, le marqueur utilisé jusqu'à présent est l'ITS2, marqueur pouvant révéler des variations intra-clade (Bongaerts et al., 2010; LaJeunesse et al., 2003, 2004; Stat et al., 2012). Même si celui-ci est le marqueur le plus utilisé dans le cadre d'études de la distribution biogéographique et de la spécificité hôte/symbiote en mer tropicale, il est possible d'être passé à côté d'une diversité à un niveau taxonomique inférieur. Dans le cadre de la thèse de Barbara Porro actuellement en cours, des marqueurs microsatellites seront utilisés pour explorer la diversité symbiotique. Les marqueurs microsatellites, conduisant à une analyse plus fine de la structuration des populations de symbiotes, permettront de détecter une éventuelle distribution non-aléatoire de ceux-ci entre les morphes d'*A. viridis*.

Néanmoins, des lignées génétiques indépendantes ont été mises en évidence par les loci RAD. De plus, la distribution de la diversité génétique des symbiotes est significativement corrélée aux lignées génétiques de l'hôte. *A. viridis* ayant un mode de transmission des symbiotes par voie maternelle (transmission verticale) (Schäfer, 1984), ce résultat conforte l'existence de ces lignées indépendantes au sein d'*A. viridis*. Pour vérifier le statut taxonomique de ces lignées, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Tout d'abord, il serait utile de tester, au travers de l'utilisation du package R INTROGRESS (Gompert et Alex Buerkle, 2010), le taux d'introgession entre les différentes lignées et plus spécifiquement au sein des lignées Med1 et Med2 qui partagent des individus provenant des sites de Banyuls et de Thau. Par ailleurs, ces résultats pourraient être appuyés par une analyse des capacités de reproduction entre les individus des deux lignées. Au sein du laboratoire, un protocole d'induction de ponte de var. *smaragdina* a été validé (Zamoum et al. in prep). L'induction de la ponte et le suivi de

l'efficacité du développement des embryons et juvéniles d'individus var. *smaragdina* prélevés au sein des différentes lignées pourrait montrer la présence ou l'absence d'un isolement reproducteur, signe de divergence entre espèces naissantes.

5.2 Adaptation locale et plasticité phénotypique chez *Anemonia viridis*

L'étude du potentiel adaptatif d'*A. viridis* avait pour but de déterminer s'il existait des mécanismes adaptatifs qui lui permettrait de survivre face au changement climatique ou si l'anémone était déjà à sa limite de plasticité, comme c'est le cas chez de nombreuses espèces marines (Stat et al., 2012; Sunday et al., 2015). Dans ce but, nous avons échantillonné des populations d'*A. viridis* var. *smaragdina* provenant d'environnements contrastés (surface vs. profondeur et lagune vs. mer) au niveau de 5 sites. A l'aide de marqueurs RAD, nous avons testé l'existence de loci outliers, signalant la présence d'adaptations locales, proxy pour l'étude du potentiel d'adaptation. Sur l'ensemble des outliers identifiés par PCAadapt, seulement 4 loci étaient communs entre les deux répétitions pour la modalité lagune vs. mer, et aucun outlier n'était commun aux trois répétitions de la modalité surface vs. profondeur. Toutefois, les outliers détectés par PCAadapt ne séparaient pas les individus échantillonnés selon la modalité écologique testée. N'étant pas liés au gradient écologique, il est peu probable que ces outliers soulignent une adaptation locale à la vie en lagune ou en profondeur. Par ailleurs, à ces marqueurs RAD, nous avons ajouté 10 marqueurs de gènes de stress dans le but de déterminer si les gènes révélés lors d'études transcriptomiques sont des gènes qui interviennent aussi dans l'adaptation. Nous avons ainsi séquencé ces marqueurs de gènes de stress sur les mêmes individus passés en RADseq. Aucun de ces gènes marqueurs de stress n'a semblé finalement contenir de SNP outliers, ce qui peut laisser penser qu'il est hasardeux de conclure *a priori* que des gènes de réponse au stress identifiés par transcriptomique interviennent dans l'adaptation locale (Evans, 2015; Stillman et Armstrong, 2015). Toutefois, cette démonstration aurait été plus satisfaisante si nous avions par ailleurs trouvé des loci adaptatifs dans nos analyses des marqueurs RAD.

Anemonia viridis est un holobionte qui vit en symbiose avec *Symbiodinium* sp. et un cortège de bactéries associées (Meron et al., 2013; Rocha et al., 2015). Ces bactéries associées ne semblent pas liées à l'adaptation à des sites naturellement acides (i.e. sources de CO₂) (Meron et al., 2013) même si chez certains coraux des bactéries symbiotiques participent à l'adaptation locale (Kelly et al., 2014). Par contre, il a été prouvé chez des coraux tropicaux que *Symbiodinium* sp. jouait un rôle fondamental dans la thermotolérance (Howells et al., 2011). Le fait que nous n'ayons pas trouvé de loci outliers chez l'hôte animal n'exclut

aucunement un potentiel rôle adaptatif des *Symbiodinium* le long des gradients environnementaux testés. L'étude du rôle adaptatif de *Symbiodinium* fait ainsi partie du projet doctoral en cours de Barbara Porro.

Cependant, l'absence d'outlier dans notre analyse pourrait également être due à un faible contraste entre les conditions écologiques testées, ce qui aurait entraîné une trop faible pression de sélection adaptative. Ainsi, une des perspectives proposées serait d'identifier, en conditions naturelles, des gradients écologiques plus marqués et dans lesquels on pourrait trouver *A. viridis*. Par exemple, il faudrait échantillonner la zone intertidale la plus haute (piscines naturelles ou profondeur inférieure à 50cm). De même, une comparaison dans un gradient écologique fort pourrait être faite entre populations de la Manche et de la Méditerranée. Le risque ici est que nous comparerions deux lignées génétiquement différenciées (cf chapitre 3) ce qui amènerait très probablement à la détection de nombreux faux positifs. Dans tous les cas, il serait intéressant de tester en « common garden » le potentiel de réponse au stress des différentes lignées.

En conclusion, ni la variabilité morphologique, ni la capacité à coloniser des habitats différenciés ne sont dus à une différenciation génétique chez *Anemonia viridis*. Nous savons aussi que, potentiellement, c'est une espèce longévive qui vit dans des environnements très fluctuants. *Anemonia viridis* semble donc être un organisme hyper plastique. Ceci nous laisse penser, que cet organisme a le potentiel nécessaire à sa survie face au changement climatique à venir grâce à sa propre plasticité phénotypique.

Annexe A : Protocole de mise au point des EPIC

1. Recherche d'orthologues chez *Nematostella vectensis* et *Acropora digitifera*

Un problème se pose lorsque l'on cherche des EPIC à partir d'une banque d'ESTs. En effet, la banque d'ESTs d'*Anemonia viridis* étant construite à partir de l'expression d'ARNm, elle ne donne pas l'accès aux introns des gènes. Pour cela, il a fallu faire une recherche de gènes orthologues chez des cnidaires dont le génome a été séquencé. A partir de ces génomes, il a été possible de définir des introns dont la position sur les gènes d'intérêt est plus ou moins conservée. Deux génomes de cnidaires sont disponibles : *Nematostella vectensis* (Grigoriev et al. 2012) et *Acropora digitifera* (Dana, 1846).

1.1 Orthologues chez *Nematostella vectensis*

Après acquisition du contig du gène d'intérêt par la banque d'ESTs d'*Anemonia viridis*, une recherche de séquences similaires par BLASTX sur la base de données du JGI (Grigoriev *et al.* 2012) a permis d'obtenir la protéine d'intérêt chez *Nematostella vectensis*. Par la suite, à l'aide d'un tBLASTn, nous avons obtenu le transcrit et le gène d'intérêt orthologue chez *N. vectensis*.

1.2 Orthologues chez *Acropora digitifera*

De manière similaire, les gènes et les transcrits d'*Acropora digitifera* ont été obtenus via un BLASTX suivi d'un tBLASTn de la base de données « OIST Marine Genomics Unit ».

1.3 Orthologues chez d'autres Cnidaires

Finalement, une recherche générale par mot clé à l'aide du logiciel SRS de l'EBI sur la base de données EMBL a permis de récupérer tout fragment d'ADN de Cnidaire orthologue aux contigs d'*Anemonia viridis*. Dans le cas où aucune information n'a été trouvée sur EMBL via SRS, un BLASTn (paramètres par défaut) général sur la base de données NCBI a été effectué.

2. Alignement

Pour chaque gène, après avoir récupéré tous les transcrits et autres fragments d'ADN, un alignement à l'aide du logiciel Geneious (Kearse *et al.* 2012) a été effectué en deux étapes :

- la première consistait à aligner le contig d'*Anemonia viridis* sur les gènes de *Nematostella vectensis* et d'*Acropora digitifera* afin de repérer la position des introns ainsi que leurs tailles respectives;
- la seconde visait à aligner le contig avec toutes les séquences orthologues obtenues afin de définir les zones les plus conservées autour des introns potentiels pour l'identification ultérieure de paires d'amorces.

De manière générale, le logiciel utilisé pour l'alignement était celui de Geneious avec comme matrice de coût +5/-4 (similarité 65%), une pénalité d'ouverture de gap de 50 et une pénalité d'extension de gap de 3. Ces paramètres ont été choisis de manière à favoriser la création d'un faible nombre de gap mais de longueur non prédéfinie, pouvant correspondre aux introns. Le but de cet alignement était de trouver des introns conservés et de petite taille car ceux-ci sont compatibles avec les méthodes de séquençage directes qui seront utilisées dans le cadre futur d'un projet ANR (= Association Nationale de la Recherche).

3. Identification d'amorces spécifiques pour les EPIC potentiels

Selon l'alignement précédemment décrit, il est possible de définir des zones dans chaque contig d'*Anemonia viridis* dont la probabilité de contenir un intron est grande. L'étape suivante consistait donc en l'identification d'amorces dans les exons, dans le but d'amplifier un intron potentiel (=EPIC), à l'aide du logiciel Primer3 (Rozen *et al.* 1999).

Après avoir ciblé par homologie la zone à amplifier sur le contig d'*Anemonia viridis*, nous avons prédéfini une taille idéale des amorces à 23 bases et une température d'hybridation (T_m) de 60 ± 5°C. Enfin, après l'obtention d'une paire d'amorces valable, celle-ci a été alignée à toutes les séquences orthologues afin de vérifier qu'elle se trouvait dans une région plus ou moins conservée des exons.

4. Procédure de validation des amorces

Chaque paire d'amorces a ensuite subi une série de tests visant à vérifier que l'amplification se fait de manière spécifique à la séquence d'ADN désirée. On peut la résumer en deux points :

- recherche de la température d'hybridation optimale et test de spécificité;
- séquençage des amplifiats de l'ensemble des individus échantillonnés.

4.1 Température d'hybridation optimale et test de spécificité

Le premier test a été de déterminer la température d'hybridation optimale de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Les PCR ont été réalisées sur deux thermocycleurs « MasterCycler Eppendorf » (dont un permettant des PCR en gradient de température) selon le protocole décrit dans le tableau 1.

Tableau 1: Différentes étapes d'une réaction classique d'amplification par PCR

Etape	Température et temps
Activation	3 minutes à 95°C (au premier cycle uniquement)
Dénaturation	30 secondes à 95°C
Hybridation	30 secondes à T° définie (ou gradient bas, normal, haut)
Elongation	2 minutes à 72°C
Nombre de cycles	35 cycles

Au départ, chaque réaction PCR a été réalisée sur un volume total de 25µl en mélangeant le Buffer 10x du kit PCR de Qiagen® (solution de KCl et (NH₄)₂SO₄) à concentration finale de 1X, du MgCl₂ à concentration finale de 2mM, des dNTP de concentration finale 0,2mM, l'amorce directe et l'amorce inverse pour une concentration finale de chacune de 1mM, 0,780U de Taq Polymerase Platinum de Qiagen®, un échantillon d'ADN de concentration finale entre 24 et 120 ng/µl.

Afin de définir le T_m optimal, trois gradients différents ont été appliqués :

- gradient « normal », autour des conditions optimales définies lors de la recherche d'amorces avec Primer3, correspondant aux températures de 56,1°C, 57,7°C, 60,1°C et 62°C (59±3°C);

- gradient « haut » ($65\pm 3^{\circ}\text{C}$, correspondant aux températures de $62,1^{\circ}\text{C}$, $63,7^{\circ}\text{C}$, $66,1^{\circ}\text{C}$ et 68°C);
- gradient « bas » ($53\pm 3^{\circ}\text{C}$, correspondant aux températures de $50,1^{\circ}\text{C}$, $52,4^{\circ}\text{C}$, $54,1^{\circ}\text{C}$ et 56°C).

D'autres facteurs ont pu être modifiés pour optimiser les conditions PCR tels que la concentration en ADN et la concentration en MgCl_2 . Toutes les PCR gradients ont été réalisées sur le même échantillon d'ADN (individu var. *smaragdina* Ban1S).

Après chaque PCR, un gel d'électrophorèse en agarose 2 % dans une solution de TAE 1X ou TBE 0.5X, dans lequel a été ajouté du GelRed (agent intercalant, concentration finale 0,25X), a été réalisé pour déterminer s'il y a eu amplification ainsi qu'une estimation grossière de la taille des fragments amplifiés. Après migration, les bandes ont été révélées par un imageur « Syngene G.Box » à l'aide du logiciel « Genesnap version 7.12 ».

Après validation du T_m optimal pour une paire d'amorces, une nouvelle PCR a été réalisée sur l'ensemble des individus échantillonnés à l'aide de cette paire d'amorces et selon le même protocole décrit précédemment. Afin d'augmenter la résolution des bandes, les profils d'amplification ont été révélés par différents gels d'électrophorèse en fonction de la taille estimée antérieurement :

- pour une taille comprise entre 100 et 300 pb : la révélation s'est faite sur un gel de polyacrylamide 8 % dans une solution de TBE 1X;
- pour une taille comprise entre 300 et 500 pb : la révélation a été réalisée à l'aide d'un gel de polyacrylamide 5 % dans une solution de TBE 1X;
- pour une taille supérieure à 500 pb : nous avons utilisé un gel d'agarose 0,8 % dans une solution de TAE 2X.

Ce point visait à vérifier que l'amplification se faisait de manière fiable et reproductible sur l'ensemble des individus échantillonnés. Si ce n'était pas le cas, les conditions d'amplification pouvaient être modifiées.

4.2 Séquençage de l'ensemble des individus échantillonnés

La dernière étape consistait à vérifier que l'amplifié (= fragment d'ADN amplifié par PCR) correspondait à un fragment du gène d'intérêt. Pour cela, deux individus ont tout d'abord été envoyés à séquencer au « Macrogen European Laboratory » selon la méthode Sanger. Les résultats obtenus ont été lus à l'aide du logiciel Aligner (CodonCode Corporation, version

3.7.1). Dans le cas où les fragments amplifiés chez les deux individus correspondaient au gène d'intérêt, le reste des individus échantillonnés a été envoyé à séquencer.

Annexe B : Protocole de mise au point des banques RAD

Mise au point pour les espèces Anemonia viridis

Version 3 : Novembre 2015 (modifié d'après le protocole d'Alexandre Gagnaire et Etter et al. 2012)

Remarques préliminaires à la construction des banques

Ce protocole a été mis au point pour la construction de 4 banques RAD de 32 individus. Par la suite, des banques allant jusqu'à 44 individus ont été faites.

Dans chacune des banques, il est préférable d'associer des individus ayant les mêmes qualités d'ADN et/ou de contamination en zooxanthelles (valable pour *A. viridis*).

Etape 1. : Dilution des ADN

Il est nécessaire de préparer les plaques de dilution au préalable de manière à avoir 1µg d'ADN pour chaque individu (volume total = 40µl ou 44.5µl). S'il est impossible de mettre 1µg pour chaque individu, il faut diminuer la quantité d'ADN pour l'ensemble des individus. Il est plus facile de préparer des dilutions dans des barrettes de 8 tubes.

Etape 2. : Digestion avec l'enzyme de restriction Pst1 pour *A. viridis*

2.1 Préparation du Master Mix (1 banque)

Mix préparé pour une banque de 32 individus.

Master Mix <i>A. viridis</i>	1 tube	35 tubes
Pst1	0,25 µl	8,75 µl
Buffer 3.1 10X (NEB)⁷ congelé	5 µl	175 µl
H₂O milliQ	4,75 µl	166,25 µl
Total	10 µl	

Ordre de préparation du mix : H₂O > 10X > enzyme.

Distribuer 10µl de Master Mix par tube (volume total = 50µl).

* Pour les 2 premières banques, l'eau avait déjà été mise dans la dilution.

⁷ Dans le cas où il n'y a plus de buffer 3.1, on peut utiliser le buffer 2.1 mais son efficacité est de 75%. Dans ce cas, passer l'étape de digestion à 1h30 à la place d'1h.

2.2 Incubation en thermocycleur

Pour chacune des banques :

- Digestion enzymatique : 60 min à 37°C
- Annihilation : 20 min à 65°C pour Pst1 (non cutsmart) et 20 min à 80°C pour Sbf1 (cutsmart)
- 1 min à 64°C pour Pst1 (non cutsmart) et 1 min à 79°C pour sbf1 (cutsmart)
- Maintenir thermocycleur à 20°C

Refroidissement des barrettes dans le thermocycleur. Laisser les barrettes descendre à température de la pièce.

Etape 3. : Ligation des adaptateurs P1 (1 banque)

Associer un barcode différent à chaque individu.

3.1 Préparation du Master Mix

Master Mix	1 tube	35 tubes
Buffer T4 (NEB) congelé	1 µl	35 µl
DTT (500mM) congelé	1 µl	35 µl
rATP 100mM (Promega) congelé	0,5 µl	17,5 µl
T4 ligase (2 000 000U/ml)	0,5 µl	17,5 µl
Total	3 µl	

Ordre de préparation du mix : 10X > rATP > ligase.

Les adaptateurs P1 sont sortis du congélateur en même temps que les autres réactifs pour leur laisser le temps de s'équilibrer à température ambiante.

3.2 Préparation des adaptateurs P1

Concentration des adaptateurs : 100nM dans le tampon AB.

Distribuer dans chaque tube (volume final 60µl) :

- 7 µl d'adaptateur P1
- 3 µl de mix de ligation
- Maintenir thermocycleur à 20°C

La ligation peut se faire à température ambiante mais c'est mieux d'utiliser un thermocycleur pour obtenir des conditions identiques pour toutes les banques.

3.3 Incubation en thermocycleur

Pour chacune des banques :

- 60 min à 22°C
- 10 min à 65°C
- 1 min à 64°C

Refroidissement des barrettes dans le thermocycleur. Laisser les barrettes descendre à température de la pièce.

Etape 4. : Multiplexage des individus (1 banque)

4.1 Multiplexage + prélèvement D1

Chaque banque est réalisée en mélangeant 20 µl du produit de digestion-ligation (càd 1/3 du produit) de chaque individu dans un tube 1,5ml Low Binding, pour un volume final de 640µl et une quantité totale de 10,67µg d'ADN (pour les banques à quantité d'ADN initial de 1µg par individu).

Prélever 2µl de chaque mélange et diluer avec 6µl d' H₂O milliQ pour effectuer un dosage au spectrofluorimètre SFAS FLX-Xenius et un dosage au bioanalyzer, la valeur attendue (pour les banques à quantité d'ADN initial de 1µg par individu) est de 16,67 ng/µl ((25*40)/60). Ceci se fera en combiné avec d'autres dosages (étape 20). Pour le dosage au spectrofluorimètre, utiliser 6µl de la dilution D1.

4.2 Contrôle de ligation des adaptateurs P1

Utilisation d'un bioanalyzer et du kit DNA high sensitivity (Agilent). Prélever 1µl de la dilution D1.

La présence d'un pic vers 130pb atteste du succès de la ligation (dimère de ligation). On effectue les vérifications de ligation pré-sonication dans les puits restants de la puce de vérification de la sonication.

Il y a 11 pistes disponibles pour une puce.

Etape 5. : Sonication (1 banque)

Après multiplexage, il reste 638µl par banque. Répartir ces 638µl en 2 tubes 1,5ml Low Binding de 319µl (ajuster le volume si nécessaire).

Ajouter le même volume en H₂O milliQ (càd 319µl) dans chaque tube pour réaliser une dilution 1/2.

Donc, pour chacune des banques, on a 2 tubes de 638µl (total = 1276µl).

La totalité du volume des 2 tubes de chaque banque est soniqué par fraction de 100µl transférées dans un microtube Covaris. Un tube Covaris par banque est suffisant.

Transférer le produit soniqué dans un nouveau tube 1,5ml Low Binding.

Le volume de la dernière fraction sera complété à 100µl avec du produit déjà soniqué au besoin.

5.1 Paramètres de sonication

Temperature : 7°C

Intensity : 4

Duty cycle : 10 %

Cycle per burst : 2000

Temps de sonication *A. viridis* : 60 secondes

Rem : La machine Covaris ne peut faire de traitement supérieur à 60 secondes.

Vérifier que la cuve Covaris soit remplie d' H₂O milliQ et qu'elle est à 7°C avant de débiter.

Lors de la sonication, la température du bain peut augmenter légèrement et dépasser 7°C. La machine se met alors en sécurité et interrompt la sonication. Il suffit alors de lui demander de reprendre le traitement.

Etape 6. : Contrôle de sonication au bioanalyzer + prélèvement D2 (1 banque)

On prélève un aliquot de 2µl de chaque banque que l'on dilue avec 2µl d' H₂O milliQ pour éviter tout risque de saturation du signal (dosage D2). 1µl sera utilisé pour le bioanalyzer et 3µl seront utilisés pour le dosage au spectrofluorimètre (étape 20).

La distribution optimale des fragments doit être maximale entre 300 et 600pb. On retrouvera le pic à 130pb.

Protocole Bioanalyzer disponible à l'étape 19.

Etape 7. : Purification/reconcentration des banques + prélèvement D3 (1 banque)

Cette étape permet d'éliminer les restes d'enzyme de digestion et de ligation cumulées aux étapes précédentes, et de reconcentrer les banques avant l'étape de sélection de taille. On utilise des colonnes Macherey-Nagel Nucleospin Gel and PCR Clean-up. Chaque banque est purifiée sur deux colonnes en parallèle pour éviter de surcharger la colonne.

Protocole :

1. Séparer les 1274µl de chaque banque en 3 tubes contenant environ 424µl de banque
2. Ajouter 2 volumes de tampon NT1 (848µl) pour 1 volume de banque (424µl) dans chaque tube, vortexer et centrifuger
3. Déposer au maximum 700µl par colonne, en utilisant deux colonnes par banque
4. Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de paillasse) et vider l'éluat du tube collecteur
5. Répéter les étapes 3 et 4 trois fois pour passer toute la banque, en vidant l'éluat du tube collecteur après chaque centrifugation
6. Laver avec 700µl de tampon NT3
7. Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de paillasse) et vider l'éluat du tube collecteur

8. Sécher la colonne en centrifugeant 1min à 11000g. Retirer délicatement la colonne sans rentrer en contact avec l'éluat, et s'assurer qu'il n'y a plus de buffer résiduel sinon recentrifuger
9. Laisser la colonne ouverte 2 min sur un tube 1,5ml Low Binding pour évaporer les résidus d'éthanol
10. Déposer 30µl de tampon d'éluion NE⁸ sur la colonne (bien placer le tampon au centre de la colonne et pas sur le côté du tube). Incuber 1 min à température ambiante puis centrifuger 1 min à 11000g
11. Mélanger les deux éluats de chaque tube, on récupère ainsi environ 60µl.

Rem : ne pas chauffer le tampon d'éluion, ceci a pour conséquence d'enrichir l'éluat en produit riche en AT.

Prélever 2µl de chaque mélange à diluer avec 2µl d' H₂O milliQ pour effectuer un dosage en spectrofluorimètre SFAS FLX-Xenius (dosage D3). Ceci se fera en combiné avec d'autres dosages (étape 20).

Etape 8. : Sélection de taille (1 banque)

Cette étape permet d'éliminer les dimères d'adaptateurs P1 présents dans la solution et d'obtenir des fragments de tailles optimales pour le séquençage. Les tailles de fragments à découper doivent être comprises entre 300pb et 600pb.

Avant de faire migrer le gel, nettoyer les cuves au DNazap. Préparer du TAE 1X ultra pur pour remplir les cuves et préparer le gel. Entre chaque gel, nettoyer et remplir les cuves à nouveau.

- Faire des puits de grande capacité en scotchant 2 puits du peigne ensemble pour une banque⁹
- Préparer un gel 1,2 % d'agarose low melt TAE 1X (gel de 50ml)
- Ajouter 12µl d'Orange-G loading Dye (NEB) aux 57µl de banque
- Charger la totalité des 69µl sur gel (un puits)
- Charger 5µl de marqueur de taille (100bp ladder Invitrogen) dans des puits adjacents
- Migrer à 40V 10min pour faire rentrer l'ADN dans le gel puis à 60V pendant environ 1h20 jusqu'à ce que l'Orange-G soit au 3/4 du gel au moins
- Découper sur gel entre 300 et 600pb
- Placer le produit d'excision dans un tube 1,5ml Low Binding préalablement pesé
- Déterminer le poids de gel et passer directement à l'étape 9

Etape 9. : Purification/reconcentration des banques + prélèvement D4 (1 banque)

On utilise des colonnes Macherey-Nagel Nucleospin Gel and PCR Clean-up. Attention, le protocole est légèrement différent de celui utilisé précédemment.

La dissolution du gel est réalisée à température ambiante pendant 30min pour améliorer la représentation des régions riches en AT. Mélanger les tubes de temps en temps.

⁸ Pour un meilleur rendement, éluer avec 2 fois 15µl à la place d'une fois 30µl par colonne.

⁹ Pour les peignes de 8, fusionner 2 puits ensemble pour déposer une banque. Pour les peignes de 12, fusionner 3 puits ensemble. Pour les peignes de 16, fusionner 4 puits ensemble et 2 puits pour le marqueur de poids moléculaire.

Protocole :

1. Ajouter l'équivalent de 200µl de tampon NT1 pour 100mg de gel
2. Incuber en agitant toutes les 2 min pour dissoudre le gel
3. Déposer au maximum 700µl sur la colonne, en utilisant une seule colonne par banque
4. Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de paillasse) et vider l'éluat du tube collecteur
5. Répéter les étapes 3 et 4 deux fois pour passer toute la banque, en vidant l'éluat du tube collecteur après chaque centrifugation
6. Laver avec 700µl de tampon NT3
7. Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de paillasse) et vider l'éluat du tube collecteur
8. Re-laver avec 700µl de tampon NT3
9. Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de paillasse) et vider l'éluat du tube collecteur
10. Sécher la colonne en centrifugeant 1 min à 11000g (10500rpm). Retirer délicatement la colonne sans entrer en contact avec l'éluat, et s'assurer qu'il n'y a plus de buffer résiduel
11. Laisser la colonne ouverte 2 min sur un tube 1,5ml Low Binding pour évaporer les résidus d'éthanol
12. Déposer 30µl de tampon d'éluat NE (ou 2 fois 15µl) sur la colonne. Incuber 1 min à température ambiante puis centrifuger 1 min à 11000g (10500rpm)

Rem : ne pas chauffer le tampon d'éluat, ceci a pour conséquence d'enrichir l'éluat en produit riche en AT.

Prélever 1µl de chaque mélange que l'on dilue avec 1µl d' H₂O milliQ pour effectuer un dosage en spectrofluorimètre SFAS FLX-Xenius (dosage D4). Voir étape 20.

Etape 10.: End repair (4 banques)

Cette étape permet de compléter les extrémités des fragments d'ADN double brin afin d'obtenir des extrémités double brin franches.

<i>Blunting Master mix</i>	1 tube	4,5 tubes
Blunting buffer 10X (NEB) congelé	3,75 µl	16,875 µl
DNTP mix (100mM) congelé	3,75 µl	16,875 µl
Blunt Enzyme Mix	1,5 µl	6,75 µl
<i>Total</i>	<i>9 µl</i>	

- Ajouter 9µl de Blunting mix aux 29µl de chaque banque, vortexer et centrifuger.
- Incuber 45 min à température ambiante.

Etape 11.: Purification post End repair (1 banque)

Cette étape permet d'éliminer les restes de blunt enzyme ajoutés à l'étape précédente.

On utilise des colonnes Macherey-Nagel Nucleospin Gel and PCR Clean-up. **Attention, le protocole est légèrement différent de celui utilisé précédemment.**

Protocole :

- Ajouter 2 volumes de tampon NT1 (76µl) pour 1 volume de banque (38µl), vortexer et centrifuger
- Déposer la totalité sur colonne
- Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de pailasse) et vider l'éluat du tube collecteur
- Laver avec 700µl de tampon NT3
- Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de pailasse) et vider l'éluat du tube collecteur
- Sécher la colonne en centrifugeant 1 min à 11000g (10500rpm). Retirer délicatement la colonne sans rentrer en contact avec l'éluat, et s'assurer qu'il n'y a plus de buffer résiduel sinon recentrifuger
- Laisser la colonne ouverte 2 min sur un tube 1,5ml Low Binding pour évaporer les résidus d'éthanol
- Déposer 41µl de tampon d'éluat NE sur la colonne. Incuber 1 min à température ambiante puis centrifuger 1 min à 11000g (10500rpm).

Rem : ne pas chauffer le tampon d'éluat, ceci a pour conséquence d'enrichir l'éluat en produit riche en AT.

Etape 12.: 3' dA overhang addition (4 banques)

Cette étape permet d'ajouter une base « A » aux extrémités 3' des fragments d'ADN à extrémité double brin franche phosphorylée afin de permettre la ligation des adaptateurs P2 à l'étape suivante.

<i>Overhang 3' Addition Master mix</i>	1 tube	4,5 tubes
Buffer 2 10x (NEB) congelé	5 µl	22,5 µl
dATP mix (100mM) congelé	1 µl	4,5 µl
Klenow Enzyme (exo-)	3 µl	13,5 µl
<i>Total</i>	<i>9 µl</i>	

- Ajouter 9µl de Overhang 3' addition master mix à chaque banque, vortexer et centrifuger.
- Incuber 30 min à 37°C au bain marie, puis laisser équilibrer à température de la pièce.

Etape 13.: Purification post 3' dA overhang addition (1 banque)

Cette étape permet d'éliminer les restes d'enzymes ajoutés à l'étape précédente.

On utilise des colonnes Macherey-Nagel Nucleospin Gel and PCR Clean-up. Attention, le protocole est légèrement différent de celui utilisé précédemment.

Protocole :

- Ajouter 2 volumes de tampon NT1 (100µl) pour 1 volume de banque (50µl), vortexer et centrifuger
- Déposer la totalité sur la colonne
- Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de paillasse) et vider l'éluat du tube collecteur
- Laver avec 700µl de tampon NT3
- Centrifuger 30 sec à 11000g (10500rpm sur la centrifugeuse de paillasse) et vider l'éluat du tube collecteur.
- Sécher la colonne en centrifugeant 1 min à 11000g (10500rpm). Retirer délicatement la colonne sans rentrer en contact avec l'éluat, et s'assurer qu'il n'y a plus de buffer résiduel sinon recentrifuger
- Laisser la colonne ouverte 1 à 2 min sur un tube 1,5ml Low Binding pour évaporer les résidus d'éthanol
- Déposer 43µl de tampon d'éluat NE sur la colonne. Incuber 1 min à température ambiante puis centrifuger 1 min à 11000g (10500rpm).

Rem : ne pas chauffer le tampon d'éluat, ceci a pour conséquence d'enrichir l'éluat en produit riche en AT.

Etape 14.: Ligation de l'adaptateur P2 (4 banques)

Cette étape permet d'ajouter les adaptateurs P2 aux extrémités des fragments d'ADN double brins afin de permettre l'enrichissement en fragments P1-P2 à l'étape de PCR avec les amorces RAD-F et RAD-R.

14.1 Annealing de l'adaptateur P2

Préparation du buffer AB 10X (1ml) :

- 100µl NaCl 500mM
- 100µl Tris-Cl¹⁰ 100mM
- 800µl d' H₂O milliQ
- Passer le buffer AB au thermocycleur à gradient Ben, programme P2Annea.
- Ensuite, mélanger 5µl de P2F, 5µl de P2R, 5µl d'AB buffer et 35µl d' H₂O milliQ.

¹⁰ Tris-Cl ou Tris-HCl est une solution de Tris équilibrée, ici, à pH entre 7,5 et 8 à l'aide de HCl

14.2 Ligation

<i>P2 ligation Master mix</i>	1 tube	4,5 tubes
Buffer T4 (NEB) congelé	5 μ l	22,5 μ l
rATP mix 100mM (Promega)¹¹ congelé	0,5 μ l	2,25 μ l
T4 ligase (2 000 000U/ml)	1 μ l	4,5 μ l
<i>Total</i>	<i>6,5 μl</i>	

- Ajouter 0,5 μ l¹² d'adaptateur P2 10 μ M à chaque banque.
- Ajouter 6,5 μ l de P2 ligation Master mix à chaque banque, vortexer et centrifuger.
- Incuber 1h à température ambiante¹³. Stocker à -20°C si nécessaire.

Etape 15.: Purification sur billes post ligation P2 + prélèvement D5 (1 banque)

On utilise le kit purification sur billes Agencourt AMPure XP.

Cette étape permet d'éliminer les restes d'enzyme de ligation ajoutés à l'étape précédente ainsi que les résidus de P2. Cette méthode est plus longue à réaliser et plus coûteuse qu'une purification sur colonne mais permet d'obtenir de meilleurs rendements à ce stade de la préparation de banque.

Le volume total pour une banque est de 50 μ l.

Protocole :

1. Vortexer légèrement le flacon de billes pendant 30 sec
2. Ajouter 0,8V de billes càd 40 μ l et faire des aller-retour jusqu'à ce que le mélange soit homogène¹⁴
3. Incuber 5 min à température ambiante
4. Disposer les tubes sur le portoir magnétique, attendre 2 min que les billes se collent à la paroi du tube (il faut que la solution soit transparente) et jeter le surnageant transparent
5. Laver avec 200 μ l d'EtOH 70 %
6. Faire un up & down avec les tubes placés sur le portoir magnétique, sortir les tubes du portoir et centrifuger brièvement
7. Replacer le tube sur le portoir magnétique et attendre 2 min et jeter le surnageant jusqu'à la dernière goutte
8. Refaire les étapes 5 à 7
9. Laisser sécher les billes sur le portoir magnétique bouchon ouvert pendant 10 min environ jusqu'à ce que l'EtOH soit complètement évaporé, sans toutefois sur-sécher les billes¹⁵

¹¹ Il y a des aliquots au -20°C

¹² Au départ, nous mettions 1 μ l mais il apparaissait alors une bande à 120pb post-PCR qui diminuait les rendements de PCR

¹³ 25°C, d'où s'il fait trop froid dans la pièce, mettre dans le four à hybridation

¹⁴ S'il y a des bulles, tapoter légèrement le tube pour les supprimer

10. Retirer les tubes du portoir, ajouter 32µl de tampon EB (Qiagen Tris-HCl 5mM), et resuspendre à la pipette en faisant des aller-retour
11. Incuber 5 min à température ambiante
12. Centrifuger brièvement et placer sur le portoir magnétique pendant 2 min
13. Transférer le surnageant transparent dans un nouveau tube 1,5ml Low Binding
14. S'il reste encore un peu de billes dans le surnageant, répéter l'étape 12 et 13.

Prélever 2µl de chaque mélange à diluer avec 2µl d' H₂O milliQ pour effectuer un dosage en spectrofluorimètre SFAS FLX-Xenius (dosage D5). Voir étape 20.

Etape 16.: Test d'amplification des banques + prélèvement D6 (4 banques)

Cette étape permet de tester le succès de la construction des banques. Pour éviter de perdre du matériel, on réalise un seul test d'amplification 14, 16 ou 18 cycles (*A. viridis* et *C. Glaucum*). Faire un T-.

<i>PCR Master mix</i>	1 tube	5,5 tubes
H₂O milliQ	8,5 µl	46,75 µl
Phusion High fidelity 2X MM congelé	12,5 µl	68,75 µl
RAD-F 10µM congelé	1 µl	5,5 µl
RAD-R 10µM congelé	1 µl	5,5 µl
RAD library template	2 µl	2 µl/tube
<i>Total</i>	<i>25 µl</i>	

Paramètres de la PCR : Programme RAD22cy sur Nuts.

Vérifier le succès de l'amplification sur gel d'agarose classique (volume 50ml, agarose 1 %, TAE 1X, dépôt de 5µl de produit PCR) et doser 10µl en spectrofluorimètre SAFAS FLX-Xenius sans diluer (Dosage D6). Le dosage se fera en combiné avec d'autres dosages (étape 20).

S'il n'y a pas de bande à 120pb sur le gel d'agarose de la PCR test, faire une purification finale avec le kit Invitrogen Charge Switch and PCR Clean-up. S'il y a toujours une bande à 120pb faire la purification finale avec le kit purification sur billes Agencourt AMPure XP.

¹⁵ L'EtOH n'est pas bon pour les PCR après, c'est pour cela qu'il faut être sûr que tout l'EtOH se soit évaporé. Sur-sécher rend la remise en suspension plus difficile. Enfin, le culot est suffisamment sec quand des craquelures apparaissent sur le culot de billes

Etape 17.: Amplification finale des banques (4 banques)

On réalise 6 PCR selon les mêmes conditions que lors de l'amplification test. Faire un T-.

<i>PCR Master mix</i>	1 tube	26 tubes
H₂O milliQ	8,5 µl	221 µl
Phusion High fidelity 2X MM congelé	12,5 µl	325 µl
RAD-F 10µM congelé	1 µl	26 µl
RAD-R 10µM congelé	1 µl	26 µl
RAD library template	2 µl	2 µl/tube
<i>Total</i>	<i>25 µl</i>	

Etape 18.: Purification sur billes post amplification finale + prélèvement D7 (1 banque)

En utilisant le kit Invitrogen Charge Switch and PCR Clean-up.

A priori, il y a 30µl avec lesquels je peux faire des PCR. 2µl ont été utilisés pour la PCR test (reste 10µl de produit). Le potentiel PCR est donc de 14 PCR pour un volume total de 360µl.

Protocole :

- Séparer chaque banque en deux tubes contenant 180µl de produit PCR
- Vortexer gentiment le tube contenant les billes magnétiques ChargeSwitch pour les resuspendre et les distribuer équitablement dans le buffer de stockage
- Binding DNA :
 1. Ajouter 180µl du purification buffer (N5annoté 1) dans le tube
 2. Ajouter 10µl de la solution de billes magnétiques ChargeSwitch resuspendues et faire des aller-retour gentiment avec la pipette pour mélanger sans former de bulles
 3. Incuber à température ambiante pendant 2 min
 4. Placer le tube sur le portoir magnétique pendant 2 min jusqu'à ce que les billes forment une pelote serrée
 5. Sans enlever le tube du portoir magnétique, pipetter et jeter le surnageant sans perturber la pelote de billes (la pipette doit être positionnée de manière à ce qu'elle pointe dans la direction opposée à la pelote)
 6. Procéder immédiatement à l'étape washing DNA
- Washing DNA :
 1. Retirer le tube contenant la pelote de billes magnétiques du portoir magnétique
 2. Ajouter 150µl du Wash buffer (W12, annoté 2) dans le tube et faire des aller-retour gentiment pour mélanger sans former de bulles
 3. Placer le tube sur le portoir magnétique pendant 2 min jusqu'à ce que les billes forment une pelote serrée

4. Sans enlever le tube du portoir magnétique, pipetter et jeter le surnageant sans perturber la pelote de billes (la pipette doit être positionnée de manière à ce qu'elle pointe dans la direction opposée à la pelote)
5. Répéter une fois les points 1-4 de l'étape Washing DNA
6. Procéder immédiatement à l'étape Eluting DNA
- Eluting DNA :
 1. Retirer le tube contenant la pelote de billes magnétiques du portoir magnétique
 2. Ajouter 15µl d'Elution buffer (E5 ; 10mM Tris-HCl, pH = 8,5 ; annoté 3) dans le tube et faire des aller-retour gentiment pour mélanger sans former de bulles
 3. Incuber à température ambiante pendant 2 min
 4. Placer le tube sur le portoir magnétique pendant 2 min jusqu'à ce que les billes forment une pelote serrée
 5. Sans enlever le tube du portoir magnétique, transférer en pipettant le supernageant contenant le produit purifié dans un nouveau tube 1,5ml Low Binding
- Rassembler les deux tubes par banque en un seul tube contenant alors 30µl de banque finale
- Prélever 2µl de chaque mélange à diluer avec 2µl d' H₂O milliQ pour effectuer un dosage en spectrofluorimètre SFAS FLX-Xenius (1µl pour la puce bioanalyzer et 3µl pour le spectrofluorimètre). Ceci se fera en combiné avec d'autres dosages (étape 20). La concentration doit être supérieure à 10ng/µl.

En utilisant le kit purification sur billes Agencourt AMPure XP.

A priori, il y a 30µl avec lesquels je peux faire des PCR. 2µl ont été utilisés pour la PCR test (reste 10µl de produit). Le potentiel PCR est donc de 14 PCR pour un volume total de 360µl.

Protocole :

1. Séparer chaque banque en deux tubes contenant 180µl de produit PCR
2. Vortexer légèrement le flacon de billes pendant 30 sec
3. Ajouter 0,8V de billes càd 144µl et faire des aller-retour jusqu'à ce que le mélange soit homogène¹⁶
4. Incuber 5 min à température ambiante
5. Disposer les tubes sur le portoir magnétique, attendre 2 min que les billes se collent à la paroi du tube (il faut que la solution soit transparente) et jeter le surnageant transparent¹⁷
6. Laver avec 350µl d'EtOH 70 %
7. Faire un up & down avec les tubes placés sur le portoir magnétique, sortir les tubes du portoir et centrifuger brièvement
8. Replacer le tube sur le portoir magnétique et attendre 2 min et jeter le surnageant jusqu'à la dernière goutte
9. Refaire les étapes 6 à 8
10. Laisser sécher les billes sur le portoir magnétique bouchon ouvert pendant 10 min environ jusqu'à ce que l'EtOH soit complètement évaporé, sans toutefois sur-sécher les billes¹⁸

¹⁶ S'il y a des bulles, tapoter légèrement le tube pour les supprimer

¹⁷ Procéder au point 3 et 4 directement sur le même tube

11. Retirer les tubes du portoir, ajouter 32µl de tampon EB (Qiagen Tris-HCl 5mM), et resuspendre à la pipette en faisant des aller-retour
12. Incuber 5 min à température ambiante
13. Centrifuger brièvement et placer sur le portoir magnétique pendant 2 min
14. Transférer le surnageant transparent dans un nouveau tube 1,5ml Low Binding
15. S'il reste encore un peu de billes dans le surnageant, répéter l'étape 12 et 13.
16. Prélever 2µl de chaque mélange à diluer avec 2µl d' H₂O milliQ pour effectuer un dosage en spectrofluorimètre SFAS FLX-Xenius (1µl pour la puce bioanalyzer et 3µl pour le spectrofluorimètre). Ceci se fera en combiné avec d'autres dosages (étape 20). La concentration doit être supérieure à 10ng/µl.

Etape 19.: Profil Bioanalyzer final (4 banques)

Utiliser 1µl de la dilution D7. Faire une lane pour T- d'amplification finale. Suivre les instructions du fabricant pour préparer la puce bioanalyzer

Etape 20.: Dosage spectrofluorimètre SAFAS FLX-Xenius (1 banque)

Prendre une plaque noire et intégrer les paramètres suivants dans le logiciel SAFAS :

- Excitation : 510 nm (fluorochrome du kit Quant-it de Life technologies)
- Emission : 527 nm (fluorochrome du kit Quant-it de Life technologies)
- PM : 635
- Temps de mesure : 5 sec
- Plan de plaque à déterminer et gamme d'étalonnage à définir

Dosages :

Dosage	Etape	Banque	H ₂ O milliQ	Spectrofluo	Bioanalyzer
D1	4	2µl	6µl	6µl	1µl
D2	6	2µl	2µl	3µl	1µl
D3	7	2µl	2µl	4µl	/
D4	9	1µl	1µl	2µl	/
D5	15	2µl	2µl	4µl	/
D6	16	10µl (PCR)	/	10µl	/
D7	18	2µl	2µl	3µl	1µl

¹⁸ L'EtOH n'est pas bon pour les PCR après, c'est pour cela qu'il faut être sûr que tout l'EtOH se soit évaporé. Sur-sécher rend la remise en suspension plus difficile. Enfin, le culot est suffisamment sec quand des craquelures apparaissent sur le culot de billes

Annexe C

Local adaptation in *A. viridis*: material and methods

1. Sampling protocol

When the sampling was performed (between 2012 and 2014), the taxonomic status of *A. viridis* morphs was not clarified yet. To avoid any bias coming from the genetic structure among the morphs, we only sampled individuals from the var. *smaragdina* according to their fluorescence profile (**Article 1**). The sampling was performed in order to compare closely related individuals across a putative environmental gradient. Sites on French Mediterranean coast were chosen from two types of ecologically contrasted environments (see details in table 4.1): i) shallow *vs.* deep, Banyuls, Marseille and Scandola (figure 2.6); ii) lagoon *vs.* sea, Barcarès and Thau (figure 2.6).

2. DNA extraction and RADseq library preparation

DNA extraction was performed on the symbiont free epidermal tissue of *A. viridis* tentacles and library preparation was made following **Article 2**. Briefly, a total of 238 individuals were included in the analysis (Table 4.1), and split into 9 libraries containing between 32 and 44 individuals. Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2000 (100-bp, single read format) at MGX, Montpellier (France).

3. Stress genes markers mass sequencing

To test the hypothesis whether genes whose expression is modified under a stress may be implicated in local adaptation, we performed an amplicon resequencing approach on a set of 10 loci (Table C.3). This set comprised the five sequence markers designed in the **Article 1** complemented with five new stress gene markers selected through the pipeline described in the **Article 1**. These 10 markers, consisting in partial coding sequences or intron sequences, targeted the following Kern genes *ca2m*, *sym32*, *tyrK*, *rna-binding5*, *duf140*, *c3c*, *hsp60*, *gfp*, *npc2a* and *rad50*. The PCR amplifications of all loci (by Access Array technology) and the subsequent mass sequencing (Illumina MiSeq technology) were performed at the Brain and Spine Institute (ICM, Paris, France).

4. RADseq de-novo analysis

Demultiplexing, filtering and clustering of sequence reads were performed with iPyRAD v0.3.41 (Eaton and Ree, 2013) on the whole dataset of 238 individuals. The clustering

threshold was fixed at 90% within locus identity and occurrence in a minimum of 5 individuals was needed to validate a locus. All the other parameters were set to default values. The final set of RAD loci was obtained after a last filtering, performed with VCFTools v0.1.15 (Danecek et al., 2011): only the bi-allelic loci that were shared by at least 85% of the individuals were conserved.

Table C.3: List of loci sequenced using Illumina MiSeq technology and their specific primers.

Locus Name	Gene Name	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
<i>ca2m</i>	Carbonic Anhydrase 2 membrane	CCCCAGTGAAAGTGAACATTAAG	TCTTTGACTTTGAGTGGTTTTGA
<i>sym32</i>	Putative cell adhesion protein Sym32	GACTTTTGGAGTAAATACACTTTGTCA	ATTGGCAACTTCTGCAAGATT
<i>tyrk</i>	Tyrosine kinase receptor	GTTATGAAAGCGTTTATGAAGACAGA	CAGTTCTGCTAGAAATTCCTTCTTG
<i>rna-binding</i>	RNA-binding motif protein 5	TACAATGGCACAACCTGGACAATA	TTCAGTAGCAGATGTCGTAGCTGT
<i>duf140</i>	DNA unwinding factor 140	CTCTCTTCTTCGGATGGTTCAT	GCGAAAATCATGAAGACAATCA
<i>c3c</i>	C3-1 complement	TACTGATGTGTGGATCTGGTTCA	TGCATTCCATCTAATTCGTCTCT
<i>hsp60</i>	Heat shock protein 60	GTACTATCAAGCCGAAGCCTTGT	CTTGGCAACTGTAACACCATCT
<i>gfp</i>	Green fluorescent protein	AGCCATCAACTGAAACAGTCATC	GATGAAAGTGAAGTTCTGGAAGC
<i>npc2a</i>	Niemann-Pick type C2 protein homolog NPC2-a	TATGCTGTACGTTCTGAGTCTTG	GTGACCTTGATTGGACCTTAGA
<i>rad50</i>	DNA repair protein RAD50	TCGTATGTGTTGATCCAGTATTCC	ACTCAAATGGCTAGTGGAGACCT

5. Stress genes de novo analysis

To detect SNPs within the stress gene markers sequences, we ran GenomeAnalysis TK-3.7 (GATK) twice (McKenna et al., 2010). Primers were cut from of all Illumina reads using the Python script `python-cutadapt1.9.1-1build1` available in the Synaptic library of the UNIX environment. Then, using loci sequences used for EPIC detection, we built a reference database using samtools v1.4.1 (Li, 2011; Li et al., 2009), BWA v0.7.12-5 (Li and Durbin, 2010) and picard v2.8.2. This reference database was used to match all reads on the reference loci sequences. SNP discovery was conducted with two rounds of GATK SNPs discovery. We first performed GATK using “hard filters” parameters. This gave us a first set of SNPs. To detect even more SNPs that might have not been considered in the first round, we used the first output of GATK as a new SNP reference database run a second run of GATK SNP discovery, this time with the following parameters: a minimum quality filter `MIN_QD` set to 2, a selection of

SNP with only two alleles and a sharing threshold of 0.003. Finally, we combined the obtained VCF output from the second run of GATK with the output from iPyRAD using VCFTools.

6. Population genetic analysis

The whole dataset was split into the five sampling sites (Banyuls, Barcarès, Thau, Marseille and Scandola) using VCFTools. These five subsets were then converted to a geno file in R using the package stackr version 0.5.7. Observed and expected heterozygosity, allelic richness and pairwise- F_{st} were calculated for the 10 populations using the diveRsity package v1.9.90 (Keenan et al., 2013).

7. Outlier analysis

Two different analyses were used to detect outlier loci, one influenced by population subdivision and a second not taking into account this subdivision.

The first one was performed using BAYESCAN v2.1 (Foll and Gaggiotti, 2008) after conversion of the data into the appropriate format using PGDSpider 2.1.0.1 (Lischer and Excoffier, 2011) All the locally monomorphic loci had to be discarded from the analysis of each pair of populations resulting in an average number of dimorphic SNP of 10 405 (± 990 SE) analysed at each site. BAYESCAN parameter values were set to a sample size of 160 000 generations, a thinning interval of 10, a burn in of 60 000 and two prior odds values, giving the probability odd of a locus to be under selection compared to the neutral model , 20 and 200. This resulted in a total number of iterations of 220000. This analysis was performed twice for each site to test for convergence using the R package CODA (Plummer et al., 2006).

The second method employed to detect outlier SNP loci was a principal component analysis based method: PCAdapt v. 3.0.4 R package (Luu et al., 2017). Briefly, the best number of cluster defining the data was determined following Duforet-Frebourg et al. (2016). After running PCAdapt on the data, we then detected outlier loci by applying a false discovery rate correction (FDR) by using the qvalue v. 2.4.2 R package (Storey et al., 2015). We set the FDR cutoff value t to 5%.

Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing

Nom individuel	Site	Morphe	Délimitation d'espèces RADseq	Adaptation locale RADseq	Séquençage de masse des gènes de stress
Banruf01		Rufescens			X
Banruf02		Rufescens	X		X
Banruf03		Rufescens	X		X
Banruf04		Rufescens	X		X
Banruf06		Rufescens	X		X
Banruf07		Rufescens	X		X
Banruf12		Rufescens			X
Banruf15		Rufescens	X		X
Banruf17		Rufescens	X		X
Banruf18		Rufescens	X		X
Banruf20		Rufescens	X		X
Banruf21		Rufescens	X		X
Banruf22		Rufescens	X		X
Banruf27		Rufescens	X		X
Banruf28		Rufescens	X		X
Bany1S01		Smaragdina	X	X	X
Bany1S02		Smaragdina	X	X	X
Bany1S05		Smaragdina	X	X	X
Bany1S07		Smaragdina	X	X	X
Bany1S10	Banyuls	Smaragdina	X	X	X
Bany1S11		Smaragdina	X	X	X
Bany1S12		Smaragdina	X	X	X
Bany1S13		Smaragdina	X	X	X
Bany1S14		Smaragdina	X	X	X
Bany1S15		Smaragdina	X	X	X
Bany1S16		Smaragdina	X	X	X
Bany1S17		Smaragdina	X	X	X
Bany1S18		Smaragdina	X	X	X
Bany1S19		Smaragdina	X	X	X
Bany1S20		Smaragdina	X	X	X
Bany1S21		Smaragdina	X	X	X
Bany1S22		Smaragdina	X	X	X
Bany1S23		Smaragdina	X	X	X
Bany1S24		Smaragdina	X	X	X
Bany1S25		Smaragdina	X	X	X
Bany1S26		Smaragdina	X	X	X
Bany1S27		Smaragdina	X	X	X
Bany1S28		Smaragdina	X	X	X
Bany1S29		Smaragdina	X	X	X
Bany1S30		Smaragdina	X	X	X

Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing

Bany5S01	Smaragdina		X	X
Bany5S02	Smaragdina		X	X
Bany5S03	Smaragdina		X	X
Bany5S04	Smaragdina		X	X
Bany5S05	Smaragdina		X	X
Bany5S06	Smaragdina		X	X
Bany5S07	Smaragdina		X	X
Bany5S08	Smaragdina		X	X
Bany5S09	Smaragdina		X	X
Bany5S11	Smaragdina		X	X
Bany5S12	Smaragdina		X	X
Bany5S13	Smaragdina		X	X
Bany5S14	Smaragdina		X	X
Bany5S15	Smaragdina		X	X
Bany5S16	Smaragdina		X	X
Bany5S17	Smaragdina		X	X
Bany5S18	Smaragdina		X	X
Bany5S19	Smaragdina		X	X
Bany5S20	Smaragdina		X	X
Bany5S21	Smaragdina		X	X
Bany5S22	Smaragdina		X	X
Bany5S23	Smaragdina		X	X
Bany5S24	Smaragdina		X	X
Bany5S25	Smaragdina		X	X
Bany5S26	Smaragdina		X	X
BanyRu01	Rustica	X		X
BanyRu02	Rustica			X
BanyRu03	Rustica			X
BanyRu04	Rustica	X		X
BanyRu05	Rustica	X		X
BanyRu06	Rustica	X		X
BanyRu07	Rustica			X
BanyRu08	Rustica			X
BanyRu09	Rustica	X		X
BanyRu10	Rustica			X
BanyRu11	Rustica			X
BanyRu12	Rustica			X
BanyRu13	Rustica			X
BanyRu14	Rustica	X		X
BanyRu15	Rustica			X
BarcES03	Smaragdina		X	X
BarcES04	Smaragdina		X	X
BarcES05	Smaragdina		X	X
BarcES06	Barcarès Smaragdina		X	X
BarcES07	Smaragdina		X	X
BarcES08	Smaragdina		X	X
BarcES09	Smaragdina		X	X
BarcES10	Smaragdina		X	X

Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing

BarcES11	Smaragdina	X	X
BarcES12	Smaragdina	X	X
BarcES13	Smaragdina	X	X
BarcES14	Smaragdina	X	X
BarcES15	Smaragdina	X	X
BarcES16	Smaragdina	X	
BarcES17	Smaragdina	X	X
BarcES18	Smaragdina	X	X
BarcES21	Smaragdina	X	X
BarcES22	Smaragdina	X	X
BarcES23	Smaragdina	X	X
BarcES24	Smaragdina	X	X
BarcES25	Smaragdina	X	X
BarcES26	Smaragdina	X	X
BarcES27	Smaragdina	X	X
BarcES28	Smaragdina	X	X
BarcES30	Smaragdina	X	X
BarcMS02	Smaragdina	X	X
BarcMS03	Smaragdina	X	X
BarcMS04	Smaragdina	X	X
BarcMS05	Smaragdina	X	X
BarcMS07	Smaragdina	X	X
BarcMS11	Smaragdina	X	X
BarcMS12	Smaragdina	X	X
BarcMS13	Smaragdina	X	X
BarcMS14	Smaragdina	X	X
BarcMS15	Smaragdina	X	X
BarcMS16	Smaragdina	X	X
BarcMS18	Smaragdina	X	X
BarcMS20	Smaragdina	X	X
BarcMS21	Smaragdina	X	X
BarcMS22	Smaragdina	X	X
BarcMS23	Smaragdina	X	X
BarcMS24	Smaragdina	X	X
BarcMS26	Smaragdina	X	X
BarcMS27	Smaragdina	X	X
MarMaS01	Smaragdina	X	X
MarMaS02	Smaragdina	X	X
MarMaS03	Smaragdina	X	X
MarMaS06	Smaragdina	X	X
MarMaS07	Smaragdina	X	X
MarMaS09	Marseille Smaragdina	X	X
MarMaS10	Smaragdina	X	X
MarMaS11	Smaragdina	X	X
MarMaS12	Smaragdina	X	X
MarMaS15	Smaragdina	X	X
MarMaS17	Smaragdina	X	X
MarMaS19	Smaragdina	X	X

Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing

MarMaS21		Smaragdina		X	X
MarMaS23		Smaragdina		X	X
MarMaS24		Smaragdina		X	X
MarMaS25		Smaragdina		X	X
MarMaS26		Smaragdina		X	X
MarMaS27		Smaragdina		X	X
MarMaS28		Smaragdina		X	X
MarMaS29		Smaragdina		X	X
MarMaS30		Smaragdina		X	X
MarMaS31		Smaragdina		X	X
MarMaS32		Smaragdina		X	X
MarMaS33		Smaragdina		X	X
MarMaS34		Smaragdina		X	X
MarPoS01		Smaragdina		X	X
MarPoS02		Smaragdina		X	X
MarPoS03		Smaragdina		X	X
MarPoS04		Smaragdina		X	X
MarPoS05		Smaragdina		X	X
MarPoS09		Smaragdina		X	X
MarPoS11		Smaragdina		X	X
MarPoS13		Smaragdina		X	X
MarPoS14		Smaragdina		X	X
MarPoS15		Smaragdina		X	X
MarPoS16		Smaragdina		X	X
MarPoS17		Smaragdina		X	X
MarPoS18		Smaragdina		X	X
MarPoS19		Smaragdina		X	X
MarPoS21		Smaragdina		X	X
MarPoS22		Smaragdina		X	X
MarPoS23		Smaragdina		X	X
MarPoS25		Smaragdina		X	X
MarPoS26		Smaragdina		X	X
MarPoS27		Smaragdina		X	X
MarPoS28		Smaragdina		X	X
MarPoS30		Smaragdina		X	X
MarPoS31		Smaragdina		X	X
MarPoS32		Smaragdina		X	X
MarPoS34		Smaragdina		X	X
PlymouR01		Rustica	X		X
PlymouR02		Rustica	X		X
PlymouR03		Rustica	X		X
PlymouR04		Rustica	X		X
PlymouR05	Plymouth	Rustica	X		X
PlymouR06		Rustica	X		X
PlymouR07		Rustica	X		X
PlymouR09		Rustica	X		X
PlymouR10		Rustica	X		X
PlymouR11		Rustica	X		X

Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing

PlymouR12	Rustica	X		X
PlymouR13	Rustica	X		X
PlymouR14	Rustica	X		X
PlymouR15	Rustica	X		X
PlymouR16	Rustica	X		X
PlymouS02	Rufescens	X		X
PlymouS05	Rufescens	X		X
PlymouS06	Rufescens	X		X
PlymouS07	Rufescens	X		X
PlymouS08	Rufescens	X		X
PlymouS09	Rufescens	X		X
PlymouS11	Rufescens	X		X
PlymouS12	Rufescens	X		X
PlymouS13	Rufescens	X		X
PlymouS14	Rufescens	X		X
PlymouS15	Rufescens	X		X
PlymouS16	Rufescens	X		X
ScaSDS01	Smaragdina		X	X
ScaSDS02	Smaragdina		X	X
ScaSDS03	Smaragdina		X	X
ScaSDS04	Smaragdina		X	X
ScaSDS05	Smaragdina		X	X
ScaSDS06	Smaragdina		X	X
ScaSDS07	Smaragdina		X	X
ScaSDS08	Smaragdina		X	X
ScaSDS09	Smaragdina		X	X
ScaSDS10	Smaragdina		X	X
ScaSDS11	Smaragdina		X	X
ScaSDS12	Smaragdina		X	X
ScaSDS13	Smaragdina		X	X
ScaSDS14	Smaragdina		X	X
ScaSDS15	Smaragdina		X	X
ScaSDS16	Scandola Smaragdina		X	X
ScaSDS17	Smaragdina		X	X
ScaSDS18	Smaragdina		X	X
ScaSDS19	Smaragdina		X	X
ScaSDS20	Smaragdina		X	X
ScaSDS21	Smaragdina		X	X
ScaSSS01	Smaragdina		X	X
ScaSSS02	Smaragdina		X	X
ScaSSS03	Smaragdina		X	X
ScaSSS04	Smaragdina		X	X
ScaSSS05	Smaragdina		X	X
ScaSSS06	Smaragdina		X	X
ScaSSS07	Smaragdina		X	X
ScaSSS08	Smaragdina		X	X
ScaSSS09	Smaragdina		X	X
ScaSSS10	Smaragdina		X	X

Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing

ScaSSS11		Smaragdina		X	X
ScaSSS12		Smaragdina		X	X
ScaSSS13		Smaragdina		X	X
ScaSSS14		Smaragdina		X	X
ScaSSS15		Smaragdina		X	X
ScaSSS16		Smaragdina		X	X
ScaSSS17		Smaragdina		X	X
ScaSSS18		Smaragdina		X	X
ScaSSS19		Smaragdina		X	X
ScaSSS21		Smaragdina		X	X
ScaSSS22		Smaragdina		X	X
ScaSSS27		Smaragdina		X	X
ScaSSS28		Smaragdina		X	X
ScaSSS29		Smaragdina		X	X
ScaSSS30		Smaragdina		X	X
StEndR01		Rustica	X		X
StEndR02		Rustica	X		X
StEndR03		Rustica	X		X
StEndR04		Rustica	X		X
StEndR05		Rustica	X		X
StEndR06		Rustica	X		X
StEndR07		Rustica	X		X
StEndR08		Rustica	X		X
StEndR09		Rustica	X		X
StEndR10		Rustica	X		X
StEndR11		Rustica	X		X
StEndR12		Rustica	X		X
StEndR13		Rustica	X		X
StEndS01	Southend	Smaragdina	X		X
StEndS02		Smaragdina	X		X
StEndS04		Smaragdina	X		X
StEndS05		Smaragdina	X		X
StEndS06		Smaragdina	X		X
StEndS07		Smaragdina	X		X
StEndS08		Smaragdina	X		X
StEndS09		Smaragdina	X		X
StEndS10		Smaragdina	X		X
StEndS11		Smaragdina	X		X
StEndS12		Smaragdina	X		X
StEndS13		Smaragdina	X		X
StEndS14		Smaragdina	X		X
ThauIS01		Smaragdina	X	X	X
ThauIS02		Smaragdina		X	X
ThauIS03		Smaragdina	X	X	X
ThauIS04	Thau	Smaragdina	X	X	X
ThauIS05		Smaragdina	X	X	X
ThauIS06		Smaragdina	X	X	X
ThauIS07		Smaragdina	X	X	X

Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing

ThauIS08	Smaragdina	X	X	X
ThauIS09	Smaragdina	X	X	X
ThauIS10	Smaragdina	X	X	X
ThauIS11	Smaragdina	X	X	
ThauIS12	Smaragdina	X	X	X
ThauIS13	Smaragdina	X	X	X
ThauIS14	Smaragdina	X	X	X
ThauIS15	Smaragdina	X	X	
ThauIS16	Smaragdina	X	X	X
ThauIS17	Smaragdina	X	X	
ThauIS18	Smaragdina	X	X	
ThauIS19	Smaragdina	X	X	X
ThauIS20	Smaragdina	X	X	X
ThauIS22	Smaragdina	X	X	X
ThauIS23	Smaragdina	X	X	X
ThauIS25	Smaragdina	X	X	X
ThauIS27	Smaragdina	X	X	X
ThauIS28	Smaragdina	X	X	X
ThauOS01	Smaragdina		X	X
ThauOS02	Smaragdina		X	X
ThauOS03	Smaragdina		X	X
ThauOS04	Smaragdina		X	X
ThauOS05	Smaragdina		X	X
ThauOS06	Smaragdina		X	X
ThauOS07	Smaragdina		X	X
ThauOS08	Smaragdina		X	X
ThauOS09	Smaragdina		X	X
ThauOS10	Smaragdina		X	X
ThauOS12	Smaragdina		X	X
ThauOS13	Smaragdina		X	X
ThauOS14	Smaragdina		X	
ThauOS15	Smaragdina		X	X
ThauOS16	Smaragdina		X	X
ThauOS17	Smaragdina		X	X
ThauOS18	Smaragdina		X	X
ThauOS20	Smaragdina		X	X
ThauOS21	Smaragdina		X	X
ThauOS22	Smaragdina		X	X
ThauOS27	Smaragdina		X	X
ThauOS28	Smaragdina		X	X
ThauOS29	Smaragdina		X	
ThauRu01	Rustica	X		X
ThauRu02	Rustica	X		X
ThauRu03	Rustica			X
ThauRu04	Rustica			X
ThauRu05	Rustica			X
ThauRu06	Rustica	X		X
ThauRu07	Rustica	X		X

Annexe D : Ensemble des individus du RADsequencing

ThauRu08		Rustica		X
ThauRu09		Rustica	X	X
ThauRu10		Rustica		X
ThauRu11		Rustica	X	X
ThauRu12		Rustica	X	X
ThauRu13		Rustica		X
ThauRu14		Rustica		X
ThauRu15		Rustica	X	X
VulcaC03		Smaragdina		X
VulcaC04		Rustica	X	X
VulcaC06		Rustica		X
VulcaC07		Rustica	X	X
VulcaC08		Rustica		X
VulcaC09		Smaragdina		X
VulcaC10		Smaragdina	X	X
VulcaC11		Smaragdina		X
VulcaC12		Smaragdina		X
VulcaC15		Rustica		X
VulcaC16		Rustica		X
VulcaC17		Smaragdina		X
VulcaC18		Rustica	X	X
VulcaC19		Smaragdina		X
VulcaC20		Rustica		X
VulcaL01	Vulcano	Rustica	X	X
VulcaL02		Rustica		X
VulcaL03		Rustica		X
VulcaL04		Smaragdina		X
VulcaL05		Rustica		X
VulcaL06		Rustica	X	X
VulcaL07		Rustica	X	X
VulcaL08		Smaragdina	X	X
VulcaL10		Smaragdina		X
VulcaL11		Smaragdina		X
VulcaL13		Rustica		X
VulcaL16		Smaragdina		X
VulcaL17		Smaragdina		X
VulcaL18		Rustica		X
VulcaL19		Smaragdina		X
VulcaL20		Smaragdina		X
PCiner01		Outgroup	X	X
PCiner02		Outgroup	X	X
PCiner03		Outgroup	X	X
PCiner04		Outgroup		X

Glossaire

Acclimatation	Capacité d'une population à s'ajuster aux conditions environnementales sans qu'il y ait pour autant une modification génétique ; c'est un processus réversible.
Adaptation	Changement génétique dans une population au fil des générations en réponse à la sélection naturelle ; c'est un processus <i>a priori</i> irréversible.
Adaptation locale	Augmentation de la fréquence d'un génotype par sélection naturelle au sein d'une population, en réponse à l'environnement local ; est empêchée par des flux de gènes élevés entre populations vivant dans des environnements différents, qui mènent à l'arrivée par migration d'individus localement maladaptés.
Coalescence	Processus décrivant la fusion de deux lignées en une seule lignée ancestrale lorsque l'on parcourt la généalogie d'un échantillon de gènes dans une population en remontant le temps.
Espèces cryptiques	Des espèces seront décrites comme cryptiques lorsque les caractères morphologiques ne sont pas suffisant pour les différencier, alors que des différences génétiques existent entre elles.
Eutrophisation	Forme de pollution des écosystèmes aquatiques qui se produit lorsque le milieu reçoit trop de matières nutritives assimilables par les algues et que celles-ci prolifèrent.
Génotype	Le génotype d'un individu est défini comme la composition allélique de l'ensemble des gènes d'un organisme participant à un caractère donné.
Holobionte	Association par mutualisme ou commensalisme, d'au moins deux espèces vivant ensembles, formant ainsi une unité écologique.
Introgression	Transfert de gènes d'une espèce vers une autre espèce par hybridation.
Isolement post-zygotique	Mécanisme d'incompatibilité agissant après fécondation et résultant en une réduction de la fitness des hybrides.
Isolement pré-zygotique	Mécanisme d'incompatibilité agissant avant la fécondation, induisant un isolement reproducteur.

Isolement reproducteur	Limite à l'hybridation interspécifique résultant de la mise en place de mécanismes d'incompatibilité entre les espèces.
Migration	Déplacement géographique d'adultes reproducteurs vers un autre site favorable.
Mutation	Défini comme tout changement héritable dans le matériel génétique. Origine du polymorphisme.
Phénotype	Le phénotype d'un individu pour un caractère donné (anatomique, métabolique, moléculaire, physiologique et/ou éthologique) correspond à l'état de ce caractère chez cet individu et est le résultat de l'interaction du génotype de cet individu et de l'environnement.
Plasticité phénotypique	Capacité d'un organisme ayant un génotype donné à produire différents phénotypes en réponse aux différentes conditions environnementales.
Polymorphisme ancestral	Présence dans une population de différents allèles provenant d'une population ancestrale.
Potentiel d'adaptation	Part du polymorphisme dans une population qui permettrait à celle-ci de s'adapter à de futures conditions environnementales.
Sélection divergente	Type de sélection naturelle favorisant au sein de la même espèce des phénotypes différents pour un même caractère dans des environnements différents.
Sélection naturelle	A lieu dans une population dès que des individus porteurs d'un certain génotype laissent plus de descendants que ceux qui ne portent pas ce génotype. Ceci amène à une augmentation de la fréquence de ce génotype dans cette population.
Spéciation allopatrique	Spéciation consécutive à la mise en place d'un isolement géographique entre populations de l'espèce ancestrale. N'est pas forcément le produit de l'adaptation locale.
Spéciation sympatrique	Spéciation initiée par la mise en place de de mécanismes d'isolement reproducteur sans isolement géographique, grâce à la sélection divergente.

Taille efficace d'une population Nombre d'individus d'une population idéale pour lequel on aurait un degré de dérive génétique équivalent à celui de la population réelle.

Taxonomie intégrative Approche de recherche taxonomique qui vise à incorporer différents types de données et méthodes utilisées classiquement en systématique dans le but de documenter la biodiversité et de délimiter ainsi efficacement les espèces.

Bibliographie

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J.W., Baird, S.J.E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C.A., Buggs, R., et al. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* *26*, 229–246.
- Acuña, F.H., Excoffon, A.C., Zamponi, M.O., and Ricci, L. (2003). Importance of nematocysts in taxonomy of acontiarian sea anemones (Cnidaria, Actiniaria): a statistical comparative study. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology* *242*, 75–81.
- Akey, J.M., Zhang, G., Zhang, K., Jin, L., and Shriver, M.D. (2002). Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research* *12*, 1805–1814.
- Allemand, D., Furla, P., and Bénazet-Tambutté, S. (1998). Mechanisms of carbon acquisition for endosymbiont photosynthesis in Anthozoa. *Canadian Journal of Botany* *76*, 925–941.
- Alvarez-Filip, L., Côté, I.M., Gill, J.A., Watkinson, A.R., and Dulvy, N.K. (2011). Region-wide temporal and spatial variation in Caribbean reef architecture: is coral cover the whole story? *Global Change Biology* *17*, 2470–2477.
- Andres, A. (1881). *Intorno alla scissiparita delle attinie* (Mitt. Zool. Stat. Neapel).
- Andres, A. (1883). *Le Attinie, Memoria* (Accademia dei Licei).
- Andrews, K.R., Good, J.M., Miller, M.R., Luikart, G., and Hohenlohe, P.A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics* *17*, 81–92.
- Angilletta, M.J. (2009). *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. (Oxford University Press).
- Araneda, C., Larraín, M.A., Hecht, B., and Narum, S. (2016). Adaptive genetic variation distinguishes Chilean blue mussels (*Mytilus chilensis*) from different marine environments. *Ecology and Evolution*.
- Arrigoni, R., Berumen, M.L., Chen, C.A., Terraneo, T.I., Baird, A.H., Payri, C., and Benzoni, F. (2016). Species delimitation in the reef coral genera *Echinophyllia* and *Oxypora* (Scleractinia, Lobophylliidae) with a description of two new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* *105*, 146–159.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., and Johnson, E.A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* *3*, e3376.
- 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*, 661–689.
- Barshis, D.J., Stillman, J.H., Gates, R.D., Toonen, R.J., Smith, L.W., and Birkeland, C. (2010). Protein expression and genetic structure of the coral *Porites lobata* in an environmentally extreme Samoan back reef: does host genotype limit phenotypic plasticity? *Molecular Ecology* *19*, 1705–1720.
- Barshis, D.J., Ladner, J.T., Oliver, T.A., Seneca, F.O., Traylor-Knowles, N., and Palumbi, S.R. (2013). Genomic basis for coral resilience to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 1387–1392.
- Barton, N.H., and de Cara, M.A.R. (2009). The evolution of strong reproductive isolation. *Evolution* *63*, 1171–1190.

- Baums, I.B., Miller, M.W., and Hellberg, M.E. (2006). Geographic variation in clonal structure in a reef-building Caribbean coral, *Acropora palmata*. *Ecological Monographs* 76, 503–519.
- Bay, R.A., and Palumbi, S.R. (2014). Multilocus Adaptation Associated with Heat Resistance in Reef-Building Corals. *Current Biology* 24, 2952–2956.
- Beaumont, M.A., and Balding, D.J. (2004). Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology* 13, 969–980.
- Beaumont, M.A., and Nichols, R. (1996). Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 1619–1626.
- Bénazet-Tambutté, S., Allemand, D., and Jaubert, J. (1996). Inorganic carbon supply to symbiotic photosynthesis of the sea anemone, *Anemonia viridis*: role of the oral epithelial layers. *Symbiosis* 20, 199–217.
- Bensch, S., Åkesson, S., and Irwin, D.E. (2002). The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. *Molecular Ecology* 11, 2359–2366.
- Bensoussan, N., Romano, J.-C., Harmelin, J.-G., and Garrabou, J. (2010). High resolution characterization of northwest Mediterranean coastal waters thermal regimes: To better understand responses of benthic communities to climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 87, 431–441.
- Berntson, E.A., France, S.C., and Mullineaux, L.S. (1999). Phylogenetic Relationships within the Class Anthozoa (Phylum Cnidaria) Based on Nuclear 18S rDNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13, 417–433.
- Berthouly-Salazar, C., Thuillet, A.-C., Rhoné, B., Mariac, C., Ousseini, I.S., Couderc, M., Tenaillon, M.I., and Vigouroux, Y. (2016). Genome scan reveals selection acting on genes linked to stress response in wild pearl millet. *Molecular Ecology* 25, 5500–5512.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., and Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 148–155.
- Bierne, N., Welch, J., Loire, E., Bonhomme, F., and David, P. (2011). The coupling hypothesis: why genome scans may fail to map local adaptation genes. *Molecular Ecology* 20, 2044–2072.
- Bierne, N., Roze, D., and Welch, J.J. (2013a). Pervasive selection or is it...? Why are FST outliers sometimes so frequent? *Molecular Ecology* 22, 2061–2064.
- Bierne, N., Gagnaire, P.-A., and David, P. (2013b). The geography of introgression in a patchy environment and the thorn in the side of ecological speciation. *Current Zoology* 59, 72–86.
- Billington, H.L., and Pelham, J. (1991). Genetic Variation in the Date of Budburst in Scottish Birch Populations: Implications for Climate Change. *Functional Ecology* 5, 403.
- Blanquart, F., Kaltz, O., Nuismer, S.L., and Gandon, S. (2013). A practical guide to measuring local adaptation. *Ecology Letters* 16, 1195–1205.
- Bongaerts, P., Riginos, C., Ridgway, T., Sampayo, E.M., van Oppen, M.J.H., Englebort, N., Vermeulen, F., and Hoegh-Guldberg, O. (2010). Genetic Divergence across Habitats in the Widespread Coral *Seriatopora hystrix* and Its Associated Symbiodinium. *PLoS ONE* 5, e10871.
- Bongaerts, P., Riginos, C., Hay, K.B., van Oppen, M.J., Hoegh-Guldberg, O., and Dove, S. (2011). Adaptive divergence in a scleractinian coral: physiological adaptation of *Seriatopora hystrix* to shallow and deep reef habitats. *BMC Evolutionary Biology* 11, 303.

- Boulay, J.N., Hellberg, M.E., Cortes, J., and Baums, I.B. (2014). Unrecognized coral species diversity masks differences in functional ecology. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 20131580–20131580.
- Brown, B.E., and Cossins, A.R. (2011). The Potential for Temperature Acclimatisation of Reef Corals in the Face of Climate Change. In *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*, Z. Dubinsky, and N. Stambler, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 421–433.
- Buddemeier, R.W., and Fautin, D.G. (1993). Coral Bleaching as an Adaptive Mechanism. *BioScience* 43.
- Bulnheim, H.-P., and Sauer, K.P. (1984). *Anemonia sulcata* - two species? Genetical and ecological evidence. *Verhandlungen Der Deutschen Zoologische Gesellschaft* 264.
- Caputi, L., Andreakis, N., Mastrototaro, F., Cirino, P., Vassillo, M., and Sordino, P. (2007). Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 9364–9369.
- Cariou, M., Duret, L., and Charlat, S. (2013). Is RAD-seq suitable for phylogenetic inference? An in silico assessment and optimization. *Ecology and Evolution* 3, 846–852.
- Carstens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M., and Satler, J.D. (2013). How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22, 4369–4383.
- Cartwright, P., Halgedahl, S.L., Hendricks, J.R., Jarrard, R.D., Marques, A.C., Collins, A.G., and Lieberman, B.S. (2007). Exceptionally Preserved Jellyfishes from the Middle Cambrian. *PLoS ONE* 2, e1121.
- Casado-Amezúa, P., Machordom, A., Bernardo, J., and González-Wangüemert, M. (2014). New insights into the genetic diversity of zooxanthellae in Mediterranean anthozoans. *Symbiosis* 63, 41–46.
- Catchen, J.M., Hohenlohe, P.A., Bernatchez, L., Funk, W.C., Andrews, K.R., and Allendorf, F.W. (2017). Unbroken: RADseq remains a powerful tool for understanding the genetics of adaptation in natural populations. *Molecular Ecology Resources* 17, 362–365.
- Chevin, L.-M., Lande, R., and Mace, G.M. (2010). Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *PLoS Biology* 8, e1000357.
- Chifman, J., and Kubatko, L. (2014). Quartet Inference from SNP Data Under the Coalescent Model. *Bioinformatics* 30, 3317–3324.
- Chintiroglou, C., and Koukouras, A. (1992a). The feeding habits of three Mediterranean sea anemone species, *Anemonia viridis* (Forsk.) and *Actinia equina* (Linnaeus) and *Cereus pedunculatus* (Pennant). *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 46, 53–68.
- Chintiroglou, C., and Koukouras, A. (1992b). A Population of the Sea Anemone *Anemonia viridis* (Forsk., 1775) and its Associated Flora and Fauna, in the North Aegean Sea. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 77, 483–495.
- Chintiroglou, C.C., and Karalis, P. (2000). Biometric investigations on the cnidae of the Aegean colour morphs of *Anemonia viridis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 80, 543–544.
- Coma, R., Ribes, M., Serrano, E., Jiménez, E., Salat, J., and Pascual, J. (2009). Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 6176–6181.

- Combosch, D.J., and Vollmer, S.V. (2015). Trans-Pacific RAD-Seq population genomics confirms introgressive hybridization in Eastern Pacific *Pocillopora* corals. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 88, 154–162.
- Conover, D.O., Clarke, L.M., Munch, S.B., and Wagner, G.N. (2006). Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. *Journal of Fish Biology* 69, 21–47.
- Coop, G., Witonsky, D., Di Rienzo, A., and Pritchard, J.K. (2010). Using Environmental Correlations to Identify Loci Underlying Local Adaptation. *Genetics* 185, 1411–1423.
- Costantini, F., Aurelle, D., Ledoux, J.-B., and Abbiati, M. (2016). Population Genetic Structure of *Corallium rubrum* in the Mediterranean Sea: Diversity, Phylogeography, and Bathymetric Patterns. In *The Cnidaria, Past, Present and Future*, S. Goffredo, and Z. Dubinsky, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 717–728.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. In *Current Ornithology*, pp. 159–187.
- Daly, M., Chaudhuri, A., Gusmão, L., and Rodríguez, E. (2008). Phylogenetic relationships among sea anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48, 292–301.
- Daly, M., Crowley, L.M., Larson, P., Rodríguez, E., Heestand Saucier, E., and Fautin, D.G. (2017). Anthopleura and the phylogeny of Actinioidea (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Organisms Diversity & Evolution*.
- Dam, H.G. (2013). Evolutionary Adaptation of Marine Zooplankton to Global Change. *Annual Review of Marine Science* 5, 349–370.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C.A., Banks, E., DePristo, M.A., Handsaker, R.E., Lunter, G., Marth, G.T., Sherry, S.T., et al. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27, 2156–2158.
- Dani, V., Priouzeau, F., Mertz, M., Mondin, M., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Davy, S.K., and Sabourault, C. (2017). Expression patterns of sterol transporters NPC1 and NPC2 in the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Cellular Microbiology* 19, e12753.
- Davey, J.W., and Blaxter, M.L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics* 9, 416–423.
- Davey, J.W., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M., and Blaxter, M.L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12, 499–510.
- Davis, M.B., and Shaw, R.G. (2001). Range Shifts and Adaptive Responses to Quaternary Climate Change. *Science* 292, 673–679.
- Davis, M.B., Shaw, R.G., and Etterson, J.R. (2005). Evolutionary responses to changing climate. *Ecology* 86, 1704–1714.
- Davy, S.K., Lucas, I.A.N., and Turner, J.R. (1996). Carbon budgets in temperate anthozoan-dinoflagellate symbioses. *Marine Biology* 126, 773–783.
- Dawson, M.N. (2003). Macro-morphological variation among cryptic species of the moon jellyfish, *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine Biology* 143, 369–379.
- D’Croz, L., and Maté, J.L. (2004). Experimental responses to elevated water temperature in genotypes of the reef coral *Pocillopora damicornis* from upwelling and non-upwelling environments in Panama. *Coral Reefs* 23, 473–483.

- De Mita, S., Thuillet, A.-C., Gay, L., Ahmadi, N., Manel, S., Ronfort, J., and Vigouroux, Y. (2013). Detecting selection along environmental gradients: analysis of eight methods and their effectiveness for outbreeding and selfing populations. *Molecular Ecology* 22, 1383–1399.
- De Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* 56, 879–886.
- De'ath, G., Fabricius, K.E., Sweatman, H., and 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* 109, 17995–17999.
- DeBiase, M.B., and Kelly, M.W. (2016). Plastic and Evolved Responses to Global Change: What Can We Learn from Comparative Transcriptomics?: Table 1. *Journal of Heredity* 107, 71–81.
- Degnan, J.H., and Rosenberg, N.A. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology & Evolution* 24, 332–340.
- Dehal, P. (2002). The Draft Genome of *Ciona intestinalis*: Insights into Chordate and Vertebrate Origins. *Science* 298, 2157–2167.
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, A.B., Knowlton, N., et al. (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science* 4, 11–37.
- Douglas, A.E. (2003). Coral bleaching—how and why? *Marine Pollution Bulletin* 46, 385–392.
- Dove, S.G., Hoegh-Guldberg, O., and Ranganathan, S. (2001). Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins. *Coral Reefs* 19, 197–204.
- Duforet-Frebourg, N., Luu, K., Laval, G., Bazin, E., and Blum, M.G.B. (2016). Detecting Genomic Signatures of Natural Selection with Principal Component Analysis: Application to the 1000 Genomes Data. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1082–1093.
- Dupuis, J.R., Roe, A.D., and Sperling, F.A.H. (2012). Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Molecular Ecology* 21, 4422–4436.
- Eaton, D.A.R., and Ree, R.H. (2013). Inferring Phylogeny and Introgression using RADseq Data: An Example from Flowering Plants (*Pedicularis*: Orobanchaceae). *Systematic Biology* 62, 689–706.
- Edwards, S.V., Liu, L., and Pearl, D.K. (2007). High-resolution species trees without concatenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 5936–5941.
- Ence, D.D., and Carstens, B.C. (2011). SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. *Molecular Ecology Resources* 11, 473–480.
- Erickson, P.A., Glazer, A.M., Killingbeck, E.E., Agoglia, R.M., Baek, J., Carsanaro, S.M., Lee, A.M., Cleves, P.A., Schluter, D., and Miller, C.T. (2016). Partially repeatable genetic basis of benthic adaptation in threespine sticklebacks. *Evolution* 70, 887–902.
- Evans, T.G. (2015). Considerations for the use of transcriptomics in identifying the “genes that matter” for environmental adaptation. *Journal of Experimental Biology* 218, 1925–1935.
- Excoffier, L., Hofer, T., and Foll, M. (2009). Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity* 103, 285.
- Fabina, N.S., Putnam, H.M., Franklin, E.C., Stat, M., and Gates, R.D. (2012). Transmission Mode Predicts Specificity and Interaction Patterns in Coral-Symbiodinium Networks. *PLoS ONE* 7, e44970.

- Fautin, D.G., and Buddemeier, R.W. (2004). Adaptive bleaching: a general phenomenon. *Hydrobiologia* 530, 459–467.
- Feder, M., and Mitchell-Olds, T. (2003). Evolutionary and ecological functional genomics. *Nature Reviews Genetics* 649–655.
- Flot, J.-F., Tillier, A., Samadi, S., and Tillier, S. (2006). Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions. *Molecular Ecology Notes* 6, 627–630.
- Flot, J.-F., Magalon, H., Cruaud, C., Couloux, A., and Tillier, S. (2008). Patterns of genetic structure among Hawaiian corals of the genus *Pocillopora* yield clusters of individuals that are compatible with morphology. *Comptes Rendus Biologies* 331, 239–247.
- Flot, J.-F., Blanchot, J., Charpy, L., Cruaud, C., Licuanan, W.Y., Nakano, Y., Payri, C., and Tillier, S. (2011). Incongruence between morphotypes and genetically delimited species in the coral genus *Stylophora*: phenotypic plasticity, morphological convergence, morphological stasis or interspecific hybridization? *BMC Ecology* 11, 1.
- Foll, M., and Gaggiotti, O. (2008). A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. *Genetics* 180, 977–993.
- Foo, S.A., and Byrne, M. (2016). Acclimatization and Adaptive Capacity of Marine Species in a Changing Ocean. In *Advances in Marine Biology*, (Elsevier), p.
- Forcioli, D., Merle, P., Caligara, C., Ciosi, M., Muti, C., Francour, P., Cerrano, C., and Allemand, D. (2011). Symbiont diversity is not involved in depth acclimation in the Mediterranean sea whip *Eunicella singularis*. *Marine Ecology Progress Series* 439, 57–71.
- Frade, P.R., Englebert, N., Faria, J., Visser, P.M., and Bak, R.P.M. (2008). Distribution and photobiology of *Symbiodinium* types in different light environments for three colour morphs of the coral *Madracis pharensis*: is there more to it than total irradiance? *Coral Reefs* 27, 913–925.
- France, S.C., Rosel, P.E., Agenboard, J.E., Mullineaux, L.S., and Kocher, T.D. (1996). DNA sequence variation of mitochondrial large-subunit rRNA provides support for a two-subclass organization of the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5, 15–25.
- Freudenthal, H.D. (1962). *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a Zooxanthella: Taxonomy, Life Cycle, and Morphology. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 9, 45–52.
- Frichot, E., Schoville, S.D., Bouchard, G., and François, O. (2013). Testing for Associations between Loci and Environmental Gradients Using Latent Factor Mixed Models. *Molecular Biology and Evolution* 30, 1687–1699.
- Friesen, M.L., von Wettberg, E.J., Badri, M., Moriuchi, K.S., Barhoumi, F., Chang, P.L., Cuellar-Ortiz, S., Cordeiro, M.A., Vu, W.T., Arraouadi, S., et al. (2014). The ecological genomic basis of salinity adaptation in Tunisian *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 15, 1160.
- Fujita, M.K., Leaché, A.D., Burbrink, F.T., McGuire, J.A., and Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 27, 480–488.
- Fukami, H., Budd, A.F., Paulay, G., Solé-Cava, A.M., Chen, C.A., and Iwao, K. (2004). Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature* 427, 832–835.
- Funk, W.C., Lovich, R.E., Hohenlohe, P.A., Hofman, C.A., Morrison, S.A., Sillett, T.S., Ghalambor, C.K., Maldonado, J.E., Rick, T.C., Day, M.D., et al. (2016). Adaptive divergence despite strong genetic drift: genomic analysis of the evolutionary mechanisms causing genetic differentiation in the island fox (*Urocyon littoralis*). *Molecular Ecology* n/a-n/a.

- Gagnaire, P.-A., and Gaggiotti, O.E. (2016). Detecting polygenic selection in marine populations by combining population genomics and quantitative genetics approaches. *Current Zoology* 62, 603–616.
- Ganot, P., Moya, A., Magnone, V., Allemand, D., Furla, P., and Sabourault, C. (2011). Adaptations to Endosymbiosis in a Cnidarian-Dinoflagellate Association: Differential Gene Expression and Specific Gene Duplications. *PLoS Genetics* 7, e1002187.
- García Molinos, J., Halpern, B.S., Schoeman, D.S., Brown, C.J., Kiessling, W., Moore, P.J., Pandolfi, J.M., Poloczanska, E.S., Richardson, A.J., and Burrows, M.T. (2015). Climate velocity and the future global redistribution of marine biodiversity. *Nature Climate Change* 6, 83–88.
- Garvin, M.R., Saitoh, K., and Gharrett, A.J. (2010). Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Molecular Ecology Resources* 10, 915–934.
- Gates, R.D., and Edmunds, P.J. (1999). The physiological mechanisms of acclimatization in tropical reef corals. *American Zoologist* 39, 30–43.
- Gattuso, J.-P., Magnan, A., Bille, R., Cheung, W.W.L., Howes, E.L., Joos, F., Allemand, D., Bopp, L., Cooley, S.R., Eakin, C.M., et al. (2015). Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science* 349, aac4722–aac4722.
- Gélin, P., Postaire, B., Fauvelot, C., and Magalon, H. (2017). Reevaluating species number, distribution and endemism of the coral genus *Pocillopora* Lamarck, 1816 using species delimitation methods and microsatellites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 109, 430–446.
- Ghalambor, C.K., McKAY, J.K., Carroll, S.P., and Reznick, D.N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* 21, 394–407.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J.S., Mills, J.A., and Merilä, J. (2008). Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology* 17, 167–178.
- Gittins, J.R., D'Angelo, C., Oswald, F., Edwards, R.J., and Wiedenmann, J. (2015). Fluorescent protein-mediated colour polymorphism in reef corals: multicopy genes extend the adaptation/acclimatization potential to variable light environments. *Molecular Ecology* 24, 453–465.
- Gómez, S., Fleeger, J.W., Rocha-Olivares, A., and Foltz, D. (2004). Four new species of *Cletocamptus* Schrankewitsch, 1875, closely related to *Cletocamptus deitersi* (Richard, 1897) (Copepoda: Harpacticoida). *Journal of Natural History* 38, 2669–2732.
- Gompert, Z., and Alex Buerkle, C. (2010). introgress: a software package for mapping components of isolation in hybrids. *Molecular Ecology Resources* 10, 378–384.
- Gosse, P.H. (1860). A historie of the british sea anemones and corals (London: Van Voorst, Paternoster Row).
- Grummer, J.A., Bryson, R.W., and Reeder, T.W. (2014). Species Delimitation Using Bayes Factors: Simulations and Application to the *Sceloporus scalaris* Species Group (Squamata: Phrynosomatidae). *Systematic Biology* 63, 119–133.
- Guizien, K., Belharet, M., Marsaleix, P., and Guarini, J.M. (2012). Using larval dispersal simulations for marine protected area design: Application to the Gulf of Lions (northwest Mediterranean). *Limnology and Oceanography* 57, 1099–1112.
- Gunther, T., and Coop, G. (2013). Robust Identification of Local Adaptation from Allele Frequencies. *Genetics* 195, 205–220.

- Guo, B., Li, Z., and Merilä, J. (2016). Population genomic evidence for adaptive differentiation in the Baltic Sea herring. *Molecular Ecology*.
- Haddock, S.H.D., and Dunn, C.W. (2015). Fluorescent proteins function as a prey attractant: experimental evidence from the hydromedusa *Olindias formosus* and other marine organisms. *Biology Open* 4, 1094–1104.
- Halliburton, R. (2004). *Introduction to population genetics* (Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall).
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D.W., and Medina-Elizade, M. (2006). Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 14288–14293.
- Hansson, L.-A. (2004). Plasticity in pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology* 85, 1005–1016.
- Hedgecock, D. (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bulletin of Marine Science* 39, 550–564.
- Herrera, S., Reyes-Herrera, P.H., and Shank, T.M. (2015). Predicting RAD-seq Marker Numbers across the Eukaryotic Tree of Life. *Genome Biology and Evolution* 7, 3207–3225.
- Hoban, S., Kelley, J.L., Lotterhos, K.E., Antolin, M.F., Bradburd, G., Lowry, D.B., Poss, M.L., Reed, L.K., Storfer, A., and Whitlock, M.C. (2016). Finding the Genomic Basis of Local Adaptation: Pitfalls, Practical Solutions, and Future Directions. *The American Naturalist* 188, 379–397.
- Hoegh-Guldberg, O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Research* 50, 839.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., et al. (2007). Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* 318, 1737–1742.
- Hoekstra, H.E. (2006). A Single Amino Acid Mutation Contributes to Adaptive Beach Mouse Color Pattern. *Science* 313, 101–104.
- Hoekstra, J.M., Boucher, T.M., Ricketts, T.H., and Roberts, C. (2004). Confronting a biome crisis: global disparities of habitat loss and protection: Confronting a biome crisis. *Ecology Letters* 8, 23–29.
- Hoffmann, A.A., and Parsons, P.A. (1991). *Evolutionary genetics and environmental stress* (Oxford ; New York: Oxford University Press).
- Holt, R.D. (1990). The microevolutionary consequences of climate change. *Trends in Ecology & Evolution* 5, 311–315.
- Howells, E.J., Beltran, V.H., Larsen, N.W., Bay, L.K., Willis, B.L., and van Oppen, M.J.H. (2011). Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nature Climate Change* 2, 116–120.
- Huey, R.B., Carlson, M., Crozier, L., Frazier, M., Hamilton, H., Harley, C., Hoang, A., and Kingsolver, J.G. (2002). Plants versus animals: do they deal with stress in different ways? *Integrative and Comparative Biology* 42, 415–423.
- Hume, B.C.C., Voolstra, C.R., Arif, C., D'Angelo, C., Burt, J.A., Eyal, G., Loya, Y., and Wiedenmann, J. (2016). Ancestral genetic diversity associated with the rapid spread of stress-tolerant coral symbionts in response to Holocene climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201601910.
- IPCC, Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., and Midgley, P.M. (2013). *IPCC2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution Of*

Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA).

Isnard, E., Tournois, J., McKenzie, D.J., Ferraton, F., Bodin, N., Aliaume, C., and Darnaude, A.M. (2015). Getting a Good Start in Life? A Comparative Analysis of the Quality of Lagoons as Juvenile Habitats for the Gilthead Seabream *Sparus aurata* in the Gulf of Lions. *Estuaries and Coasts* 38, 1937–1950.

Johnson, V.R., Brownlee, C., Rickaby, R.E.M., Graziano, M., Milazzo, M., and Hall-Spencer, J.M. (2013). Responses of marine benthic microalgae to elevated CO₂. *Marine Biology* 160, 1813–1824.

Joost, S., Vuilleumier, S., Jensen, J.D., Schoville, S., Leempoel, K., Stucki, S., Widmer, I., Melodelima, C., Rolland, J., and Manel, S. (2013). Uncovering the genetic basis of adaptive change: on the intersection of landscape genomics and theoretical population genetics. *Molecular Ecology* 3659–3665.

Kawecki, T.J., and Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7, 1225–1241.

Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W., and Prodöhl, P.A. (2013). diveRsity : An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution* 4, 782–788.

Kelly, L.W., Williams, G.J., Barott, K.L., Carlson, C.A., Dinsdale, E.A., Edwards, R.A., Haas, A.F., Haynes, M., Lim, Y.W., McDole, T., et al. (2014). Local genomic adaptation of coral reef-associated microbiomes to gradients of natural variability and anthropogenic stressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 10227–10232.

Kenkel, C.D., Traylor, M.R., Wiedenmann, J., Salih, A., and Matz, M.V. (2011). Fluorescence of coral larvae predicts their settlement response to crustose coralline algae and reflects stress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278, 2691–2697.

Kingman, J.F. (2000). Origins of the coalescent: 1974-1982. *Genetics* 156, 1461–1463.

Kinne, O. (1962). Irreversible nongenetic adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 5, 265–282.

Lacombe, H.P., and Tchernia, P. (1972). Caractères hydrologiques et circulation des eaux en Méditerranée. In *The Mediterranean Sea*, (Dowden Hutchinson Ross Inc Publishers), pp. 26–36.

Ladner, J.T., and Palumbi, S.R. (2012). Extensive sympatry, cryptic diversity and introgression throughout the geographic distribution of two coral species complexes: geographic patterns of diversity and introgression. *Molecular Ecology* 21, 2224–2238.

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, 866–880.

LaJeunesse, T.C., Loh, W.K., Van Woesik, R., Hoegh-Guldberg, O., Schmidt, G.W., and Fitt, W.K. (2003). Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals, relative to those of the Caribbean. *Limnology and Oceanography* 48, 2046–2054.

LaJeunesse, T.C., Bhagooli, R., Hidaka, M., DeVantier, L., Done, T., Schmidt, G.W., Fitt, W.K., and Hoegh-Guldberg, O. (2004). Closely related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. *Marine Ecology Progress Series* 284, 147–161.

LaJeunesse, T.C., Smith, R., Walther, M., Pinzon, J., Pettay, D.T., McGinley, M., Aschaffenburg, M., Medina-Rosas, P., Cupul-Magana, A.L., Perez, A.L., et al. (2010). Host-symbiont recombination versus natural selection in the response of coral-dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277, 2925–2934.

- Lamichhane, S., Barrio, A.M., Rafati, N., Sundstrom, G., Rubin, C.-J., Gilbert, E.R., Berglund, J., Wetterbom, A., Laikre, L., Webster, M.T., et al. (2012). Population-scale sequencing reveals genetic differentiation due to local adaptation in Atlantic herring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 19345–19350.
- Le Moan, A., Gagnaire, P.-A., and Bonhomme, F. (2016). Parallel genetic divergence among coastal-marine ecotype pairs of European anchovy explained by differential introgression after secondary contact. *Molecular Ecology* *25*, 3187–3202.
- Leache, A.D., Fujita, M.K., Minin, V.N., and Bouckaert, R.R. (2014). Species Delimitation using Genome-Wide SNP Data. *Systematic Biology* *63*, 534–542.
- Leal, M.C., Hoadley, K., Pettay, D.T., Grajales, A., Calado, R., and Warner, M.E. (2015). Symbiont type influences trophic plasticity of a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Journal of Experimental Biology* *218*, 858–863.
- Lemmon, E.M., and Lemmon, A.R. (2013). High-Throughput Genomic Data in Systematics and Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* *44*, 99–121.
- Lenormand, T. (2002). Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* *183–189*.
- Lenormand, T. (2012). From Local Adaptation to Speciation: Specialization and Reinforcement. *International Journal of Ecology* *2012*, 1–11.
- Lessa, E.P. (1992). Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution* *9*, 323–330.
- Lesser, M.P. (2004). Experimental biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* *300*, 217–252.
- Leutenegger, A., Kredel, S., Gundel, S., D'Angelo, C., Salih, A., and Wiedenmann, J. (2007). Analysis of fluorescent and non-fluorescent sea anemones from the Mediterranean Sea during a bleaching event. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* *353*, 221–234.
- Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* *27*, 2987–2993.
- Li, H., and Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* *26*, 589–595.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* *25*, 2078–2079.
- Lischer, H.E., and Excoffier, L. (2011). PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics* *28*, 298–299.
- Lotterhos, K.E., and Whitlock, M.C. (2015). The relative power of genome scans to detect local adaptation depends on sampling design and statistical method. *Molecular Ecology* *24*, 1031–1046.
- Lowry, D.B., Hoban, S., Kelley, J.L., Lotterhos, K.E., Reed, L.K., Antolin, M.F., and Storfer, A. (2017a). Breaking RAD: an evaluation of the utility of restriction site-associated DNA sequencing for genome scans of adaptation. *Molecular Ecology Resources* *17*, 142–152.
- Lowry, D.B., Hoban, S., Kelley, J.L., Lotterhos, K.E., Reed, L.K., Antolin, M.F., and Storfer, A. (2017b). Responsible RAD: Striving for best practices in population genomic studies of adaptation. *Molecular Ecology Resources* *17*, 366–369.

- Luikart, G., England, P.R., Tallmon, D., Jordan, S., and Taberlet, P. (2003). The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* 4, 981–994.
- Lukyanov, K.A., Fradkov, A.F., Gurskaya, N.G., Matz, M.V., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Markelov, M.L., Zarakovsky, A.G., Zhao, X., Fang, Y., et al. (2000). Natural Animal Coloration Can Be Determined by a Nonfluorescent Green Fluorescent Protein Homolog. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25879–25882.
- Lundgren, P., Vera, J.C., Peplow, L., Manel, S., and van Oppen, M.J. (2013). Genotype–environment correlations in corals from the Great Barrier Reef. *BMC Genetics* 14, 9.
- Luu, K., Bazin, E., and Blum, M.G.B. (2017). *pcadapt*: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources* 17, 67–77.
- Maddison, W.P. (1997). Gene trees in species trees. *Systematic Biology* 46, 523–536.
- Mallet, J. (1995). A species definition for the Modern Synthesis. *Trends in Ecology & Evolution* 10, 294–299.
- Manel, S., Perrier, C., Pratlong, M., Abi-Rached, L., Paganini, J., Pontarotti, P., and Aurelle, D. (2016). Genomic resources and their influence on the detection of the signal of positive selection in genome scans. *Molecular Ecology* 25, 170–184.
- Martínez-Quintana, A., Bramanti, L., Viladrich, N., Rossi, S., and Guizien, K. (2015). Quantification of larval traits driving connectivity: the case of *Corallium rubrum* (L. 1758). *Marine Biology* 162, 309–318.
- Marti-Puig, P., Forsman, Z.H., Haverkort-Yeh, R.D., Knapp, I.S., Maragos, J.E., and Toonen, R.J. (2014). Extreme phenotypic polymorphism in the coral genus *Pocillopora*; micro-morphology corresponds to mitochondrial groups, while colony morphology does not. *Bulletin of Marine Science* 90, 211–231.
- Mayfield, A.B., Chan, P.-H., Putnam, H.M., Chen, C.-S., and Fan, T.-Y. (2012). The effects of a variable temperature regime on the physiology of the reef-building coral *Seriatopora hystrix*: results from a laboratory-based reciprocal transplant. *Journal of Experimental Biology* 215, 4183–4195.
- Maynard Smith, J. (1991). A Darwinian View of Symbiosis. In *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation*, (Cambridge), pp. 26–39.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist* (Harvard University Press).
- McCormack, J.E., Hird, S.M., Zellmer, A.J., Carstens, B.C., and Brumfield, R.T. (2013). Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66, 526–538.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., et al. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 20, 1297–1303.
- McKinney, G.J., Larson, W.A., Seeb, L.W., and Seeb, J.E. (2017). RADseq provides unprecedented insights into molecular ecology and evolutionary genetics: comment on Breaking RAD by Lowry *et al.* (2016). *Molecular Ecology Resources* 17, 356–361.
- Merilä, J., and Hendry, A.P. (2014). Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. *Evolutionary Applications* 7, 1–14.
- Meron, D., Buia, M.-C., Fine, M., and Banin, E. (2013). Changes in Microbial Communities Associated with the Sea Anemone *Anemonia viridis* in a Natural pH Gradient. *Microbial Ecology* 65, 269–276.

- Mieog, J.C., Olsen, J.L., Berkelmans, R., Bleuler-Martinez, S.A., Willis, B.L., and van Oppen, M.J.H. (2009). The Roles and Interactions of Symbiont, Host and Environment in Defining Coral Fitness. *PLoS ONE* 4, e6364.
- Miller, M.R., Atwood, T.S., Eames, B.F., Eberhart, J.K., Yan, Y.-L., Postlethwait, J.H., and Johnson, E.A. (2007). RAD marker microarrays enable rapid mapping of zebrafish mutations. *Genome Biology* 8, R105.
- Moya, A., Ganot, P., Furla, P., and Sabourault, C. (2012). The transcriptomic response to thermal stress is immediate, transient and potentiated by ultraviolet radiation in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Molecular Ecology* 21, 1158–1174.
- Muller-Parker, G., and Davy, S.K. (2001). Temperate and tropical algal-sea anemone symbioses. *Invertebrate Biology* 120, 104–123.
- Mumby, P.J., Elliott, I.A., Eakin, C.M., Skirving, W., Paris, C.B., Edwards, H.J., Enríquez, S., Iglesias-Prieto, R., Cherubin, L.M., and Stevens, J.R. (2011). Reserve design for uncertain responses of coral reefs to climate change: Reserve design for climate change. *Ecology Letters* 14, 132–140.
- Murren, C.J., Auld, J.R., Callahan, H., Ghalambor, C.K., Handelsman, C.A., Heskell, M.A., Kingsolver, J.G., Maclean, H.J., Masel, J., Maughan, H., et al. (2015). Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity* 115, 293–301.
- Muscatine, L. (1990). The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Coral Reefs* 25, 70–87.
- Muscatine, L., R McCloskey, L., and E Marian, R. (1981). Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnology and Oceanography* 26, 601–611.
- Nadeau, N.J., Martin, S.H., Kozak, K.M., Salazar, C., Dasmahapatra, K.K., Davey, J.W., Baxter, S.W., Blaxter, M.L., Mallet, J., and Jiggins, C.D. (2013). Genome-wide patterns of divergence and gene flow across a butterfly radiation. *Molecular Ecology* 22, 814–826.
- Narum, S.R., and Campbell, N.R. (2015). Transcriptomic response to heat stress among ecologically divergent populations of redband trout. *BMC Genomics* 16, 103.
- Narum, S.R., and Hess, J.E. (2011). Comparison of F_{ST} outlier tests for SNP loci under selection. *Molecular Ecology Resources* 11, 184–194.
- Nielsen, E.E., Hemmer-Hansen, J., Larsen, P.F., and Bekkevoold, D. (2009). Population genomics of marine fishes: identifying adaptive variation in space and time. *Molecular Ecology* 18, 3128–3150.
- Normile, D. (2016). El Niño’s warmth devastating reefs worldwide. *Science* 352, 15–16.
- Nydam, M.L., and Harrison, R.G. (2007). Genealogical relationships within and among shallow-water *Ciona* species (Ascidiacea). *Marine Biology* 151, 1839–1847.
- Obura, D.O. (2005). Resilience and climate change: lessons from coral reefs and bleaching in the Western Indian Ocean. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 63, 353–372.
- Östman, C. (2000). A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Scientia Marina* 31–46.
- Palumbi, S.R., and Baker, C.S. (1994). Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution* 11, 426–435.
- Palumbi, S.R., Barshis, D.J., Traylor-Knowles, N., and Bay, R.A. (2014). Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. *Science* 344, 895–898.

- Pante, E., Puillandre, N., Viricel, A., Arnaud-Haond, S., Aurelle, D., Castelin, M., Chenuil, A., Destombe, C., Forcioli, D., Valero, M., et al. (2015). Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular Ecology* 24, 525–544.
- Pardo-Diaz, C., Salazar, C., and Jiggins, C.D. (2015). Towards the identification of the loci of adaptive evolution. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 445–464.
- Parkinson, J.E., and Baums, I.B. (2014). The extended phenotypes of marine symbioses: ecological and evolutionary consequences of intraspecific genetic diversity in coral-algal associations. *Frontiers in Microbiology* 5.
- Parmesan, C. (2006). Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 637–669.
- Parmesan, C., and Yohe, G.W. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37–42.
- Paz-García, D.A., Aldana-Moreno, A., Cabral-Tena, R.A., García-De-León, F.J., Hellberg, M.E., and Balart, E.F. (2015a). Morphological variation and different branch modularity across contrasting flow conditions in dominant *Pocillopora* reef-building corals. *Oecologia* 178, 207–218.
- Paz-García, D.A., Hellberg, M.E., García-de-León, F.J., and Balart, E.F. (2015b). Switch between Morphospecies of *Pocillopora* Corals. *The American Naturalist* 186, 434–440.
- Peck, L.S. (2016). A Cold Limit to Adaptation in the Sea. *Trends in Ecology & Evolution* 31, 13–26.
- Peck, L.S., Clark, M.S., Morley, S.A., Massey, A., and Rossetti, H. (2009). Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. *Functional Ecology* 23, 248–256.
- Pereira, A.M., Brito, C., Sanches, J., Sousa-Santos, C., and Robalo, J.I. (2014). Absence of consistent genetic differentiation among several morphs *Actinia* (Actiniaria: Actiniidae) occurring in the Portuguese coast. *Zootaxa* 3893, 595.
- Perry, A.L., Low, P.J., Ellis, J.R., and Reynolds, J.D. (2005). Climate Change and Distribution Shifts in Marine Fishes. *Science* 308, 1912–1915.
- Pfenninger, M., and Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7, 121.
- Picq, S., McMillan, W.O., and Puebla, O. (2016). Population genomics of local adaptation versus speciation in coral reef fishes (*Hypoplectrus* spp, Serranidae). *Ecology and Evolution* 6, 2109–2124.
- Pinzón, J.H., Sampayo, E., Cox, E., Chauka, L.J., Chen, C.A., Voolstra, C.R., and LaJeunesse, T.C. (2013). Blind to morphology: genetics identifies several widespread ecologically common species and few endemics among Indo-Pacific cauliflower corals (*Pocillopora*, Scleractinia). *Journal of Biogeography* 40, 1595–1608.
- Plummer, M., Best, N., Cowles, K., and Vines, K. (2006). CODA: convergence diagnosis and output analysis for MCMC. *R News* 6, 7–11.
- Pochon, X., and Gates, R.D. (2010). A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 492–497.
- Pochon, X., Putnam, H.M., and Gates, R.D. (2014). Multi-gene analysis of *Symbiodinium* dinoflagellates: a perspective on rarity, symbiosis, and evolution. *PeerJ* 2, e394.

- Poncet, B.N., Herrmann, D., Gugerli, F., Taberlet, P., Holderegger, R., Gielly, L., Rioux, D., Thuiller, W., Aubert, S., and Manel, S. (2010). Tracking genes of ecological relevance using a genome scan in two independent regional population samples of *Arabis alpina*. *Molecular Ecology* *19*, 2896–2907.
- Porcelli, D., Butlin, R.K., Gaston, K.J., Joly, D., and Snook, R.R. (2015). The environmental genomics of metazoan thermal adaptation. *Heredity* *114*, 502.
- Prada, C., McIlroy, S.E., Beltrán, D.M., Valint, D.J., Ford, S.A., Hellberg, M.E., and Coffroth, M.A. (2014). Cryptic diversity hides host and habitat specialization in a gorgonian-algal symbiosis. *Molecular Ecology* *23*, 3330–3340.
- Pratlong, M., Haguenaer, A., Chabrol, O., Klopp, C., Pontarotti, P., and Aurelle, D. (2015). The red coral (*Corallium rubrum*) transcriptome: a new resource for population genetics and local adaptation studies. *Molecular Ecology Resources* *15*, 1205–1215.
- Putnam, N.H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V.V., et al. (2007). Sea Anemone Genome Reveals Ancestral Eumetazoan Gene Repertoire and Genomic Organization. *Science* *317*, 86–94.
- Pyhäjärvi, T., Hufford, M.B., Mezouk, S., and Ross-Ibarra, J. (2013). Complex patterns of local adaptation in teosinte. *Genome Biology and Evolution* *5*, 1594–1609.
- Rabosky, D.L. (2015). Reproductive isolation and the causes of speciation rate variation in nature. *Biological Journal of the Linnean Society*.
- Ree, R.H., and Hipp, A.L. (2015). Inferring phylogenetic history from restriction site associated DNA (RADseq). *Next-Generation Sequencing in Plant Systematics*. (Eds E Hörandl, MS Appelhans) 181–204.
- Revel, J., Massi, L., Mehiri, M., Boutoute, M., Mayzaud, P., Capron, L., and Sabourault, C. (2016). Differential distribution of lipids in epidermis, gastrodermis and hosted Symbiodinium in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* *191*, 140–151.
- Richards, Z.T., and Hobbs, J.-P.A. (2015). Hybridisation on coral reefs and the conservation of evolutionary novelty. *Current Zoology* *61*, 132–145.
- Richards, Z.T., Berry, O., and van Oppen, M.J.H. (2016). Cryptic genetic divergence within threatened species of *Acropora* coral from the Indian and Pacific Oceans. *Conservation Genetics*.
- Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P.-L., and Allemand, D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* *208*, 277–285.
- Rocha, J., Coelho, F.J.R.C., Peixe, L., Gomes, N.C.M., and Calado, R. (2015). Optimization of preservation and processing of sea anemones for microbial community analysis using molecular tools. *Scientific Reports* *4*.
- Rocha-Olivares, A., Fleeger, J.W., and Foltz, D.W. (2001). Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod. *Molecular Biology and Evolution* *18*, 1088–1102.
- Rocha-Olivares, A., Fleeger, J.W., and Foltz, D.W. (2004). Differential tolerance among cryptic species: A potential cause of pollutant-related reductions in genetic diversity. *Environmental Toxicology and Chemistry* *23*, 2132–2137.
- Rockman, M.V. (2012). The QTN program and the alleles that matter for evolution: all that's gold does not glitter. *Evolution* *66*, 1–17.

- Rodríguez, E., and Daly, M. (2010). Phylogenetic Relationships among Deep-Sea and Chemosynthetic Sea Anemones: Actinoscyphiidae and Actinostolidae (Actiniaria: Mesomyaria). *PLoS ONE* 5, e10958.
- Rodríguez, E., Barbeitos, M., Daly, M., Gusmão, L.C., and Häussermann, V. (2012). Toward a natural classification: phylogeny of acontiate sea anemones (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria). *Cladistics* 28, 375–392.
- Rodríguez, E., Barbeitos, M.S., Brugler, M.R., Crowley, L.M., Grajales, A., Gusmão, L., Häussermann, V., Reft, A., and Daly, M. (2014). Hidden among sea anemones: the first comprehensive phylogenetic reconstruction of the order Actiniaria (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia) reveals a novel group of hexacorals. *PLoS One* 9, e96998.
- Rodriguez-Lanetty, M. (2003). Evolving lineages of Symbiodinium-like dinoflagellates based on ITS1 rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28, 152–168.
- Romero, P.F., Feldmeyer, B., and Pfenninger, M. (2015). Comparative transcriptomics reveals candidate genes involved in the adaptation to non-marine habitats in panpulmonate mollusks. *bioRxiv*.
- Rosenberg, N.A. (2002). The Probability of Topological Concordance of Gene Trees and Species Trees. *Theoretical Population Biology* 61, 225–247.
- Roth, M.S., Fan, T.-Y., and Deheyn, D.D. (2013). Life History Changes in Coral Fluorescence and the Effects of Light Intensity on Larval Physiology and Settlement in *Seriatopora hystrix*. *PLoS ONE* 8, e59476.
- Rougemont, Q., Gagnaire, P.-A., Perrier, C., Genthon, C., Besnard, A.-L., Launey, S., and Evanno, G. (2017). Inferring the demographic history underlying parallel genomic divergence among pairs of parasitic and nonparasitic lamprey ecotypes. *Molecular Ecology* 26, 142–162.
- Roux, C., Tsagkogeorga, G., Bierne, N., and Galtier, N. (2013). Crossing the Species Barrier: Genomic Hotspots of Introgression between Two Highly Divergent *Ciona intestinalis* Species. *Molecular Biology and Evolution* 30, 1574–1587.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols* 365–386.
- Rubin, B.E.R., Ree, R.H., and Moreau, C.S. (2012). Inferring Phylogenies from RAD Sequence Data. *PLoS ONE* 7, e33394.
- Rundle, H.D., and Nosil, P. (2005). Ecological speciation: Ecological speciation. *Ecology Letters* 8, 336–352.
- Sabourault, C., Ganot, P., Deleury, E., Allemand, D., and Furla, P. (2009). Comprehensive EST analysis of the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *BMC Genomics* 10, 333.
- Samadi, S., and Barberousse, A. (2015). Species. In *Handbook of Evolutionary Thinking in the Sciences*, T. Hearn, P. Huneman, G. Lecointre, and M. Silberstein, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 141–157.
- Sanford, E., and Kelly, M.W. (2011). Local Adaptation in Marine Invertebrates. *Annual Review of Marine Science* 3, 509–535.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463–5467.
- Sauer, K.P. (1986). Strategien zeitlicher und räumlicher Einnischung. *Verhandlungen Der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 11–30.

- Sauer, K.P., Müller, M., and Weber, M. (1986). Alloimmune memory for glycoprotein recognition molecules in sea anemones competing for space. *Marine Biology* 92, 73–79.
- Savolainen, O., Lascoux, M., and Merilä, J. (2013). Ecological genomics of local adaptation. *Nature Reviews Genetics* 14, 807–820.
- Schäfer, W. (1984). Fortplanzung und Entwicklung von *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actiniaria). I. Fortplanzungszyklus und Struktur der Oocyten vor und nach den Besamung. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 135–148.
- Schluter, D. (2000). Ecological Character Displacement in Adaptive Radiation. *The American Naturalist* 156, S4–S16.
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 372–380.
- Schluter, D. (2009). Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science* 323, 737–741.
- Schmidt, H. (1972). Prodröm zu einer Monographie der mediterranen Aktinien. *Zoologica* 1–146.
- Schmidt, P.S., and Rand, D.M. (2001). Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: Habitat and life stage specific survivorship of *mpi* genotypes. *Evolution* 55, 1336.
- Schmidt-Roach, S., Lundgren, P., Miller, K.J., Gerlach, G., Noreen, A.M.E., and Andreakis, N. (2013a). Assessing hidden species diversity in the coral *Pocillopora damicornis* from Eastern Australia. *Coral Reefs* 32, 161–172.
- Schmidt-Roach, S., Miller, K.J., and Andreakis, N. (2013b). *Pocillopora aliciae*: a new species of scleractinian coral (Scleractinia, Pocilloporidae) from subtropical Eastern Australia. *Zootaxa* 3626, 576.
- Schmidt-Roach, S., Miller, K.J., Lundgren, P., and Andreakis, N. (2014). With eyes wide open: a revision of species within and closely related to the *Pocillopora damicornis* species complex (Scleractinia; Pocilloporidae) using morphology and genetics: *Pocillopora* Species. *Zoological Journal of the Linnean Society* 170, 1–33.
- Schwaninger, H.R. (1999). Population structure of the widely dispersing marine bryozoan *Membranipora membranacea* (Cheilostomata): implications for population history, biogeography, and taxonomy. *Marine Biology* 411–423.
- Seehausen, O., Butlin, R.K., Keller, I., Wagner, C.E., Boughman, J.W., Hohenlohe, P.A., Peichel, C.L., Saetre, G.-P., Bank, C., Brännström, Å., et al. (2014). Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics* 15, 176–192.
- Shearer, T.L., Van Oppen, M.J.H., Romano, S.L., and Wörheide, G. (2002). Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology* 11, 2475–2487.
- Sherman, C.D.H., and Ayre, D.J. (2008). Fine-scale adaptation in a clonal sea anemone. *Evolution* 62, 1373–1380.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59, 223–239.
- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., Fujie, M., Fujiwara, M., Koyanagi, R., Ikuta, T., et al. (2011). Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* 476, 320–323.
- Smith, J.B., Schneider, S.H., Oppenheimer, M., Yohe, G.W., Hare, W., Mastrandrea, M.D., Patwardhan, A., Burton, I., Corfee-Morlot, J., Magadza, C.H., et al. (2009). Assessing dangerous climate change through an

- update of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) “reasons for concern.” Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 4133–4137.
- Solé-Cava, A.M., Russo, C.A.M., Araujo, M.E., and Thorpe, J.P. (1994). Cladistic and phenetic analysis of allozyme data for nine species of sea anemones of the family Actiniidae (Cnidaria: Anthozoa). *Biological Journal of the Linnean Society* *52*, 225–239.
- Somero, G.N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers.” *Journal of Experimental Biology* *213*, 912–920.
- Sork, V.L., Aitken, S.N., Dyer, R.J., Eckert, A.J., Legendre, P., and Neale, D.B. (2013). Putting the landscape into the genomics of trees: approaches for understanding local adaptation and population responses to changing climate. *Tree Genetics & Genomes* *9*, 901–911.
- Stat, M., Baker, A.C., Bourne, D.G., Correa, A.M.S., Forsman, Z., Huggett, M.J., Pochon, X., Skillings, D., Toonen, R.J., van Oppen, M.J.H., et al. (2012). Molecular Delineation of Species in the Coral Holobiont. In *Advances in Marine Biology*, (Elsevier), pp. 1–65.
- Stefani, F., Benzoni, F., Yang, S.-Y., Pichon, M., Galli, P., and Chen, C.A. (2011). Comparison of morphological and genetic analyses reveals cryptic divergence and morphological plasticity in *Stylophora* (Cnidaria, Scleractinia). *Coral Reefs* *30*, 1033–1049.
- Stenseth, N.C. (2002). Ecological Effects of Climate Fluctuations. *Science* *297*, 1292–1296.
- Stillman, J.H., and Armstrong, E. (2015). Genomics Are Transforming Our Understanding of Responses to Climate Change. *BioScience* *65*, 237–246.
- Storey, J., Bass, J., Dabney, A., and Robinson, D. (2015). Q-value estimation for false discovery rate control. R package version 2.4.2.
- Storz, J.F. (2005). Invited review: Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology* *14*, 671–688.
- Subramanian, S., and Kumar, S. (2003). Neutral Substitutions Occur at a Faster Rate in Exons Than in Noncoding DNA in Primate Genomes. 838–844.
- Suchan, T., Espíndola, A., Rutschmann, S., Emerson, B.C., Gori, K., Dessimoz, C., Arrigo, N., Ronikier, M., and Alvarez, N. (2017). Assessing the potential of RAD-sequencing to resolve phylogenetic relationships within species radiations: The fly genus *Chiastocheta* (Diptera: Anthomyiidae) as a case study. *Molecular Phylogenetics and Evolution* *114*, 189–198.
- Sunday, J.M., Pecl, G.T., Frusher, S., Hobday, A.J., Hill, N., Holbrook, N.J., Edgar, G.J., Stuart-Smith, R., Barrett, N., Wernberg, T., et al. (2015). Species traits and climate velocity explain geographic range shifts in an ocean-warming hotspot. *Ecology Letters* *18*, 944–953.
- Suzuki, M.M., Nishikawa, T., and Bird, A. (2005). Genomic Approaches Reveal Unexpected Genetic Divergence Within *Ciona intestinalis*. *Journal of Molecular Evolution* *61*, 627–635.
- Szöllősi, G.J., and Daubin, V. (2012). Modeling Gene Family Evolution and Reconciling Phylogenetic Discord. In *Evolutionary Genomics*, M. Anisimova, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 29–51.
- Szöllősi, G.J., Tannier, E., Daubin, V., and Boussau, B. (2015). The Inference of Gene Trees with Species Trees. *Systematic Biology* *64*, e42–e62.
- Technau, U., and Schwaiger, M. (2015). Recent advances in genomics and transcriptomics of cnidarians. *Marine Genomics*.

- Tenaillon, M.I., and Tiffin, P.L. (2008). The quest for adaptive evolution: a theoretical challenge in a maze of data. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 110–115.
- Terraneo, T.I., Berumen, M.L., Arrigoni, R., Waheed, Z., Bouwmeester, J., Caragnano, A., Stefani, F., and Benzoni, F. (2014). *Pachyseris inattesa* sp. n. (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia): a new reef coral species from the Red Sea and its phylogenetic relationships. *ZooKeys* 433, 1–30.
- Tiffin, P., and Ross-Ibarra, J. (2014). Advances and limits of using population genetics to understand local adaptation. *Trends in Ecology & Evolution* 29, 673–680.
- Todd, P.A. (2008). Morphological plasticity in scleractinian corals. *Biological Reviews* 83, 315–337.
- Trench, R.K. (1979). The cell biology of plant-animal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology* 30, 485–531.
- Trench, R.K. (1993). Microalgal-Invertebrate Symbioses - A Review. *Endocytobiosis and Cell Research* 9, 135–175.
- Van Valen, L. (1976). Ecological Species, Multispecies, and Oaks. *Taxon* 25, 233.
- Vecchi, G.A., Fueglistaler, S., Held, I.M., Knutson, T.R., and Zhao, M. (2013). Impacts of Atmospheric Temperature Trends on Tropical Cyclone Activity. *Journal of Climate* 26, 3877–3891.
- Ventura, P., Jarrold, M., Merle, P., Barnay-Verdier, S., Zamoum, T., Rodolfo-Metalpa, R., Calosi, P., and Furla, P. (2016). Resilience to ocean acidification: decreased carbonic anhydrase activity in sea anemones under high pCO₂ conditions. *Marine Ecology Progress Series* 559, 257–263.
- Vermeer, M., and Rahmstorf, S. (2009). Global sea level linked to global temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 21527–21532.
- Veron, J.E.N. (2000). *Corals of the world* (Australian Institute of Marine Science).
- Veron, J.E.N., and Pichon, M. (1976). *Scleractinia of eastern Australia. Part I: Families Thamnasteriidae, Astrocoeniidae, Pocilloporidae* (Australian Government Publishing Service).
- de Villemereuil, P., and Gaggiotti, O.E. (2015). A new F_{ST} -based method to uncover local adaptation using environmental variables. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 1248–1258.
- Visram, S., Wiedenmann, J., and Douglas, A.E. (2006). Molecular diversity of symbiotic algae of the genus *Symbiodinium* (Zooxanthellae) in cnidarians of the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 86, 1281.
- Wagner, C.E., Keller, I., Wittwer, S., Selz, O.M., Mwaiko, S., Greuter, L., Sivasundar, A., and Seehausen, O. (2013). Genome-wide RAD sequence data provide unprecedented resolution of species boundaries and relationships in the Lake Victoria cichlid adaptive radiation. *Molecular Ecology* 22, 787–798.
- Ware, J.R., Fautin, D.G., and Buddemeier, R.W. (1996). Patterns of coral bleaching: modeling the adaptive bleaching hypothesis. *Ecological Modelling* 84, 199–214.
- Warner, P.A., van Oppen, M.J.H., and Willis, B.L. (2015). Unexpected cryptic species diversity in the widespread coral *Seriatopora hystrix* masks spatial-genetic patterns of connectivity. *Molecular Ecology* 24, 2993–3008.
- Wiedenmann, J., Rucker, C., and Funke, W. (1999). The morphs of *Anemonia* aff. *sulcata* (Cnidaria, Anthozoa) in particular consideration of the ectodermal pigments. *Verhandlungen Der Gesellschaft Fur Okologie*.

- Wiedenmann, J., Elke, C., Spindler, K.-D., and Funke, W. (2000a). Cracks in the β -can: Fluorescent proteins from *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actinaria). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 14091–14096.
- Wiedenmann, J., Kraus, P., Funke, W., and Vogel, W. (2000b). The relationship between different morphs of *anemonia* aff. *Sulcata* evaluated by DNA fingerprinting (Anthozoa, Actinaria). *Ophelia* 52, 57–64.
- Williams, G.C. (1993). *Natural selection : domains, levels and challenges* (New York: Oxford University Press).
- Williams, R.B. (1992). Pedal disc detachment of the sea anemone *Anemonia viridis*: a newly recognized response to tentacle contact between colour varieties. *Scientia Marina* 56, 337–346.
- Xie, S.-P., Deser, C., Vecchi, G.A., Ma, J., Teng, H., and Wittenberg, A.T. (2010). Global Warming Pattern Formation: Sea Surface Temperature and Rainfall*. *Journal of Climate* 23, 966–986.
- Yang, Z. (2015). The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Current Zoology* 61, 854–865.
- Yang, Y., Wang, L., Han, J., Tang, X., Ma, M., Wang, K., Zhang, X., Ren, Q., Chen, Q., and Qiu, Q. (2015). Comparative transcriptomic analysis revealed adaptation mechanism of *Phrynocephalus erythrurus*, the highest altitude Lizard living in the Qinghai-Tibet Plateau. *BMC Evolutionary Biology* 15.
- Zamer, W.E., and Mangum, C.P. (1979). Irreversible nongenetic temperature adaptation of oxygen uptake in clones of the sea anemone *Haliplanella Luciae* (Verrill). *The Biological Bulletin* 157, 536–547.
- Zamoum, T., and Furla, P. (2012). Symbiodinium isolation by NaOH treatment. *Journal of Experimental Biology* 215, 3875–3880.
- Zhan, A., Macisaac, H.J., and Cristescu, M.E. (2010). Invasion genetics of the *Ciona intestinalis* species complex: from regional endemism to global homogeneity. *Molecular Ecology* 19, 4678–4694.
- Zhang, Z.-Q. (2013). Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. *Zootaxa* 3703, 5.