



HAL
open science

Diversités génétiques chez l'holobiotte *Anemonia viridis* : des morphotypes de l'hôte à la différenciation symbiotique

Barbara Porro

► To cite this version:

Barbara Porro. Diversités génétiques chez l'holobiotte *Anemonia viridis* : des morphotypes de l'hôte à la différenciation symbiotique. Biodiversité et Ecologie. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR4071 . tel-02736573

HAL Id: tel-02736573

<https://theses.hal.science/tel-02736573v1>

Submitted on 2 Jun 2020

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

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



THÈSE DE DOCTORAT

Diversités génétiques chez l'holobiotte *Anemonia viridis* :

des morphotypes de l'hôte à la différenciation symbiotique

Barbara PORRO

IRCAN UMR 7284 – Embryogenesis Regeneration & Aging team

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de l'Environnement
de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Pr. Paola Furla
Co-encadrée par : Dr. Didier Forcioli

Devant le jury, composé de :
Sophie Arnaud-Haond, Dr., IFREMER
Didier Aurelle, MCU, Aix-Marseille Université
Sébastien Duperron, Pr., MNHN
Cécile Fauvelot, Dr., IRD
Dominique Higuët, Pr., Sorbonne Université

Soutenue le : 15 novembre 2019

Diversités génétiques chez l'holobiotte *Anemonia viridis* : des morphotypes de l'hôte à la différenciation symbiotique

Jury :

Président du jury

Sébastien Duperron, Pr., Museum National d'Histoire Naturelle

Rapporteurs

Cécile Fauvelot, Chargée de recherche, Institut de Recherche pour le Développement

Dominique Higuët, Pr., Sorbonne Université

Examineurs

Didier Aurelle, MCU, Aix-Marseille Université

Paola Furla, Pr., Université Côte d'Azur (directeur de thèse)

Didier Forcioli, MCU, Université Côte d'Azur (co-directeur de thèse)

Invité

Sophie Arnaud-Haond, Cadre de recherche., Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

Diversités génétiques chez l'holobiotte *Anemonia viridis*

Qu'est-ce qu'un individu ? Cette question est un prérequis pour toutes les études en génétique des populations et en biologie évolutive, mais elle est loin d'être naïve dès que l'on prend en compte les relations symbiotiques. Les interactions entre un hôte et ses micro-organismes symbiotiques peuvent conditionner le développement, la reproduction, les capacités adaptatives de l'holobiotte qu'ils constituent et donc la trajectoire évolutive de l'espèce. Comprendre ces interactions, c'est appréhender la complexité des interactions symbiotiques et donc caractériser ces différents partenaires et élucider l'implication de chaque partenaire dans le fonctionnement de l'holobiotte. Chez les Cnidaires, comme l'anémone de mer *Anemonia viridis*, les hôtes animaux peuvent établir une symbiose mutualiste avec des Dinoflagellés photosynthétiques de la famille des Symbiodiniacées (avec un seul clade de Symbiodiniacées pour *A. viridis*). Cette anémone de mer tempérée présente différents morphes caractérisés par la couleur des tentacules. Afin de comprendre la nature de cette diversité phénotypique et mesurer la diversité symbiotique associée chez *A. viridis*, nous avons génotypé des anémones de Manche et de Méditerranée à l'aide de séquençage RAD (pour l'hôte animal) et de marqueurs ciblés, ITS2 et microsatellites (pour les symbiotes). Nos études ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs lignées génétiques différenciées en sympatrie chez l'hôte animal, mais qui ne sont pas congruentes avec la différenciation morphologique. La composition des populations de symbiotes *in hospite* quant à elle n'est pas corrélée avec ces lignées hôtes mais structurées par l'origine géographique des anémones. Ces résultats révèlent qu'*A. viridis* telle que décrite à l'heure actuelle correspond un complexe d'espèces qui, en plus d'hériter verticalement leurs symbiotes, semblent capables également de les acquérir horizontalement. Cette symbiose dynamique implique que la sélection puisse agir indépendamment aussi bien sur la composition symbiotique que sur l'hôte; et fait d'*A. viridis* un excellent modèle pour comprendre les capacités adaptatives d'un holobiotte.

Mots clés : Symbiose mutualiste, Holobiotte, Différenciation morphologique, Diversité génétique, Acquisition des symbiotes, Clonalité, Complexe d'espèces

Genetic diversities in *Anemonia viridis* holobiont

What is an individual ? This apparently naive question is actually the first step of studies of population genetics and evolutionary biology, but is non-trivial in symbiotic organisms. The interaction among a host and its symbiotic micro-organisms can influence the development, the reproduction and the adaptative capacities of the holobiont and the evolutive trajectories of species. If we want to understand these interactions, we have to decipher the complexity of symbiotic interactions by characterizing the different partners and to measure the role of each partner in the proper functioning of the holobiont. In *Anemonia viridis* (as in many other Cnidarians), the animal hosts can live in mutualistic symbiosis with photosynthetic Dinoflagellates belonging to the Symbiodiniaceae family (with one Symbiodiniaceae clade for *A. viridis*). This anemone displays different colour morphs. To understand the origin of the phenotypic diversity but also to measure the associated symbiotic diversity, we genotyped sea anemones from English Channel and Mediterranean Sea with RAD sequencing (for the animal host) and targeted markers, the ITS2 and microsatellite markers (for the symbionts). Our studies revealed several sympatric host genetic lineages which were not congruent with the morphological differentiation. In addition, the symbiotic diversity was not correlated with host genetic lineages but with the sampling location of sea anemones. These results revealed that *A. viridis* is actually a species complex with both intergenerational vertical transmission and probably an additional horizontal acquisition of Symbiodiniaceae. Because *A. viridis* shows a dynamic symbiosis, selection can act independently on both the symbiotic composition and the host. This makes *A. viridis* an interesting laboratory model to understand adaptative capacities in an holobiont.

Keywords : Mutalistic symbiosis, Holobiont, Morphological differentiation, Genetic Diversity, Symbiont acquisition, Clonality, Species complex

**“Qui étais-je avant
Que serais-je après
Ce bref parcours de vie
Encerclé de mystère ?”**

Extrait de « *Le secret* » tiré de *Rythmes*,
Andrée Chedid

Remerciements

La thèse que vous tenez entre vos mains (et/ou que vous lisez sur un écran...) existe parce que des personnes ont su attiser ma curiosité, m'ont montré comment la nourrir et pour certaines, m'ont donné l'opportunité de travailler avec elles. C'est aussi grâce aux personnes qui ont pris le temps d'évaluer mon travail que tout cela peut aboutir. Je remercie donc les membres du jury d'avoir accepté de faire partie de ce qui est pour moi une sacrée aventure. Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse pour leurs conseils : Mary-Alice Coffroth, Solenn Stoeckel, et Sébastien Duperron.

Merci à Dominique Higuët de m'avoir permis de débiter ma thèse au sein de l'IBPS et merci à Eric Gilson de m'avoir permis de l'achever à l'IRCAN. Merci également à Eric Rottinger pour son accueil au sein de son équipe et à l'intérêt et la curiosité qu'il a portés à mon sujet.

Je me rends compte que cette section de "rédaction libre" est réduite et tout de même contraignante par rapport à toute la gratitude que j'aimerais exprimer. Je risque de ne pas rendre justice à toutes les personnes que je voudrais remercier, mais il y en a bien deux que je ne peux pas manquer de remercier : Merci Paola ! Merci Didier ! Merci pour vos enseignements, votre encadrement, pour votre soutien et les possibilités que vous m'avez offertes. Vous faites partie de ceux sans lesquels je ne serais pas là aujourd'hui. Pas seulement en qualité de directeurs de thèse mais parce que vous avez profondément marqué l'étudiante que j'étais et le chercheur que j'espère devenir. Vous ne vous êtes jamais positionnés comme modèles à suivre mais en véritables mentors me laissant la possibilité d'apporter ma patte à tout ça. J'aimerais profiter de ces quelques lignes pour faire mon *mea culpa* concernant les blagues et les jeux de mots maladroits que vous avez supportés pendant ces quelques années ... Merci de ne pas m'avoir 'remerciée' pour ça 😊

Et ce ne sont pas les seuls à m'avoir supportée (dans tous les sens du terme) ... Je dois dire que sans le reste de l'équipe cette thèse n'aurait pas été la même ! Dans le désordre :

Merci Steph de m'avoir accueillie dans ton bureau pendant quelques temps (bon, j'ai hérité de la table des parasites, mais au moins ça collait au sujet ...), merci pour tous les échanges que l'on a eus (désolée pour les fois où nos discussions ont trainé dans la soirée). La possibilité d'entendre parler d'autres sujets que la génétique des populations m'a permis d'apprécier d'autres facettes de notre *Anemonia*. Merci pour tes conseils, ton attention et ton soutien.

Merci Thamilla, historiquement, tu es la première à m'avoir formée aux bonnes pratiques de labo. Ça n'a pas dû être de tout repos... Les échanges que nous avons eu font partie de ces moments parfois anodins mais qui m'ont permis de me poser des questions et de me remettre en question.

Merci à Richard pour ces riches discussions, tous ces petits trucs de code, pour ces

Remerciements

souvenirs et ces expériences que tu partages avec nous. Merci aussi pour tes bons mots ...

Brigitte, tu es la Wonderwoman de l'administration ! Merci pour ton peps et ta présence. Tu es un exemple de persévérance et de capacité d'adaptation 😊

Petit lot groupé pour les "grands" : Cédric et Patrícia. Tic, jumeau de labo que j'ai été heureuse de retrouver pour partager deux ans de thèse. Merci d'avoir débroussaillé le terrain – au sens propre pour le coup – côté hôte. Merci pour tes conseils en musique, pour ces blagues non-dites parce qu'un simple coup d'œil suffisait pour nous faire exploser de rire. Ti'chat, camarade d'escrime en mousse, j'ai eu le privilège de t'avoir pour voisine de bureau (comment Steph n'a pas fini par tourner en bourrique, ça ? ...). Merci à tous les deux pour les super bons moments qu'on a passés au labo comme à l'extérieur ! N'oublions pas non plus Pierre (on lui a fait suffisamment le coup à midi...). En plus d'être un super cuisto (je pense que je dois te remercier pour pas mal de kilos), tu es une boîte à outils sur pattes (si si plus que moi 😊). J'avais dit que je ne l'oublierai pas : Merci pour le fil de pêche qui a sauvé un bouton de blouse et donc un après-midi de manip'.. Et plus sérieusement merci de ton attention et de ton amitié.

Aldine et Joao, merci pour vos conseils et les discussions improvisées devant la machine à café, entre deux portes de bureau ou le soir juste avant de partir comme ça l'air de rien ^^

Pierre-Laurent, où que tu sois, saches que tes réflexions pas toujours tendres sont de précieux conseils que j'ai toujours gardés en tête.

Je voudrais aussi remercier des collaborateurs qui ont contribué par leurs conseils et leur aide au développement du projet, Guillaume Achaz, Marie Suez. Merci pour votre accueil.

Il y a toutes les personnes qui ont un lien direct avec les sciences que j'ai eu le plaisir de connaître et parfois avec qui j'ai pu partager une bonne bière. Sans avoir forcément participé aux "tempêtes de cerveau", les bons moments passés avec vous ont contribué à l'ambiance générale. 😊 Merci Alexis (ton abrobation visuelle quand tu entrais dans la salle commune après nos décorations m'a toujours beaucoup touchée), François (pour ton franc parlé, sans oublier ta sélection d'ouvrages sur la basse). Emilie Aubin, Clara, Eugenio, Adrien, Riccardo, Pauline, Maxence et Rita, merci les jeunes ! 😊 Merci Antonio et Sylvaine (<°))><. Et bien sûr merci à vous Géraldine et Lionel, vous n'imaginez pas à quel point votre présence compte pour moi.

Merci de m'avoir fait sentir que je faisais partie d'une équipe.

De gros BiZouX aux gnomes ! (qui sont de moins en moins petits ...)

Il y a aussi les personnes que j'ai rencontrées avant de commencer ma thèse qui ont contribué, à mon éducation scientifique. Je pense notamment aux membres des équipes de Sète et de Montpellier avec qui j'ai travaillé, appris énormément et partagé une belle expérience

humaine.

Bon, je parlais plus haut de « personnes qui ont attisé (ou alimenté) ma curiosité », d'« éducation scientifique »... tout ça, tout ça... mais les responsables où sont-ils ? ... Merci à ma famille (*lato sensu*) ! Je me suis rendue compte que, quel que soit le moyen d'expression ou le sujet qui piquait ma curiosité, vous m'avez donné les moyens de m'y essayer. Vous m'avez montré, fait entendre, comprendre des choses. Celles-ci m'ont servi et me servent encore de support sur lequel je peux accrocher et construire ce que je continue d'apprendre aujourd'hui. Les racines que vous m'avez données ne m'enchaînent pas, mais me permettent de grandir et d'aller plus loin.

Je dois avouer qu'il en aura existé des versions des remerciements... sans qu'aucune ne me satisfasse complètement. Celle-ci est donc le reflet d'une infime partie de toute la gratitude que j'ai pour les personnes, nommées ou non ici (j'en oublie probablement et je le déplore) qui ont participé de près, ou d'un peu plus loin, à ces années. Merci à vous ! A vous tous !

Qui que vous soyez entrain de lire ceci, vous l'aurez peut-être compris, ce travail s'inscrit dans un tout que cela soit une problématique ou une thématique d'équipe, un petit bout d'existence ou une consécration, j'espère que la route sera très longue et riche pour nous tous, alors... A nous ! et ...

M E R C I !



Sommaire

Remerciements.....	ix
Sommaire.....	xii
Table des figures.....	xiv
Table des tableaux.....	xvi
Publications.....	xvii
Articles issus de la thèse.....	xvii
Publications hors thèse.....	xvii
I. L'holobiotte, une unité évolutive composite.....	3
I.1. De l'individu à l'holobiotte.....	3
I.1.1. Les interactions interspécifiques au sein d'un holobiotte.....	4
I.1.1. Délimitation d'un individu symbiotique.....	6
I.2. La symbiose comme moteur de l'évolution.....	8
I.2.1. De l'antagonisme au mutualisme.....	8
I.2.2. Evolution d'un holobiotte.....	9
I.2.2.1. « 1 + 1 = 1 ».....	9
I.2.2.2. « 1 + 1 > 2 ».....	11
I.3. Un holobiotte « devenu » autotrophe : la symbiose Cnidaire – Dinoflagellés.....	15
I.3.1. Les Cnidaires symbiotiques.....	15
I.3.2. Les Symbiodiniacées symbiotiques.....	17
I.3.3. Fonctionnement et dynamique de l'holobiotte Anthozoaire-Symbiodiniacées	20
I.4. Une anémone de mer symbiotique : <i>Anemonia viridis</i>	24
I.4.1. Une figure emblématique des écosystèmes côtiers méditerranéens.....	24
I.4.2. Des morphotypes ou des espèces cryptiques chez <i>A. viridis</i> ?.....	28
I.4.3. Les Symbiodiniacées d' <i>Anemonia viridis</i>	31
I.5. Objectifs de la thèse.....	33
II. Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique.....	37
II.1. Origine des variations morphologiques.....	37
II.2. Identification de pools génétiques et délimitation d'espèces.....	39
II.3. De la variation morphologique à la différenciation génétique chez les Cnidaires...	41
II.4. Des espèces cryptiques chez <i>Anemonia viridis</i> ?.....	44
II.4.1. Echantillonnage des morphes en Europe.....	45
II.4.2. Génotypage.....	46
II.4.2.1. Marqueurs génétiques et niveau de divergence de l'hôte animal.....	46
II.4.2.2. Caractérisation des populations de Symbiodiniacées.....	47
II.4.3. Résultats majeurs.....	47

II.4.3.1.	Divergence des morphes d' <i>A. viridis</i>	47
II.4.3.2.	Différenciation génétique hôte et composition symbiotique.....	52
Annexes	Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique	57
A1.	Conspicuous morphological differentiation without speciation in <i>Anemonia viridis</i> (Cnidaria, Actiniaria).....	59
A2.	The many faced symbiotic snakelocks anemone (<i>Anemonia viridis</i> , Anthozoa): host and symbiont genetic differentiation among colour morphs.	89
III.	Dynamique d'association hôte-symbiote.....	127
III.1.	Un holobiote, un individu changeant ?.....	127
III.2.	Des modes d'acquisition multiples chez <i>A. viridis</i> ?.....	129
III.2.1.	Echantillonnage de populations méditerranéennes.....	131
III.2.2.	Génotypage	132
III.2.2.1.	Identification des clones chez l'hôte animal.....	132
III.2.2.2.	Caractérisation des Symbiodiniacées associées.....	132
III.2.3.	Résultats majeurs	136
III.2.3.1.	Des lignées génétiques hôte partageant une même diversité symbiotique.....	136
III.2.3.2.	Des « ramets » symbiotiquement différents.....	138
Annexes	Dynamique d'association hôte-symbiote.....	141
A3.	Geography shapes symbiont composition in <i>Anemonia viridis</i> lineages from the Mediterranean Sea	143
IV.	Discussion, Conclusions & Perspectives.....	173
IV.1.	La nature des morphes d' <i>Anemonia viridis</i>	173
IV.1.1.	Un polymorphisme et pas une divergence	173
IV.1.2.	Une plasticité phénotypique ou une origine génétique des morphes ?	174
IV.2.	<i>A. viridis</i> , un complexe d'espèces	176
IV.2.1.	Ménage à six	176
IV.2.2.	Une diversité génétique fonctionnelle ?.....	180
IV.3.	Des populations dynamiques de symbiotes mutualistes structurées par la géographie	181
IV.4.	L'holobiote comme unité de sélection ?	183
	Références bibliographiques.....	189

Table des figures

Figure I.1-1. Schéma d'un holobiotte.	4
Figure I.1-2. Continuum des interactions inter-espèces en considérant les effets de l'association sur les fitness des deux partenaires	5
Figure I.2-1 : Illustration du concept d'hologénome.....	10
Figure I.2-2 : Schéma d'un holobiotte corallien.....	11
Figure I.2-3. Intégration des symbioses dans l'évolution du vivant.....	12
Figure I.2-4. Diversité des symbiotes photosynthétiques trouvés dans les différents embranchements animaux..	14
Figure I.3-1. Phylogénie des Cnidaires	15
Figure I.3-2 : Plan d'organisation des deux morphologies/formes trouvées chez les Cnidaires.....	16
Figure I.3-3 : Phylogénie des Symbiodiniacées sur la base d'un marqueur nucléaire ribosomal (LSU).....	18
Figure I.3-4. Structure macroscopique et microscopique d'un polype symbiotique d'Anthozoaire.	19
Figure I.3-5 : Production et transfert de la matière organique (A) et de l'O ₂ (B) au niveau cellulaire par une Symbiodiniacée photosynthétique (symbiote) chez un Anthozoaire (hôte)	20
Figure I.3-6 : Etat symbiotique d'un corail confronté à des variations de température.....	21
Figure I.3-7 : Distribution bathymétrique de quatre clades/genres de Symbiodiniacées	23
Figure I.4-1 : <i>Anemonia viridis</i> dans la famille des Actiniaires	25
Figure I.4-2 : <i>Anemonia viridis</i> , dans son milieu naturel (à gauche) et en aquarium (à droite).	26
Figure I.4-3. Distribution géographique d' <i>Anemonia viridis</i> (carte principale) et probabilité d'habitats disponibles en Méditerranée (encart en haut à gauche). Voir les notes en bas de page pour les références	28
Figure I.4-4 : Les cinq morphes d' <i>A. viridis</i>	30
Figure I.4-5 : Arbre phylogénétique des Symbiodiniacées basé sur les séquences ITS.....	32
Figure II.2-1 : Les différentes étapes de la taxonomie intégrative.	40
Figure II.3-1 : Diversité morphologique et différenciation génétique chez <i>Cassiopea andromeda</i> (A) <i>Stylophora madagascarensis</i> (B) et <i>Actinia fragacea</i> (C).	42
Figure II.3-2 : Composition en Symbiodiniacées en fonction de la couleur et l'habitat lumineux de l'hôte.....	44
Figure II.4-1 : Morphes et localisation des individus d' <i>Anemonia viridis</i> échantillonnés sur les côtes européennes.	45
Figure II.4-2 : Efficacité des approches EPIC et Séquençage RAD dans la différenciation de pools géniques. ...	46
Figure II.4-3 : Différents partitionnements des individus d' <i>A. viridis</i> et leur vraisemblance.	48
Figure II.4-4 : Distribution géographique des clusters génétiques identifiés avec <i>snmf</i>	49
Figure II.4-5 : Pertinence du partitionnement des anémones de mer en fonction des morphes, de la région d'origine ou des clusters génétiques.....	51
Figure II.4-6 : Séquences ITS2 amplifiées dans les populations de Symbiodiniacées associées à <i>A. viridis</i>	53

<i>Figure II.4-7 : Analyse discriminante en composante principale sur les ITS2 (SymPortal) en fonction des clades/clusters hôte</i>	55
<i>Figure III.1-1 : Influence du mode de transmission des symbiotes sur la diversité génétique symbiotique attendue intra-hôte</i>	128
<i>Figure III.2-1 : Photographie d'une larve d'<i>A. viridis</i> au stade <i>edwardsia</i></i>	130
<i>Figure III.2-2 : Récapitulatif des marqueurs utilisés sur les Symbiodiniacées (à droite) et le niveau taxonomique pertinent pour interpréter la diversité génétique mesurée (à gauche)</i>	133
<i>Figure III.2-3 : Distirbutions des fréquences relatives pour les quatres marqueurs microsatellites de Symbiodiniacées</i>	135
<i>Figure III.2-4 : Identification et répartition des quatre lignées (clusters) méditerranéennes nord-occidentales d'<i>A. viridis</i></i>	137
<i>Figure III.2-5 : Analyse du contenu symbiotique au sein de MLL multi-sites</i>	139
<i>Figure IV.2-1 : Phylogénie de l'ensemble des individus de Manche et de Méditerranée échantillonnés pour la thèse (N = 257 individus)</i>	179

Table des tableaux

<i>Tableau I.4-1 : Liste des espèces trouvées associées à Anemonia viridis en Méditerranée. Ces espèces ont pu être trouvées dans l'anémone (Interne) ou à l'extérieur de celle-ci (Externe) ou encore portant ou transportant l'anémone (Porte). (Tableau modifié de Patzner 2004).....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau II.3-1 : Sensibilité des marqueurs moléculaires dans l'identification de groupes génétiques différenciés inter et intra espèces morphologiquement décrites chez des coraux (en gris) et des anémones de mer (en blanc)</i>	<i>43</i>
<i>Tableau II.4-1 : Distribution géographique des espèces cryptiques chez Anemonia viridis en Méditerranée et en Manche</i>	<i>52</i>
<i>Tableau II.4-2 : Comparaison deux-à-deux de la distribution de la diversité d'ITS2 entre clades/clusters génétiques hôtes. Les p-values en gras correspondent aux comparaisons statistiquement significatives après une correction FDR.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau III.2-1 : Différenciation de la composition symbiotique basée sur l'ITS2 (partie supérieure) ou les distributions de microsattellites (partie inférieure)</i>	<i>138</i>
<i>Tableau IV.1-1 : Récapitulatif des hypothèses expliquant la nature des morphes</i>	<i>174</i>
<i>Tableau IV.2-1 : Distribution géographique des espèces cryptiques chez Anemonia viridis en Méditerranée et en Manche.</i>	<i>177</i>

Publications

Articles issus de la thèse

Mallien C, **Porro B**, Zamoum T, Olivier C, Wiedenmann J, Furla P, Forcioli D, 2017. Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria). *Syst. Biodivers.* 16(3):271–86

Porro B, Mallien C, Hume BCC, Pey A, Aubin E, Christen R, Voolstra CR, Furla P, Forcioli D. 2019. The many faced symbiotic snakelocks anemone (*Anemonia viridis*, Anthozoa): host and symbiont genetic differentiation among colour morphs. *Heredity.* 1–16

Porro B, Zamoum T, Mallien C, Hume BCC, Voolstra CR, Furla P, Forcioli D. *in prep.* Geography shapes symbiont composition in *Anemonia viridis* lineages from the Mediterranean Sea.

Publications hors thèse

Porro B, Alloncle N, Bierne N, Arnaud-Haond S. 2019. *Connectivité et protection de la biodiversité marine - Dynamique spatiale des organismes marins*. Editions Quae ed.

Stoeckel S, **Porro B**, Arnaud-Haond S. 2019. The discernible and hidden effects of clonality on the genotypic and genetic states of populations: improving our estimation of clonal rates. ArXiv190209365 Q-Bio. Accepté à PCiEvolBiol.

L'holobiotte, une unité évolutive composite

I. L'holobiotte, une unité évolutive composite

I.1. De l'individu à l'holobiotte

Qu'est-ce qu'un individu ? Étymologiquement, c'est une entité indivisible (du latin *individuum*), et une des définitions du dictionnaire Larousse est : « un être vivant [...] distinct et délimité ». Dans ce même dictionnaire, une autre définition propose « être [...], personne par opposition au groupe [...] ». Un individu devrait donc être une unité clairement reconnaissable et identifiable dans une population. D'un point de vue anatomique, Gilbert (2012) définit l'individu comme un 'tout structuré', ce qui est une définition classique de l'individu, celle que l'on trouve dans le dictionnaire. Pourtant en y regardant de plus près, la plupart des « individus » résultent de l'association et de l'interaction entre des organismes différents et bien souvent phylogénétiquement éloignés. Un exemple particulièrement proche : que serions-nous sans notre flore bactérienne (comprenant plus d'une centaine d'espèces de bactéries présentes de façon pérenne, Qin et al. 2010) ? Probablement peu de choses compte tenu de son rôle dans notre nutrition et nos défenses immunitaires (Singh et al. 2013) ou notre comportement (Cryan & Dinan 2012). Si bien qu'il est parfois difficile de définir les « véritables » limites de ce qu'est un individu et de ce qui le compose.

Pour mieux décrire et comprendre cette complexité, l'organisme symbiotique a été qualifié d'*holobiotte* ou holobiotte (forme francisée de l'anglais *holobiont*). Utilisé dès les années 1970 pour décrire les lichens (association entre un champignon et une algue) (Scott 1973), la définition du terme est souvent attribuée à Lynn Margulis, qui présente l'holobiotte comme l'association des différents *biotes* (organismes d'espèces différentes) (Margulis & Fester 1991). La notion d'holobiotte repopularisée plus récemment par Rohwer et al. (2002) puis Rosenberg et al. (2007), permet de réconcilier la définition de l'individu avec l'unité biologique que représentent des organismes qui interagissent.

L'holobiotte, une unité évolutive composite

On peut alors subdiviser l'holobiotte, selon les besoins de précision, en désignant l'organisme le plus grand de l'interaction comme l'*hôte* et le ou les organismes plus petits comme des *symbiotes* vivant sur (*ectosymbiotes*) ou dans (*mésosymbiotes* et *endosymbiotes*) l'organisme *hôte* (Figure I.1-1). Dans l'exemple d'holobiotte précédant, humain-flore bactérienne, l'humain est l'*hôte* et la flore-bactérienne mais aussi, plus généralement, tous les microorganismes associés sont des *symbiotes*.

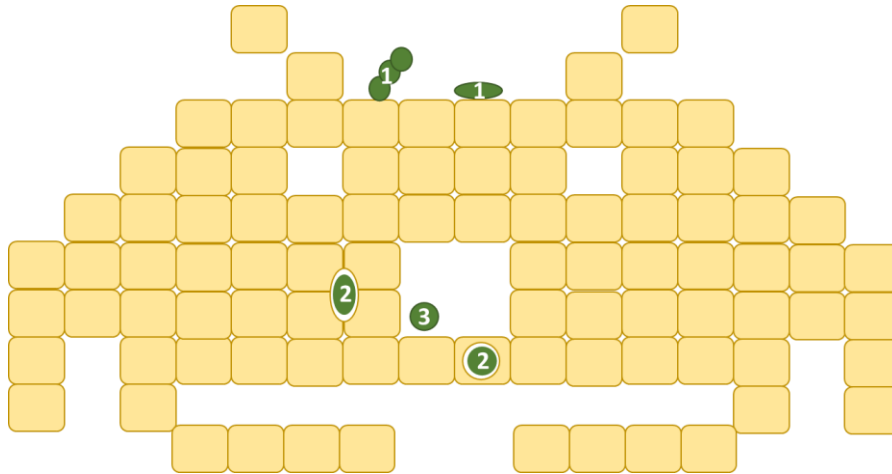


Figure I.1-1. Schéma d'un holobiotte.

La localisation possible des différents *symbiotes* (en vert) dans leur hôte (en jaune) est utilisée pour caractériser les *symbiotes* et par extension les interactions : (1) Les ectosymbiotes sont localisés à la surface de l'organisme hôte, par opposition aux endosymbiotes extracellulaires présents entre les cellules de l'hôte ou intracellulaires trouvés dans le cytoplasme des cellules de leur hôte (2), mais également des mésosymbiotes localisés dans des compartiments dédiés (3).

(Schéma librement inspiré de Duperron 2017).

I.1.1. Les interactions interspécifiques au sein d'un holobiotte

La plupart des organismes vivants sont donc des associations plus ou moins intimes d'organismes de différentes espèces : ce que Anton De Bary définit par le terme *symbiose* (σύν: ensemble et βίος: vie; 1879; traduit en anglais par Oulhen et al. 2016). En français le terme de *symbiose* a une connotation positive, et sous-entend que les différents partenaires tirent des bénéfices de leur association. Selon la définition originale, le terme symbiose (comme définie par les anglosaxons) peut englober toutes les interactions entre organismes de différentes espèces, du moment qu'elle se maintient dans le temps. En ce sens, la symbiose correspond à un continuum d'interactions se répartissant entre deux extrêmes : d'un côté les symbioses

L'holobiote, une unité évolutive composite antagonistes dans lesquels les différents partenaires ont des « intérêts » incompatibles (Dawkins & Krebs 1979), et de l'autre des symbioses non-antagonistes dans lesquelles les partenaires auraient des intérêts mutuels à vivre associés. L'ensemble des interactions entrant dans cette définition de la symbiose recouvre trois grandes catégories d'interactions, du parasitisme au mutualisme en passant par le commensalisme (Figure I.1-2), avec différents niveaux de coûts ou de bénéfices pour les partenaires en fonction d'où on se place dans ce continuum symbiotique.

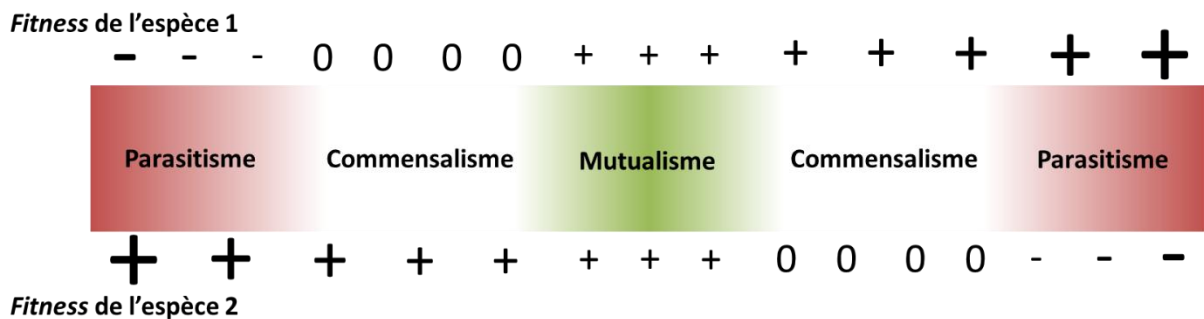


Figure I.1-2. Continuum des interactions inter-espèces en considérant les effets de l'association sur les fitness des deux partenaires
 En haut l'effet de l'espèce 1 sur la fitness de l'espèce 2, en bas effet de l'espèce 2 sur la fitness de l'espèce 1.
 (D'après Bronstein 1994)

La différence entre symbiose antagoniste et non-antagoniste se fait en évaluant l'effet des partenaires en association sur leur *fitness* ou *valeur sélective* (*i.e.* le nombre de descendants), parfois estimée par leur taux de survie ou leur taux de croissance. On peut rapporter comme symbiose antagoniste le cas du parasitisme, où le symbiote (ici on parlera de *parasite*) se développe au détriment de l'organisme hôte. Il y a dans ce cas un avantage clair pour le parasite qui va pouvoir se développer et un coût pour l'hôte qui sera affaibli et verra ses ressources ponctionnées par le parasite... Mais l'hôte peut aussi exploiter ses symbiotes. Chez les lichens, organisme résultant de la symbiose entre un champignon et une algue, Richardson (1999) envisage l'extrême contrôle par le champignon de l'accès à l'eau et aux nutriments de l'algue et donc de son développement et de sa prolifération, comme un esclavagisme des symbiotes

L'holobiotte, une unité évolutive composite

photosynthétiques par leur hôte. En plus de cela, une fois la symbiose établie, le symbiote photosynthétique, aussi appelé photobiotte, est piégé et son devenir dépendra de la survie du lichen, alors que le champignon est susceptible d'acquérir un nouveau photobiotte au cours d'un événement de reproduction sexuée (le développement du champignon se faisant à partir de spores dépourvus de symbiotes) (Hill 2009).

A l'autre extrême du continuum d'interactions interspécifiques, on trouve les symbioses non-antagonistes comprenant notamment les symbioses mutualistes. Dans ces interactions, les différents partenaires tirent profit de l'association et se développent donc mieux en vivant ensemble que séparément. Par cette définition, la symbiose mutualiste (ou simplement le mutualisme) correspond davantage à la définition francophone de la symbiose. Nous le verrons plus tard, les interactions mutualistes ne sont pourtant pas nécessairement avantageuses pour les différents partenaires dans l'absolu. Il s'agit plutôt d'un équilibre en faveur de l'association, en tenant compte des relations (avantageuses ou désavantageuses) entre les différents partenaires, dans un contexte donné (van Baalen & Jansen 2001).

1.1.1. Délimitation d'un individu symbiotique

Dans le cadre du mutualisme, il a été proposé une corrélation entre l'augmentation de la fitness et le niveau d'intégration du symbiote dans l'organisme hôte. Les symbiotes ne sont plus seulement en contact ou « posés » sur l'hôte, on les retrouve souvent dans des structures dédiées ou à l'intérieur même des cellules de l'hôte (symbiose intracellulaire ou endocytobiose), et plus la fitness de l'hôte s'en trouve améliorée plus les symbiotes sont intégrés dans l'organisme de l'hôte (Nardon & Grenier 1993). Associé au niveau d'intégration, il a aussi été proposé une corrélation avec le type de transmission des symbiotes : d'une acquisition horizontale à partir du milieu, plus fréquente chez des parasites, à une transmission verticale des parents aux descendants pour des symbiotes mutualistes. Une transmission verticale assure que tous les membres d'une population ou d'une espèce possèdent les symbiotes, alors que l'efficacité d'une

L'holobiotte, une unité évolutive composite transmission horizontale est dépendante de la densité d'hôte, moins il y aura d'individus plus la probabilité de transmission sera faible et *vice versa* (Nardon & Grenier 1993; Ebert 2013). A cette conception de la forte intégration des symbiotes dans un cas de mutualisme, on peut opposer des exemples de symbiotes mutualistes, comme la flore bactérienne présente à la surface de notre peau, qui ne sont pourtant pas « intégrés » à l'intérieur notre organisme. D'un autre côté, nous pouvons prendre comme exemple le cas de *Wolbachia*, un endoparasite intracellulaire de certains arthropodes comme les drosophiles, qui est en plus transmis majoritairement de façon verticale (Werren et al. 2008). Il n'en demeure pas moins que cette illustration du mutualisme met en évidence la difficulté (i) de proposer des définitions simples et (ii) de caractériser des relations symbiotiques et d'y différencier hôte, symbiotes et parasites.

Un moyen de remédier à cela est de considérer l'holobiotte comme un système dynamique où les symbiotes acquis de façon horizontale contribuent de façon transitoire au phénotype de l'individu symbiotique et donc à sa caractérisation. Pour tenter de poser la définition et la limite d'un holobiotte, Gilbert et al. (2012) concluent leur revue sur le fait de considérer 'le système immunitaire [...] comme un gendarme permettant de maintenir les cellules animales [disons plus généralement hôtes] et les cellules microbiennes ensemble' (Gilbert et al. 2012). Ils poursuivent en précisant que 'ceux qui obéissent au système immunitaire deviennent résidents de l'holobiotte' les autres étant alors pathogènes (si l'on considère les symbiotes). C'est donc l'ensemble du système symbiotique que l'on peut considérer comme un individu fonctionnel, la reconnaissance des parties de ce système entre elles se mettant nécessairement en place dans un processus de coévolution.

I.2. La symbiose comme moteur de l'évolution

I.2.1. De l'antagonisme au mutualisme

L'interaction fréquente entre différents organismes conduit généralement à une modulation des réponses de ces organismes, les uns en fonction des autres. Dans les cas de prédation, ou de parasitisme, seuls les proies ou les hôtes les plus rapides, les mieux camouflés, les plus résistants, survivent aux prédateurs/parasites. Cela octroie une « période de grâce » à l'espèce prédatée/parasitée (Dawkins & Krebs 1979). Dans ces nouvelles conditions, ce sont les prédateurs/parasites les plus efficaces qui sont en mesure de passer outre les défenses de leurs proies et qui prolifèrent. Cette sélection réciproque, un peu à la manière d'un ping-pong évolutif entre espèces, a été décrite comme une course à l'armement par Dawkins et Krebs (1979), peu après la généralisation de ce phénomène sous le nom d'hypothèse de la Reine Rouge (Van Valen 1973) qui énonce la nécessité de constamment courir (évoluer) dans un environnement changeant pour finalement rester sur place (survivre). On peut citer comme exemple, des bactéries cultivées en présence d'un bactériophage sur plusieurs générations. En congelant les deux partenaires séparément à chaque génération, il est alors possible de mettre en présence un bactériophage d'une génération G avec des bactéries de génération $G-1$ ou $G+1$, et la bactérie d'une génération G avec des bactériophages de génération $G-1$ ou $G+1$. Il a été ainsi possible de visualiser la course aux armements et son effet sur la proportion de bactéries résistantes au bactériophage de différentes « époques » : les bactéries résistant mieux face à un bactériophage rencontré à la génération précédente, qu'à un phage contemporain ou qu'à un phage « du futur » (Buckling et al. 2006).

Pourtant l'emballage de la course à l'armement n'est pas inéluctable et la distinction entre symbiose antagoniste et symbiose mutualiste est moins manichéenne qu'il n'y paraît. Est-il possible qu'une telle course s'arrête ? Est-il possible que les « intérêts » des différentes espèces ne s'excluent pas mutuellement (*i.e.* la survie de l'un au détriment du bon développement de

l'autre partenaire) mais au contraire soient partagés ? Comme en écologie, 'la première règle pourrait être : ça dépend' (Perlman 2007; Daskin & Alford 2012). Et ceci est envisageable si l'hôte et les symbiotes utilisent des ressources différentes (Bronstein 1994), et dans la mesure où l'accès aux ressources est facilité grâce à l'association des partenaires. On peut alors aboutir à des symbioses mutualistes, parfois définies comme des exploitations mutuelles. Il s'agit en fait souvent d'un mélange entre conflit et intérêts communs (van Baalen & Jansen 2001). Pour reprendre l'exemple de la bactérie et du phage, certains phages possèdent des gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent donc conférer également à l'hôte bactérien cette résistance (Stewart & Levin 1984). En fonction du contexte, ici la présence ou l'absence d'antibiotiques, la présence de phage sera avantageuse pour la bactérie ou au contraire fortement délétère.

I.2.2. Evolution d'un holobiotte

D'un point de vue évolutif, Lynn Margulis utilisait deux équations pour illustrer ce qu'elle considérait qu'une symbiose mutualiste implique pour l'holobiotte (cf. Duperron 2017) :

$$1 + 1 = 1 \quad \& \quad 1 + 1 > 2$$

I.2.2.1. « 1 + 1 = 1 »

Cette équation évoque l'idée que les différentes espèces impliquées dans une symbiose peuvent être considérées comme un tout, le système symbiotique, précédemment défini comme l'holobiotte. Si il manque des éléments, le système fonctionne moins efficacement ou cesse de fonctionner : chez les pucerons, la suppression de leur symbiote *Buchnera* ralentit la croissance des insectes et empêche leur reproduction (Baumann et al. 1995). De façon similaire, *Buchnera* est incapable de se développer en dehors de son hôte. D'un point de vue évolutif, l'équation renvoie également aux génomes présents dans l'holobiotte. Des parties de génomes de l'hôte et du symbiote peuvent fonctionner de concert et, dans le cas d'interactions répétées, peuvent même co-évoluer (Figure I.2-1). Le terme d'hologénome a ainsi été proposé pour désigner

L'holobioté, une unité évolutive composite

l'interaction génomique entre un génome hôte et plusieurs génomes symbiotiques (Rosenberg et al. 2007; Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008; Rosenberg & Zilber-Rosenberg 2011; Theis et al. 2016). Cela implique que pour caractériser génétiquement un holobioté, il faudrait avoir une approche métagénomique pour étudier tout ADN présent dans l'holobioté.

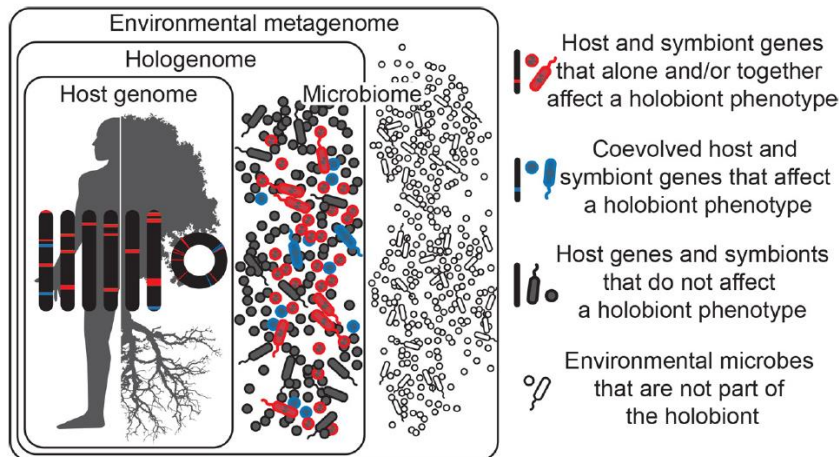


Figure I.2-1 : Illustration du concept d'hologénome

L'hologénome correspond à l'ensemble des génomes présents dans un holobioté. Seule une partie des gènes de l'hôte comme des symbiotes intervient dans le phénotype de l'holobioté (en rouge et bleu) et une proportion plus faible encore résulte d'une coévolution (en bleu) entre les différents partenaires associés.

(Theis et al. 2016)

Caractériser indépendamment chacun des acteurs d'une symbiose mutualiste peut, certes, sembler plus simple, mais ne permet que rarement d'appréhender le fonctionnement des holobiotés. Rohwer et al. (2002) dans le cadre de l'étude de coraux symbiotiques, insistent sur l'importance de ne pas seulement considérer le symbiote primaire, (ici un Dinoflagellé photosynthétique) mais également le cortège de micro-organismes associés, pour expliquer le fonctionnement d'une colonie corallienne (Figure I.2-2). On a donc « $1 + x = 1$ ».

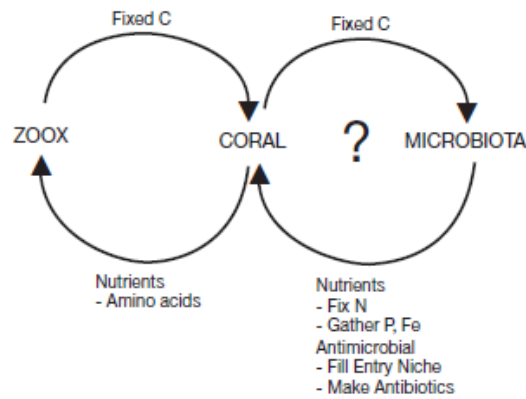


Figure I.2-2 : Schéma d'un holobiotte corallien comprenant l'hôte animal (coral), le symbiote photosynthétique (zoox) et le cortège de procaryotes (microbiota) ainsi que ce que les auteurs appellent 'unknown components that have yet to be studied' (Rohwer et al. 2002)

I.2.2.2. « 1 + 1 > 2 »

Cette deuxième équation met en avant les différences phénotypiques induites par la symbiose : des modifications morphologiques externes (changement de couleur), internes (développement de nouveaux organes ou de compartiments spécifiques), et même de nouvelles capacités métaboliques. L'apparition de ces capacités nouvelles, aussi appelées capacités émergentes, à l'échelle de l'holobiotte est à la base du concept de symbiogenèse (Merezchkowsky 1909).

Parmi les plus anciennes capacités acquises grâce à la symbiose, on trouve la respiration cellulaire (et la production d'énergie) et la photosynthèse. Deux unicellulaires piégés par leur hôte sont ainsi progressivement devenus des organelles et ont, par là même, contribué à la diversification du vivant (Figure I.2-3). Une protéobactérie, dont les déchets métaboliques auraient servi de nutriments aux organismes l'ayant acquise il y a 2 milliards d'années, est devenue la mitochondrie des Eucaryotes. Une cyanobactérie, permettant quant à elle à son hôte de réaliser la photosynthèse, est devenue un premier exemple de chloroplaste il y a 1 à 1,5 milliards d'années (Rand et al. 2004; Timmis et al. 2004; López-García et al. 2017).

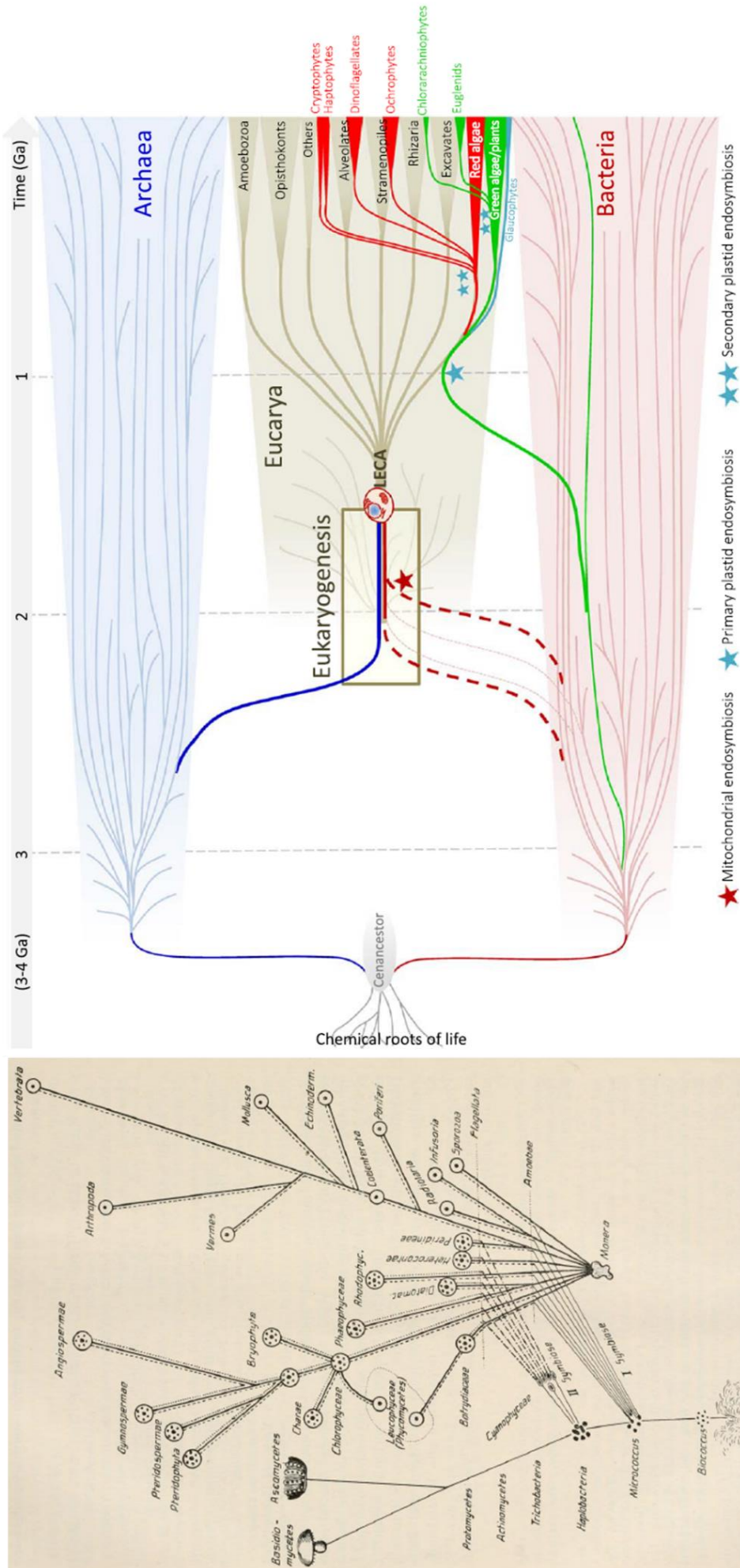


Figure 1.2-3. Intégration des symbioses dans l'évolution du vivant

A gauche, schéma tiré de Merezhkowsky 1909. Première proposition des symbioses pour expliquer l'émergence des différents règnes du vivant. La symbiose I correspond à l'acquisition de la mitochondrie (ancienne protéobactérie), la symbiose II à l'acquisition des plastes (ancienne cyanobactérie) dans les cellules des organismes hôtes.

A droite, schéma tiré de López-García et al. 2017. Datation de l'acquisition des symbiotes et de la diversification des symbiotes des règnes du vivant, avec l'établissement de symbioses mitochondriales (en rouge) ou chloroplastiques (en bleu)

La mise en place de symbioses mutualistes, et la symbiogenèse qui en résulte, implique une coadaptation des différents partenaires associés. Dans le cas d'endosymbioses, il est souvent observé une forte réduction du génome des symbiotes et des transferts de gènes vers le génome de l'hôte. Ces transferts de gènes permettent à l'holobiotte de continuer à fonctionner tout en facilitant le développement des symbiotes, qui n'ont alors qu'un petit génome à répliquer. Il permet également de centraliser une grande partie des gènes indispensables aux symbiotes dans le noyau de la cellule hôte. Ce « traquenard » évolutif piège les symbiotes dans une relation mutualiste devenue obligatoire (Rand et al. 2004). C'est ce qui est par exemple observé chez *Buchnera* qui vit en symbiose depuis environ 180 millions d'années (Moran et al. 2008) avec des pucerons et dont le génome fait entre 590 et 640kb (Moran & Bennett 2014) au contraire des 1Mb observé chez les bactéries les plus proches. En 2014, les génomes répertoriés de moins de 500kb appartenaient tous à des symbiotes obligatoires (Moran & Bennett 2014).

Dans le cas de symbioses mutualistes plus récentes, où il est encore possible de différencier les symbiotes de leur hôte, la nutrition semble être une des fonctions clef pour laquelle l'association a conféré à l'holobiotte une grande variété de capacités. Parmi elle, la digestion (de bois par exemple chez les insectes xylophages), la complémentation (en acides aminés fournis par des bactéries comme *Buchnera* aux insectes piqueurs se nourrissant de sève), l'assimilation de l'azote (particulièrement étudiée dans la symbiose *Rhizobium* et légumineuses) ou encore la capacité à devenir en partie autotrophe (capable de fixer et métaboliser du carbone inorganique).

Cette dernière capacité est retrouvée dans les symbioses dites chimiosynthétiques et photosynthétiques. Les premières impliquent des symbiotes capables par des réactions d'oxydoréduction de transformer des composés chimiques à base de soufre (comme le sulfure d'hydrogène) ou de carbone (comme le méthane) en source d'énergie pour produire des sucres. Cela a permis aux holobiottes, contenant ces symbiotes, tels que les Bathymodiales associées à des bactéries méthanotrophes et sulfo-oxydantes de coloniser les fond marins abyssaux (Duperron et al. 2016). Concernant les symbioses photosynthétiques, on peut noter le seul

L'holobionte, une unité évolutive composite

exemple connu de symbiose intracellulaire mutualiste chez un Vertébré, à savoir l'association entre un Chlorophyte et la salamandre *Ambystoma maculatum* (Kerney et al. 2011) : l'algue du genre *Oophila* est présente dans l'œuf, dans les tissus de l'embryon puis au stade adulte dans le tractus génital (supposant une transmission verticale de l'algue). La présence des algues assure aux embryons un apport en oxygène, un meilleur développement et une probabilité de survie plus élevée, en échange des déchets métaboliques de leur hôte. A l'inverse, il existe une multitude d'exemples de symbioses photo-autotrophes chez les Invertébrés (Figure I.2-4). De manière impressionnante, la diversité des holobiontes photosynthétiques se distingue non seulement en termes d'hôtes invertébrés possibles que de symbiotes photosynthétiques capables d'établir des symbioses.



Figure I.2-4. Diversité des symbiotes photosynthétiques trouvés dans les différents embranchements animaux

(Clavijo et al. 2018)

I.3. Un holobiole « devenu » autotrophe : la symbiose Cnidaire – Dinoflagellés

I.3.1. Les Cnidaire symbiotiques

Un exemple particulièrement répandu de l'émergence de nouvelles capacités dues à une relation mutualiste est l'acquisition de la photo-autotrophie chez certains Cnidaire, obtenue en s'associant durablement avec des symbiotes photosynthétiques.

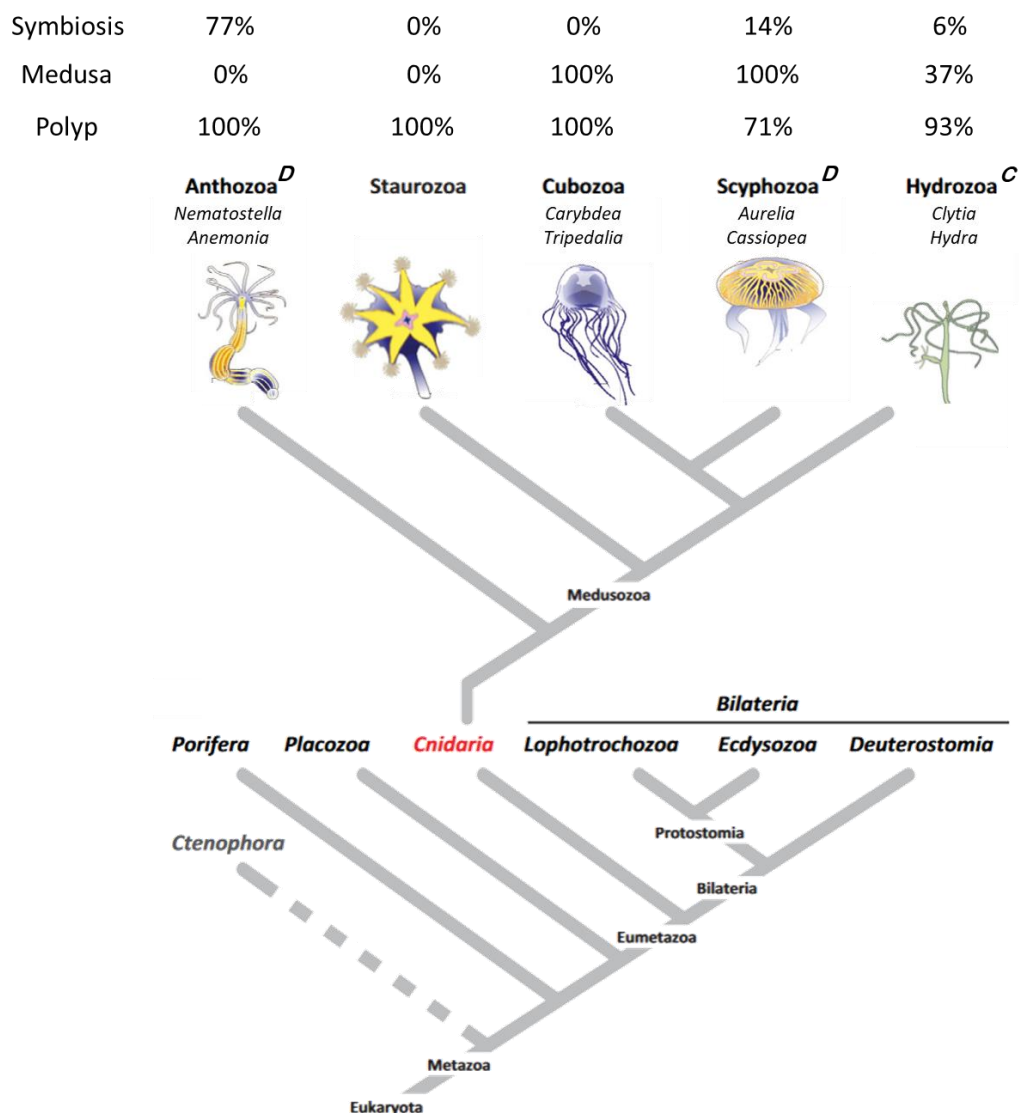


Figure I.3-1. Phylogénie des Cnidaire

Les pourcentages indiquent la proportion d'espèces de chaque classe trouvées en symbiose (Symbiosis) avec une phase méduse (Medusa) ou une phase polype (Polyp) sur 72 espèces de Cnidaire (Kayal et al. 2018).

Les lettres en exposant indiquent quels symbiotes photosynthétiques sont préférentiellement associés aux classes de Cnidaire : D – Dinoflagellés, C – Chlorophytes. (Modifiée d'après Bosch et al. 2017; et Technau and Schwaiger 2015; voir pour revue des symbiotes majoritaires Clavijo et al. 2018)

L'holobiole, une unité évolutive composite

Les Cnidaires regroupent des organismes diploblastiques aquatiques (marins ou dulcicoles) répartis en cinq grandes classes (Figure I.3-1). Les Anthozoaires, qui n'existent que sous la forme polype (Figure I.3-2), regroupent les anémones de mer, les coraux, les gorgones et les cérianthes. Les quatre autres classes alternent une phase polype et une phase méduse. On retrouve les Staurozoaires (organismes benthiques au stade adulte), les Cubozoaires et les Scyphozoaires (à phase méduse majoritaire) qui regroupent la plupart des organismes que l'on appelle couramment méduses (les Scyphozoaires sont également appelés « vraies méduses »). Mais aussi les Hydrozoaires (à phase polype majoritaire) dont les représentants sont appelés hydres et sont majoritairement dulcicoles.

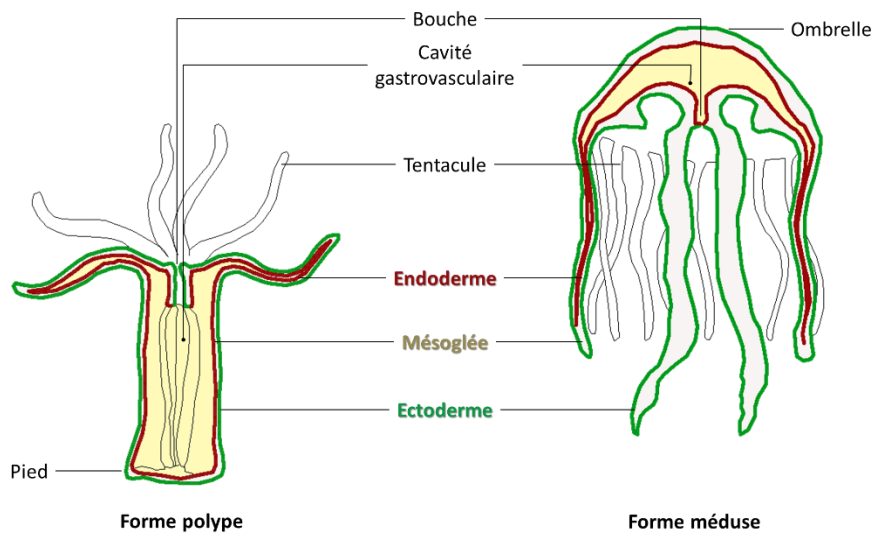


Figure I.3-2 : Plan d'organisation des deux morphologies/formes trouvées chez les Cnidaires
A gauche la forme polype fixée au substrat et donc benthique, à droite la forme méduse évoluant dans la colonne d'eau et donc pélagique planctonique.

Certains de ces organismes vivent associés à des endosymbiotes unicellulaires photosynthétiques intracellulaires comme les Chlorophytes du genre *Chlorella* et les Dinoflagellés de la famille des Symbiodiniacées (aussi appelés zooxanthelles, ζῷον : animal – identification erronée du type d'organisme et ξανθός : jaune/blond) (Figure I.3-1).

I.3.2. Les Symbiodiniacées symbiotiques

L'ancêtre commun des Symbiodiniacées avait été précédemment daté de la fin du Paléocène début de l'Eocène, il y environ 65 à 45 millions d'années (début du Paléogène) (Tchernov et al. 2004; Pochon et al. 2006). En utilisant un ensemble représentatif de la diversité des clades actuellement connus et une datation plus fine des nœuds internes à la phylogénie des Symbiodiniacées, une étude récente a réestimé à la hausse cette datation. En effet LaJeunesse et al. (2018) ont corrélé la radiation adaptative des Scléactiniaires (Anthozoaires, Hexacoralliaires) modernes (coraux constructeurs de récifs) avec les premières Symbiodiniacées vers la fin du Jurassique, il y a environ 165 millions d'années (LaJeunesse et al. 2018; Simpson et al. 2011). Ceci fait de la symbiose Cnidaires-Dinoflagellés une symbiose ancienne mais pourtant dynamique qui a permis aux coraux de coloniser et de se développer dans des zones pauvres en nutriments et de former les oasis marines de biodiversité que l'on connaît encore aujourd'hui.

Chez les Symbiodiniacées, il a été défini plusieurs groupes sur la base de marqueurs moléculaires ribosomiaux. Ces groupes ou clades étaient identifiés par des lettres de A à I. En 2018, LaJeunesse et al. ont redéfini le niveau taxonomique de ces clades, ils sont désormais considérés comme des genres différents et renommés en conséquence pour certains d'entre eux (Figure I.3-3, Clade A = *Symbiodinium*, B = *Breviolum*, C = *Cladocopium*, D = *Durusdinium*, E = *Effrenium*, F = *Fungacium* et G = *Gerakladium*) (LaJeunesse et al. 2018).

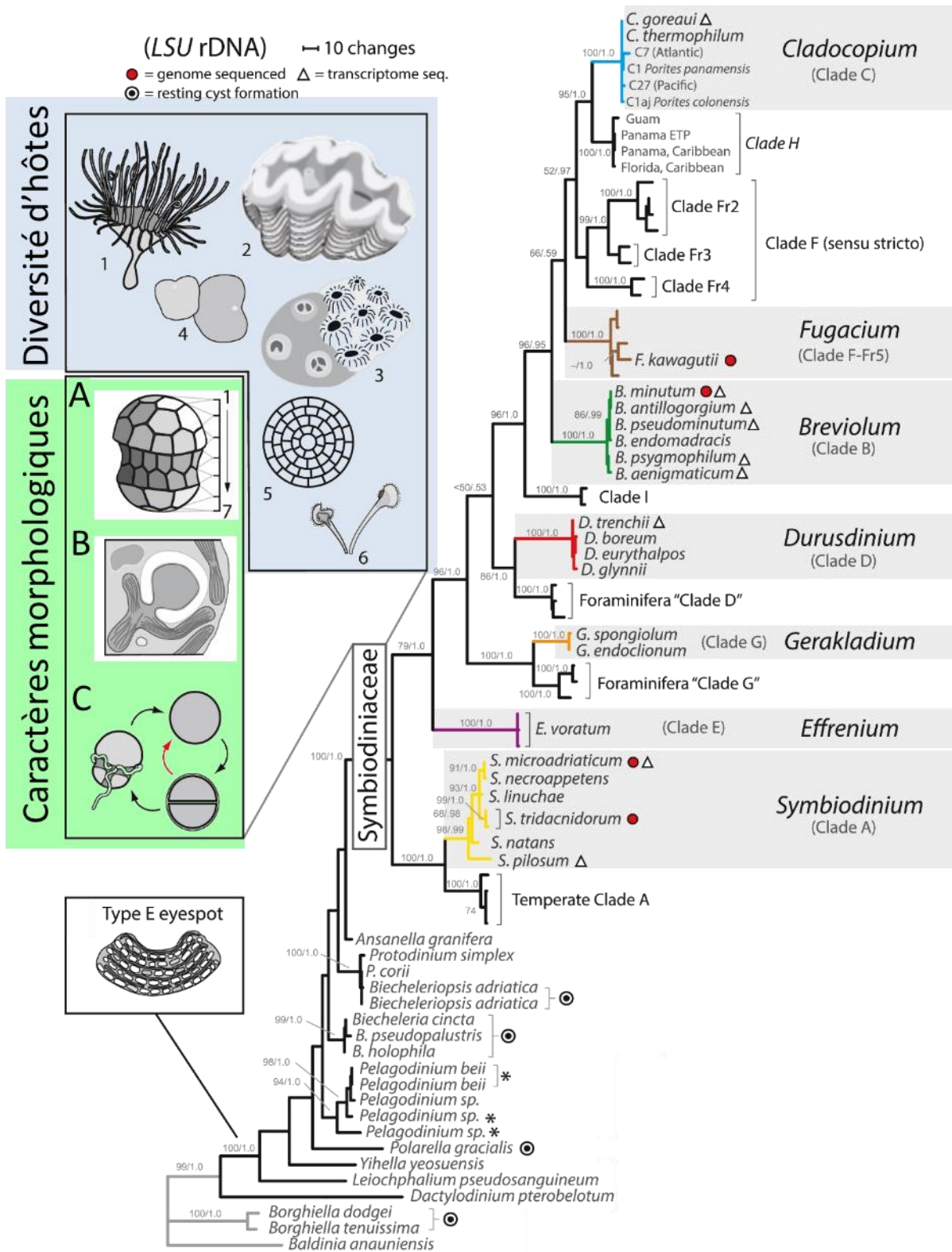


Figure I.3-3 : Phylogénie des Symbiodiniacées sur la base d'un marqueur nucléaire ribosomal (LSU)
 Diversité d'hôte : 1. Cnidaires, 2. Mollusques, 3. Spongiaires, 4. Plathelminthes, 5. Foraminifères, 6. Ciliés.
 Caractères morphologiques : A. sept séries latitudinales de vésicules, B. pyrénioïde unique entouré de dépôts d'amidon, matrice interne pour l'extensions des thylakoïdes, C. Cycle de vie majoritairement dominé par une forme coccoïde produisant par division des cellules coccoïdes filles *-in hospite-* ou des cellules mobiles.
 Le clade A tempéré (entouré en rouge) est le clade majoritaire trouvé en Méditerranée.

(modifiée d'après LaJeunesse et al., 2018; complétée à l'aide de Liu et al. 2018)

Chez les Cnidaires, les Symbiodiniacées symbiotiques sont localisées dans les cellules de l'endoderme, aussi nommé gastroderme (Figure I.3-4). Dans la classe des Anthozoaires, le nombre de symbiotes par cellule symbiotique de l'endoderme de l'hôte est généralement de l'ordre de un voire deux, certaines espèces pouvant arborer, plus exceptionnellement, jusqu'à huit symbiotes dans une seule et même cellule (Muscatine et al. 1998).

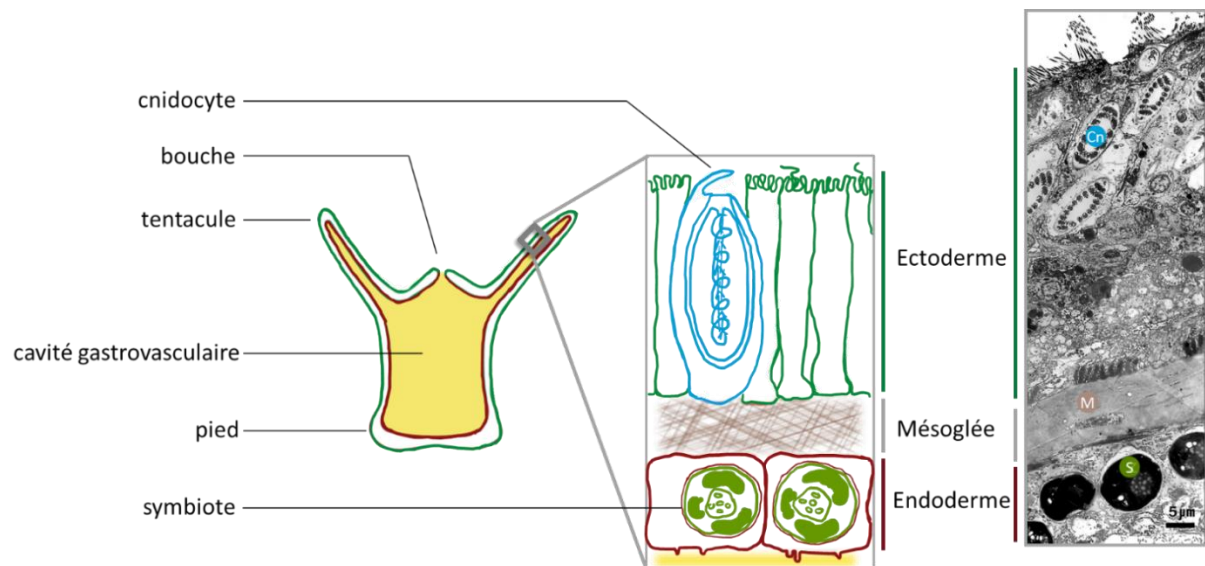


Figure I.3-4. Structure macroscopique et microscopique d'un polype symbiotique d'Anthozoaire.

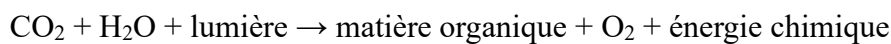
Les polypes des Cnidaires sont des organismes diploblastiques avec un feuillet faisant face un milieu extérieur (Ectoderme ou épiderme – en vert sur le schéma), un feuillet faisant face à la cavité gastrovasculaire (Endoderme ou gastroderme – en marron) séparés l'un de l'autre par la mésoglée (M). Cn : cnidocyte (cellule caractéristique des Cnidaires), S : Symbiodiniacée symbiotique.

(photo de microscopie tirée d'Allemand et al. 1998; schéma modifié d'après Furla 2006)

L'acquisition du symbiote chez les Cnidaires peut se faire par transmission maternelle mais également par acquisition horizontale au stade larvaire depuis le milieu. La taille du génome des Symbiodiniacées, particulièrement importante pour des endosymbiotes intracellulaires (de 1 à 5 Gb) (LaJeunesse et al. 2005; Aranda et al. 2016) reste relativement petite comparée à d'autres Dinoflagellés (dont la taille du génome est comprise entre 1,5 et 250 Gb, Hou & Lin 2009; Aranda et al. 2016). Il a été montré chez certains Cnidaires que les adultes étaient également capables de renouveler leur population de symbiotes (Baker 2001).

I.3.3. Fonctionnement et dynamique de l'holobiotte Anthozoaire-Symbiodiniacées

L'acquisition de Dinoflagellés photosynthétiques a permis aux Cnidaires, dont les Anthozoaires, de ne pas être limités par la disponibilité en carbone organique du milieu. Schématiquement, à partir de carbone inorganique et grâce à l'énergie lumineuse, les organismes photosynthétiques sont capables de produire de l'oxygène et la matière organique dont ils ont besoin :



(R. von Mayer 1864 dans Farineau & Morot-Gaudry 2006)

La photo-autotrophie chez les Cnidaires symbiotiques est donc basée sur des échanges trophiques. En plus du carbone inorganique et de la lumière, les Symbiodiniacées reçoivent de leur hôte des composés azotés (en partie issus des déchets métaboliques). La photosynthèse, en plus de la production d'O₂, permet la production de sucres, lipides et acides aminés qui sont transférés du symbiote à l'hôte (Figure I.3-5) (Davy et al. 2012; Loram et al. 2007; Suggett et al. 2017).

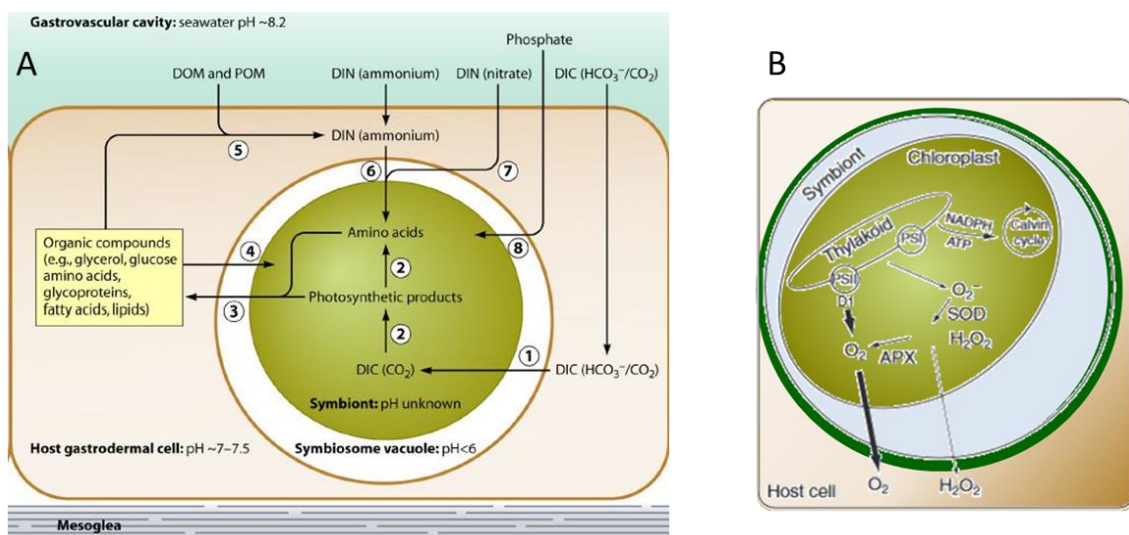


Figure I.3-5 : Production et transfert de la matière organique (A) et de l'O₂ (B) au niveau cellulaire par une Symbiodiniacée photosynthétique (symbiote) chez un Anthozoaire (hôte)
Assimilation de matière inorganique dissoute (carbone : DIC, azote : DIN et phosphate) et utilisation de la lumière pour produire de la matière organique (dissolved and particulated organic compounds, respectivement DOM et POM) et de l'oxygène.

(A. Davy et al. 2012; B. modifié d'après Weis 2008)

Sous certaines conditions environnementales (*i.e.* augmentation de l'intensité lumineuse ou de la température), la photosynthèse ne produit plus en majorité du dioxygène (Figure I.3-5.B) mais des espèces réactives de l'oxygène (comme l' H_2O_2) générant ainsi un stress oxydant (Weis 2008). Quand les défenses antioxydantes de l'hôte sont dépassées, il y a rupture de l'équilibre de la symbiose conduisant à une perte du symbiote et de la pigmentation du Cnidaire, phénomène appelé *blanchissement*. Les hôtes, alors de couleur pâle, sont dits « blanchis ». Cet état blanchi peut être transitoire si les conditions environnementales reviennent à la normale (Figure I.3-6). Le problème actuel du blanchissement massif des récifs coralliens vient de l'amplitude et de la fréquence des variations thermiques et lumineuses, qui sont trop élevées pour les capacités d'acclimatation de l'holobiotte corallien.

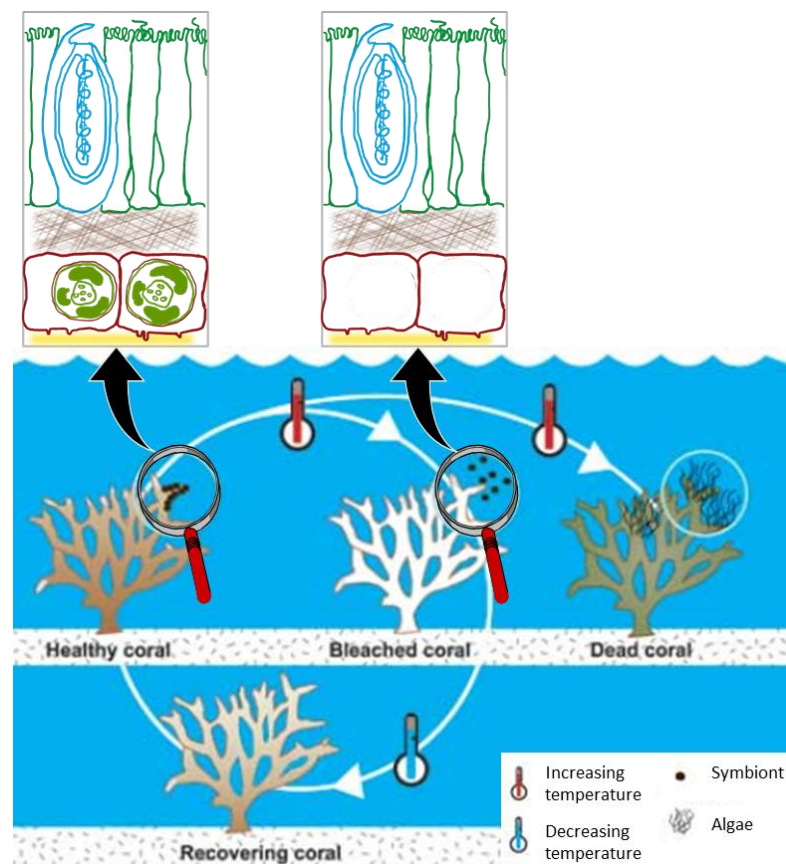


Figure I.3-6 : Etat symbiotique d'un corail confronté à des variations de température (modifiée d'après <https://coralwatch.org/web/guest/coral-bleaching>)

Lors du recouvrement des symbiotes post-blanchissement : il a été proposé que les Symbiodiniacées récupérées après un blanchissement soient plus adaptées aux nouvelles conditions environnementales. Le blanchissement comme moyen « d'améliorer » la population de symbiotes *in hospite* été appelé l'hypothèse du blanchissement adaptatif (HBA) (Buddemeier & Fautin 1993 dans Baker 2003). L'HBA est basée sur le fait que toutes les Symbiodiniacées n'ont pas la même sensibilité aux variations thermiques (Baker et al. 2018; Robison & Warner 2006; Suggett et al. 2008), lumineuses (Iglesias-Prieto & Trench 1994; Robison & Warner 2006), ou de pH (Brading et al. 2011), ce qui peut expliquer qu'on les trouve à des profondeurs différentes (Figure I.3-7). Ainsi, en changeant la composition de sa population de symbiotes, l'holobiote pourrait faire face à ces variations environnementales.

Certains Cnidaires sont en effet capables de vivre en symbiose avec des Symbiodiniacées de genres différents. Ces hôtes sont appelés *généralistes* et peuvent tirer profit d'un assemblage divers de symbiotes. La sélection *in hospite* d'un genre de Symbiodiniacées peut également permettre à un holobiote corallien généraliste de répondre rapidement aux variations du milieu. Il existe également des hôtes dont toute la gamme de symbiotes possibles se limite à un genre de Symbiodiniacées, ils sont alors considérés comme des hôtes *spécialistes*. Une telle association spécialisée pourrait alors limiter les capacités d'acclimatation et d'adaptation de l'holobiote. Cependant en 2012, Howells et al. ont révélé une diversité génétique fonctionnelle intra-spécifique au sein du clade C / genre *Cladocopium*. Des phénotypes distincts ont été observés entre deux populations de symbiotes, l'une provenant d'une zone géographique « froide » et l'autre d'une plus chaude. En inoculant des larves de coraux avec ces différentes populations de Symbiodiniacées, Howells et al. (2012) ont montré que la croissance des larves inoculées avec les symbiotes de zone géographique « froide » était meilleure dans les aquariums « froids » que dans les aquariums « chauds », et inversement pour les larves inoculées avec les symbiotes de zone « chaude ». Ces résultats montrent qu'au sein même d'une espèce de

Symbiodiniacées, la différenciation génétique des populations de symbiotes observée peut être adaptative et conférer un avantage sélectif à l'holobiole.

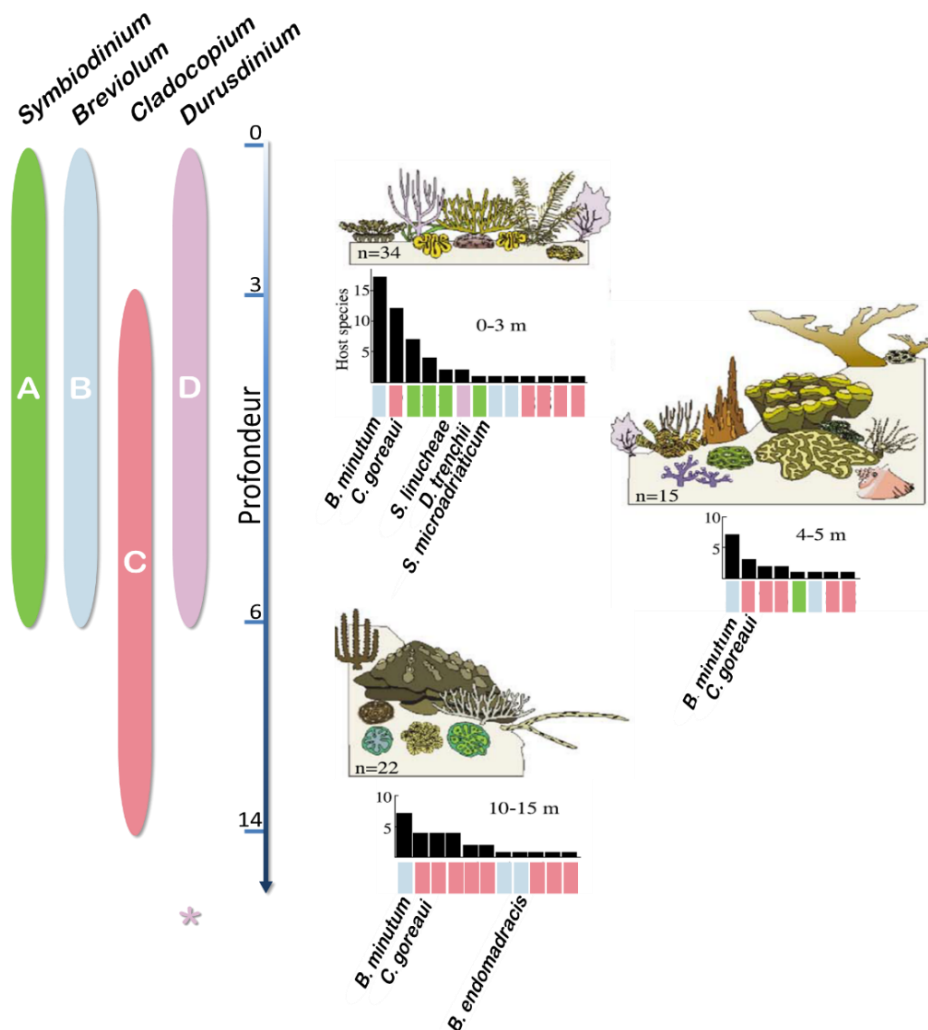


Figure I.3-7 : Distribution bathymétrique de quatre clades/genres de Symbiodiniacées
 A gauche, étendue de la distribution en profondeur estimée (en mètres) des clades/ genres : A/Symbiodinium, B/Breviolum, C/Cladocopium, D/Durusdinium. * le genre Durusdinium a également été trouvé à 35m de profondeur (d'après Baker 2003).
 A droite, distribution et densités des Symbiodiniacées échantillonnées dans différents hôtes à différentes profondeurs à Puerto Moreles, Mexico (figures modifiées de Lesser 2004; espèces identifiées d'après LaJeunesse et al. 2018).

Un hôte est donc un assemblage de symbiotes potentiellement génétiquement très différents. La caractérisation des différents partenaires pouvant être impliqués dans la symbiose et de leurs réponses aux variations environnementales est donc indispensable pour appréhender les capacités adaptatives des Cnidaires. Pour cela, les Cnidaires symbiotiques des régions tempérées semblent être particulièrement appropriés, car ils doivent faire face à des variations

L'holobioté, une unité évolutive composite

saisonnères environnementales de plus grande amplitude que les Cnidaires tropicaux. La part de la diversité génétique hôte ou symbiote dans le phénotype de l'holobioté, en partie explorée chez les Cnidaires tropicaux, est assez peu étudiée chez leurs cousins des régions tempérées. Pourtant cela permettrait d'éclaircir les liens entre différenciation phénotypique et divergence génétique à l'échelle de l'holobioté dans des environnements contrastés, et dans ce contexte mieux cerner la dynamique d'association entre hôte et symbiotes.

I.4. Une anémone de mer symbiotique : *Anemonia viridis*

I.4.1. Une figure emblématique des écosystèmes côtiers méditerranéens

Anemonia viridis (Forskål 1775), appelée ortie de mer ou anémone commune en français ou bien *snakelocks anemone* en anglais, est un Cnidaire de la classe des Anthozoaires de la sous-classe des Hexacoralliaires et de la Famille des Actiniaires (Figure I.4-1). On trouve également dans la littérature le nom d'*Anemonia sulcata* (Pennant 1777) qui est un synonyme *Anemonia viridis* (Forskål 1775). Les anémones de mer se distinguent principalement des autres Hexacoralliaires par l'absence de squelette calcaire.

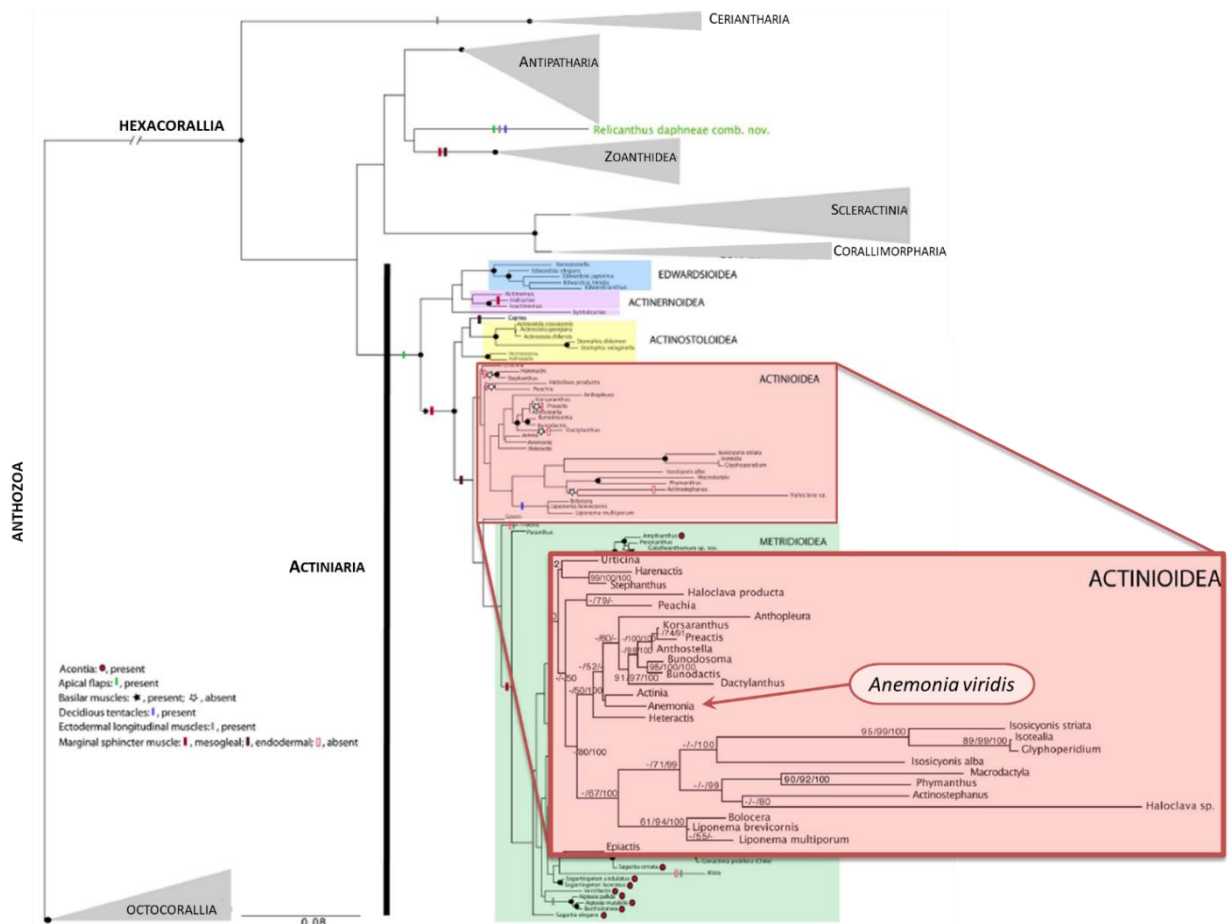


Figure I.4-1 : *Anemonia viridis* dans la famille des Actiniaires
 Arbre en maximum de vraisemblance obtenu à partir des séquences mitochondriales (12S, 16S, cox3) et ribosomales (18S, 28S).

(modifiée d'après Rodríguez et al. 2014)

A. viridis est souvent qualifiée de polype géant (en comparaison aux polypes des coraux), sa colonne gastrique (Figure I.3-4) pouvant mesurer jusqu'à une dizaine de centimètres de haut (Figure I.4-2). Chaque polype est un holobiotte indépendant pouvant se reproduire de façon asexuée ou *clonale* par fission longitudinale du pied ou de façon *sexuée* par fécondation externe : *A. viridis* est une espèce gonochorique et chaque polype émet dans le milieu ses gamètes (Shick 1991; Utrilla et al. 2019). La durée de vie des polypes est de plusieurs décennies, jusqu'à environ 70 ans (Chintiroglou & Koukouras 1992a; Shick 1991).



Figure I.4-2 : *Anemonia viridis*, dans son milieu naturel (à gauche) et en aquarium (à droite). Les deux anémones sont de taille similaire, la colonne de l'anémone de droite mesure une dizaine de centimètres de hauteur.

Bien que présente à la carte de certains restaurants méditerranéens, cette anémone a peu de prédateurs dans son milieu, les individus de relativement petite taille pouvant être la proie de Polychètes (*Hermodice carunculata*) ou de Nudibranches (*Spurilla neapolitana*) (Simonini et al. 2018; Schlesinger et al. 2009). *A. viridis* est un prédateur : bien qu'en symbiose avec un Dinoflagellé photosynthétique, elle complète son autotrophie par la prédation de Crustacés, de Mollusques et de Polychètes (Chintiroglou & Koukouras 1992b) voire de petits poissons. Enfin, *A. viridis* forme également des associations durables avec des crevettes et des crabes (Calado et al. 2007).

En Méditerranée, *A. viridis* est associée à de nombreuses espèces (Chintiroglou & Koukouras 1992a; Patzner 2004) ce qui en fait un élément important des écosystèmes marins côtiers (Tableau I.4-1).

Tableau I.4-1 : Liste des espèces trouvées associées à *Anemonia viridis* en Méditerranée. Ces espèces ont pu être trouvées dans l'anémone (Interne) ou à l'extérieur de celle-ci (Externe) ou encore portant ou transportant l'anémone (Porte). (Tableau modifié de Patzner 2004)

Taxons			Symbiose			
			Type	Interne	Externe	Porte
<i>Symbiodiniacée</i>	Dinoflagellé	Suessiale	Mutualisme	X		
<i>Posidonia oceanica</i>	Angiosperme		Commensalisme			X
<i>Zostera marina</i> <i>Zostera noltii</i>	Angiosperme		Commensalisme			X
<i>Foettingeria actiniarum</i>	Protozoaire	Cilié	Parasitisme	X		
<i>Cirsotrema cochlea</i>	Mollusque	Gastéropode	Parasitisme		X	
<i>Epitonium commune</i>	Mollusque	Gastéropode	Parasitisme		X	
<i>Gyroscaia lamellosa</i>	Mollusque	Gastéropode	Parasitisme		X	
<i>Opalia crenata</i>	Mollusque	Gastéropode	Parasitisme		X	
<i>Staurosoma parasiticum</i>	Crustacé	Copépode	Parasitisme	X		
<i>Dinopontia acuticaula</i>	Crustacé	Copépode	Parasitisme	X ?		
<i>Paranthessius anemoniae</i>	Crustacé	Copépode	Parasitisme		X	
<i>Lichomolgus actiniae</i>	Crustacé	Copépode	Parasitisme		X	
<i>Periclimenes aegylios</i> <i>Periclimenes amethysteus</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme/ Parasitisme		X	
<i>Scyllarus arctu</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme	X		
<i>Clibanarius erythropus</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme/ Mutualisme		X	X
<i>Eupagurus cuanensis</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme/ Mutualisme		X	
<i>Inachus phalangium</i> <i>Inachus dossettensis</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme		X	
<i>Maja crispata</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme		X	
<i>Acanthonys lunulatus</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme		X	
<i>Achaeus cranchi</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme		X	
<i>Pisa armata</i> <i>Pisa tetraodon</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme		X	
<i>Pilumnus hirtelus</i>	Crustacé	Décapode	Commensalisme		X	
<i>Leptomysis lingvura</i>	Crustacé	Mysidacé	Commensalisme		X	
<i>Caprella acanthifera</i>	Crustacé	Amphipode	Commensalisme		X	
<i>Phtisica marina</i>	Crustacé	Amphipode	Commensalisme		X	
<i>Ampithoe gammaroides</i>	Crustacé	Amphipode	Commensalisme	X		
<i>Holothuria tubulosa</i>	Echinoderme	Holothuroïde	Commensalisme		X	
<i>Chromis chromis</i>	poisson	Pomacentridé	Commensalisme		X	
<i>Gobius bucchichi</i>	poisson	Gobiidé	Commensalisme		X	
<i>Parablennius incognitus</i>	poisson	Blenniidé	Commensalisme		X	

A. viridis vit dans des zones tempérées. Présente sur tout le pourtour méditerranéen, on la trouve également le long des côtes atlantiques européennes et nord-africaines, de la côte sud de la Norvège jusqu'aux Açores (Figure I.4-3). Elle est également présente depuis la surface (dans des cuvettes de la zone intertidale) jusqu'à une trentaine de mètres de profondeur pour les plus gros spécimens. *A. viridis* est donc soumise à des conditions environnementales contrastées en terme (i) d'amplitude de variation bien supérieure à ce que peuvent supporter des Cnidaires tropicaux, que ce soit en température ($\Delta 15^{\circ}\text{C}$) en salinité ($\Delta 15\text{psu}$; Isnard et al. 2015) ou en

L'holobioté, une unité évolutive composite

terme de pH ($\Delta 1$; Johnson et al. 2013), et (ii) de fréquence de variations saisonnières mais également journalières. Comme elle est dépourvue de squelette calcaire et qu'elle peut supporter de faibles pH, elle est considérée par certains auteurs comme pouvant être le futur des écosystèmes marins dans le contexte du changement climatique global (Suggett et al. 2012).

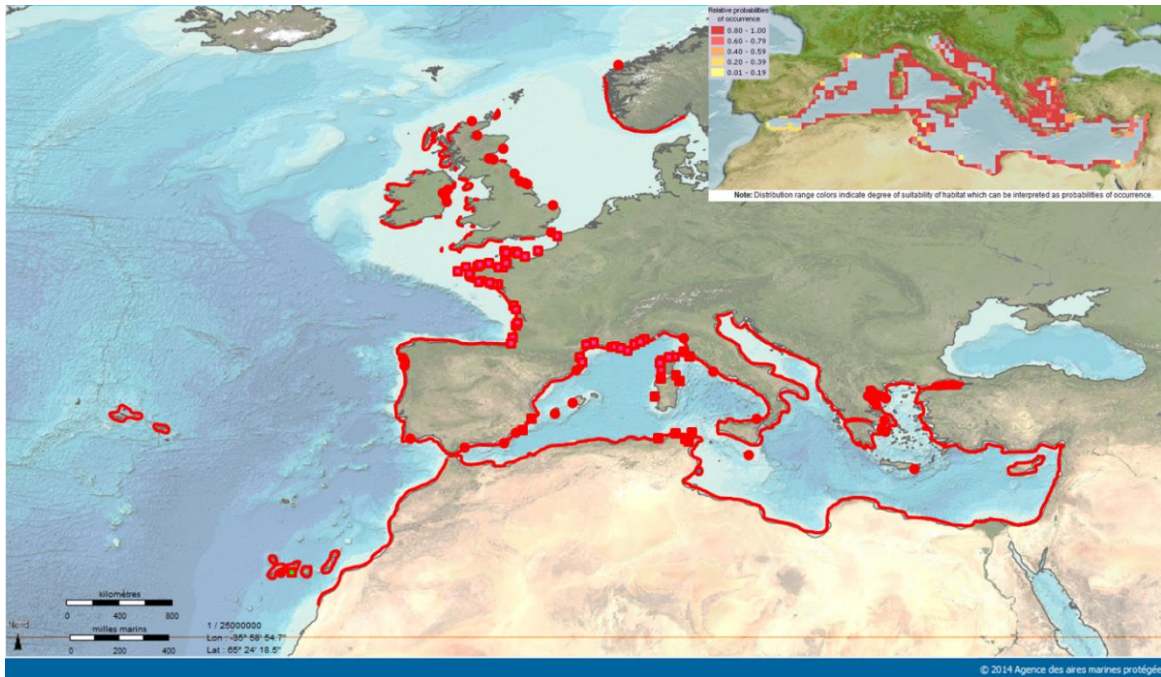


Figure I.4-3. Distribution géographique d'*Anemonia viridis* (carte principale) et probabilité d'habitats disponibles en Méditerranée (encart en haut à gauche). Voir les notes en bas de page pour les références¹

1.4.2. Des morphotypes ou des espèces cryptiques chez *A. viridis* ?

Il a été décrit chez *A. viridis* de nombreux *morphotypes* ou *morphes* tous symbiotiques (Andres 1882) caractérisés, à l'origine, par la couleur des tentacules et la présence ou l'absence d'un apex de couleur rose à leur extrémité (Andres 1884). Parmi ces morphes, certains comme les variétés *alabastrina* et *albida* se sont avérés être dus à une différence en densité de symbiotes dans les tissus de l'hôte, ce qui faisait paraître les tentacules des anémones plus clairs (Wiedenmann et al. 2000b).

¹ Bianchi et al. 2010; Casado-Amezúa et al. 2014; Centro di Educazione Ambientale "Casa Archilei" di Fano; Chintiroglou & Koukouras 1992a; Coppa et al. 2016; DORIS; GBIF; INPN; IOBIS; NBN; Pais et al. 2008; SeaLifeBase; Wiedenmann et al. 1999, 2000b; Fond de carte généré via Cartomer (Agence française pour la biodiversité); l'encart en haut à gauche est tiré de SeaLifeBase

Il est couramment admis aujourd'hui que l'espèce *Anemonia viridis* comprend cinq morphes (Figure I.4-4) caractérisés par la détermination croisée de la présence d'un apex rose et de profil de fluorescence (les photographies de la Figure I.4-2 correspondent à deux individus du morphe *smaragdina* – présence (i) d'apex rose et (ii) d'une fluorescence verte non visible sur les photographies). Concernant la présence d'une coloration rose à l'extrémité des tentacules de certains morphes d'*A. viridis*, il a été montré qu'elle était due à l'expression d'une protéine (FP595) similaire à une protéine fluorescente mais qui aurait perdu une grande part de sa capacité à émettre une fluorescence (Lukyanov et al. 2000). Les Anthozoaires sont connus pour leur expression de protéines fluorescentes (Gruber et al. 2008; Kao et al. 2007; Kenkel et al. 2011; Leutenegger et al. 2007; Schmidt-Roach et al. 2013) auxquelles on a attribué un rôle photoprotecteur chez les Anthozoaires symbiotiques (Salih et al. 2000). Ainsi, en plus de la protéine responsable de la coloration rose de l'apex des tentacules, *A. viridis* peut exprimer dans son ectoderme des protéines fluorescentes de type *GFP* ou *GFP-like* (pour *Green Fluorescent Proteins*). Les morphes d'*A. viridis* diffèrent pour leur profil d'expression de ces protéines fluorescentes : aucune fluorescence, une fluorescence verte ou une fluorescence verte et rouge orangé. Contrairement à la couleur des tentacules qui peut être nuancée par la densité de symbiotes, l'expression de ces protéines est moins ambiguë et permet une meilleure définition des morphes chez cette espèce (Wiedenmann et al. 1999, 2000a).

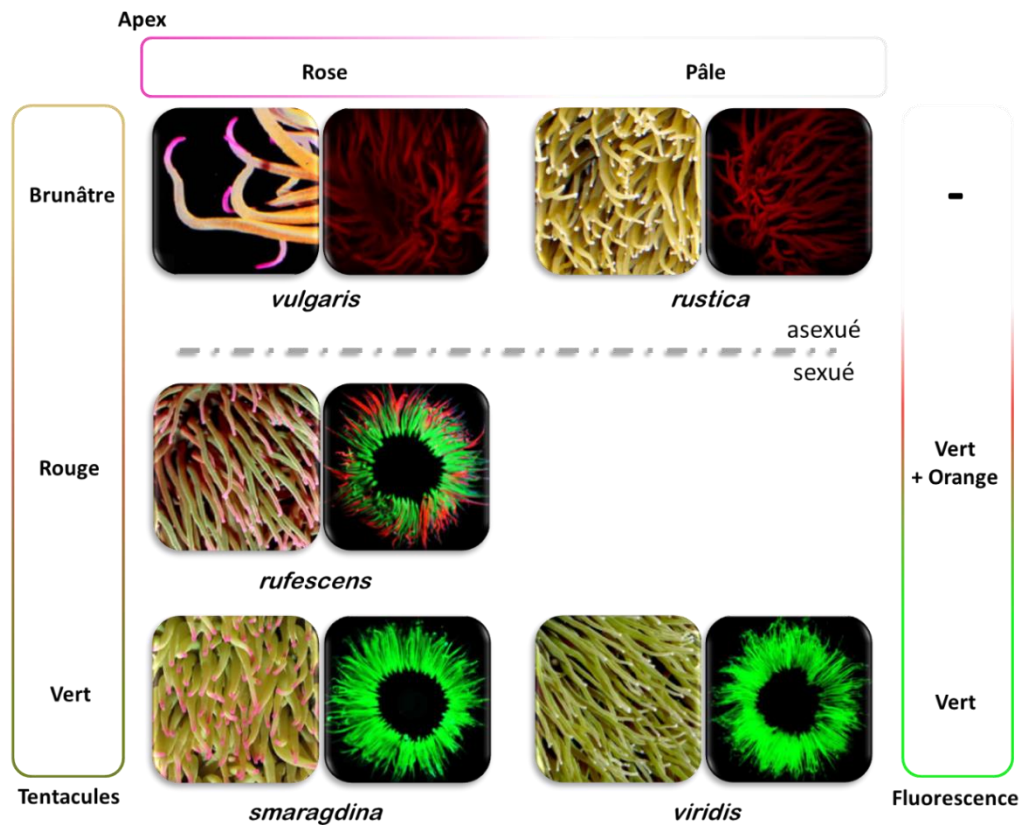


Figure I.4-4 : Les cinq morphes d'*A. viridis*

Les morphes sont nommés en italique sous les photographies (© Wiedenmann) et définis par la couleur des tentacules tel que proposé par Andres (1883, à gauche), la couleur de l'apex des tentacules (en haut) et le profil d'expression des protéines fluorescentes (à droite). Pour chaque paire de photographies, celle de gauche correspond à la couleur des tentacules à la lumière blanche, celle de droite aux tentacules exposés aux ultraviolets. Le mode de reproduction supposé prédominant pour chaque morphe est figuré par la ligne grise.

Bien que l'identification des morphes ne laisse pas d'ambiguïté, la nature taxonomique des morphes n'est pourtant pas si claire et fait débat notamment sur la base (i) de données génétiques issues de l'analyse d'iso-enzymes qui tendraient à montrer une différenciation génétique du morphe *rustica* (Bulnheim & Sauer 1984), (ii) d'un différentiel de distribution bathymétrique entre le morphe *rustica*, présent entre 1 m et 3 m de profondeur, et le morphe *smaragdina* plus près de la surface (Sauer et al. 1986), (iii) de leur comportement lors d'une rencontre d'un congénère (plutôt la fuite pour *rustica* et agressif pour *smaragdina* ; Williams 1991), et (iv) du mode de reproduction supposé prédominant dans les différents morphes (Figure I.4-4, sexué ou clonal) (Shick 1991; Chintiroglou & Koukouras 1992a; Wiedenmann et al. 1999). Associés aux modes de reproduction, il a été par ailleurs décrit deux écotypes, caractérisés pour l'écotype I par des anémones de petite taille avec un disque basal de 3cm de

L'holobiotte, une unité évolutive composite diamètre maximum et jusqu'à 192 tentacules, l'écotype II regroupant lui les anémones de plus grande taille (diamètre du disque basal jusqu'à 15cm) et comptant jusqu'à 384 tentacules. Les anémones de l'écotype I étant plutôt trouvées regroupées en tapis (les individus vivant extrêmement proches les uns des autres), cet écotype est supposé se reproduire de façon majoritairement clonale et est retrouvé chez les morphes *vulgaris*, *rustica*, et *smaragdina*. En revanche les plus gros individus d'*A. viridis* étant plutôt isolés et solitaires, l'écotype II est considéré comme se reproduisant de façon sexuée et est retrouvé chez les morphes *smaragdina*, voire *viridis* et *rufescens* qui ont souvent des morphologies intermédiaires entre les écotypes I et II (Schmidt 1972; Wiedenmann et al. 1999). L'accumulation des différences entre *smaragdina* et *rustica* (comportement d'agression ou de fuite, le mode de reproduction principal présumé et la différenciation génétique sur la base d'iso-enzymes) a conduit Bulnheim et Sauer (1984) à proposer *Anemonia rustica* comme une espèce distincte d'*Anemonia viridis*, ce qui a été modéré par la suite, en l'absence de données morphométriques clairement discriminantes (Chintiroglou & Karalis 2000). La nature des morphes d'*A. viridis* reste encore une question ouverte bien qu'étant un prérequis à la compréhension des capacités évolutives et adaptatives de cet holobiotte.

I.4.3. Les Symbiodiniacées d'*Anemonia viridis*

On trouve en Europe, et plus particulièrement en Méditerranée, un clade majoritaire de Symbiodiniacées, le Clade A Tempéré (*sensu* LaJeunesse et al. 2018; ou A' *sensu* Savage et al. 2002; et Visram et al. 2006) pour l'heure sans nom de genre (Figure I.3-3). Une autre Symbiodiniacée est présente en Méditerranée et appartient au genre *Breviolum* (précédemment identifié comme Clade B). Bien qu'abritant majoritairement un seul clade, les différents hôtes méditerranéens (Cnidaires: Visram et al. 2006; Ferrara et al. 2006; Forcioli et al. 2011; Casado-Amezúa et al. 2014; Grajales et al. 2016; mais aussi Foraminifères: Leutenegger 1977; ou Spongiaires: Hanna et al. 2005; Ferrara et al. 2006) ont à leur disposition une diversité génétique

L'holobiole, une unité évolutive composite

intraclade partiellement révélée à ce jour, à l'aide des marqueurs ribosomaux (Figure I.4-5) (Casado-Amezúa et al. 2014; Forcioli et al. 2011) et chloroplastiques (Casado-Amezúa et al. 2014).

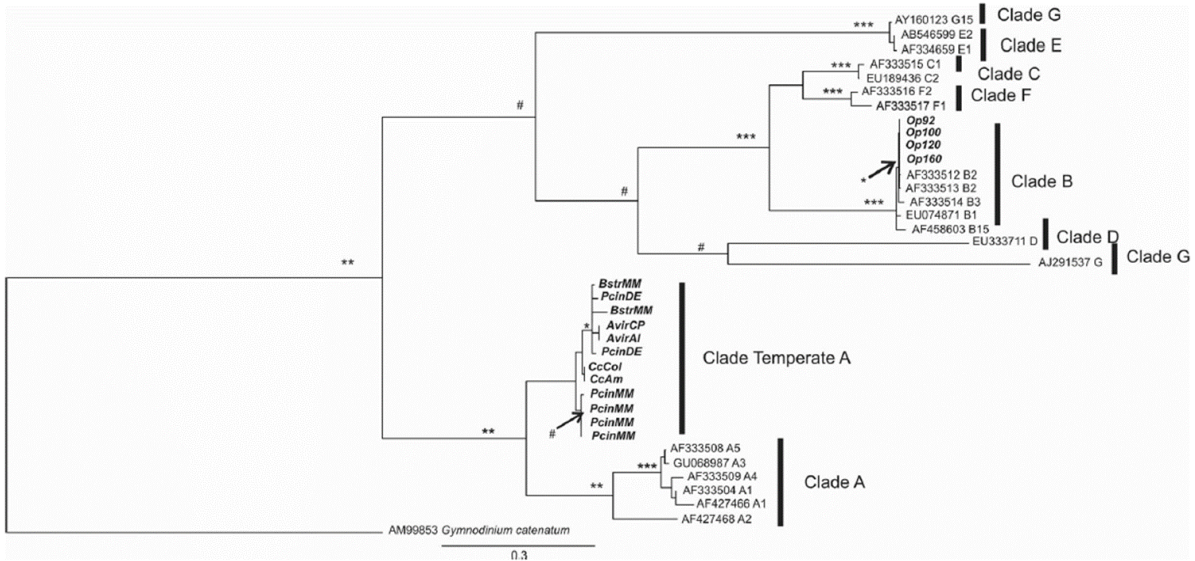


Figure I.4-5 : Arbre phylogénétique des Symbiodiniacées basé sur les séquences ITS
Les codes en gras indiquent les séquences provenant de Cnidaires méditerranéens : *Oculina patagonica* (Op), *Bunodeopsis strumosa* (Bstr), *Paranemonia cinireae* (Pcin), *Anemonia viridis* (Avir), *Cladocora caespitosa* (Cc) (Casado-Amezúa et al. 2014)

Chez *A. viridis*, les Symbiodiniacées sont acquises de façon verticale, les symbiotes étant présents dans l'œuf (Schäfer 1984; Utrilla et al. 2019) et sont donc transmises aux descendants par la mère. Le temps de doublement de la population de symbiote *in hospite* a été mesuré à 23,5 jours (Stambler & Dubinsky 1987; dans Shick 1991) ce qui laisse penser à un certain contrôle de la population symbiotique, qui par ailleurs à un temps de doublement, mesuré par l'équipe, de 3,45 jours une fois en culture *in vitro*. Le rôle trophique de ces symbiotes photosynthétiques est particulièrement important chez *A. viridis* qui reçoit près de 90% des photosynthétats (Davy et al. 1996). Cette association joue un rôle important également dans les capacités d'acclimatation de l'holobiole : les symbiotes semblent permettre une acclimatation rapide à un changement de pH (Ventura et al. 2016), être relativement résistants à un stress d'exposition aux UV mais sensibles à un stress température prolongé (Moya et al. 2012), et servir d'élément détoxifiant en cas de pollution aux métaux lourds en accumulant le cuivre ou le cadmium, par exemple, leur expulsion permettant d'éliminer ces métaux des tissus de

l'anémone (Harland et al. 1990; Harland & Nganro 1990).

Il existe une certaine diversité génétique chez les symbiotes d'*A. viridis* qui pourtant paraît réduite en comparaison d'autres Cnidaires symbiotiques de Méditerranée (Casado-Amezúa et al. 2014; Forcioli et al. 2011), mais cela peut aussi être dû au faible nombre d'individus étudiés. De plus, aucune étude n'a exploré les liens entre la diversité génétique des populations de symbiotes ni de l'holobiotte et les capacités de réponse chez *A. viridis*, ou encore l'influence des symbiotes dans sa répartition écologique ou leur spécificité d'association à l'un ou l'autre des morphes.

I.5. Objectifs de la thèse

Anemonia viridis est un holobiotte dont le symbiote majeur est une Symbiodiniacée. Cette anémone présente une diversité de couleurs et peut vivre dans une large diversité d'habitats sans que l'on connaisse encore clairement la diversité génétique hôte et symbiotique derrière ces propriétés. **L'étude des diversités hôte et symbiotique et de leur dynamique permettrait de mieux comprendre leur influence sur le phénotype de l'holobiotte, ses capacités adaptatives et son histoire évolutive.**

Je me suis donc attelée dans un premier temps à la résolution du statut taxonomique des morphes d'*A. viridis* grâce à l'analyse de la diversité génétique de gènes ciblés mais aussi de loci issus de séquençage RAD (pour *Restriction site Associated DNA*). Parallèlement, je me suis intéressée à l'association *A. viridis* – Symbiodiniacées **et l'influence éventuelle des symbiotes sur le phénotype de l'hôte, en mesurant la corrélation entre la diversité génétique symbiotique et la différenciation morphologique et génétique de l'hôte.** Enfin, j'ai étudié la dynamique d'association entre hôte et symbiotes, afin d'**établir si *A. viridis* était capable d'acquérir horizontalement des symbiotes en plus de l'héritage symbiotique maternel.**

**Diversité morphologique : de la plasticité morphologique
à la divergence interspécifique**

II. Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

II.1. Origine des variations morphologiques

Le moyen le plus simple d'identifier une espèce est basé sur sa description morphologique. Bien que pour des espèces ayant divergé depuis suffisamment de temps la différenciation morphologique soit un indicateur efficace d'une ancienne spéciation (l'hippopotame et la baleine sont des espèces différentes d'Artiodactyles), de nombreux facteurs peuvent influencer la morphologie des organismes (forme, couleur ...) sans que cela soit nécessairement un signal de spéciation (Wicksten 1989).

L'environnement peut être un facteur particulièrement contraignant pour le développement des organismes et donc influencer leur morphologie, comme de forts vents ou un fort hydrodynamisme. Auquel cas, un même génotype peut avoir différents phénotypes en fonction de l'environnement dans lequel l'individu se trouve, ce que l'on appelle la plasticité phénotypique. D'un autre côté, l'environnement peut aussi sélectionner certains phénotypes. Le développement dans un même milieu conduit alors à des modifications morphologiques similaires, même entre des espèces relativement éloignées (la morphologie générale des Mammifères marins et celle des requins, ou les pattes palmées d'animaux aquatiques...), mais seulement adaptées au même environnement (*i.e.* convergence évolutive). Ces convergences pourraient alors amener à regrouper des organismes dans un même taxon sans qu'ils aient pour autant une histoire évolutive récente commune.

A l'inverse, dans le cas d'une grande variabilité phénotypique (ou polymorphisme), on peut être amené à différencier des organismes alors qu'ils appartiennent à la même espèce. Or, le phénotype peut changer au cours du développement et être caractéristique de différentes classes

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

d'âge ou de dimorphisme sexuel, et parfois des deux, comme chez certaines espèces de poissons chez lesquelles les femelles et les jeunes mâles peuvent avoir des livrées similaires mais distinctes des mâles adultes (Fruciano et al. 2011). On a donc une diversité phénotypique intraspécifique.

Au niveau génétique, le polymorphisme peut être codé par différents allèles (*i.e.* polymorphisme allélique). Un des cas d'école est celui de la phalène du bouleau (*Biston betularia*, Lepidoptera) présentant deux phénotypes distincts : un phénotype clair majoritaire dans les campagnes et un noir dit *mélanisé* plus rare, car plus facilement identifiable sur l'écorce des bouleaux par les prédateurs. Avec l'industrialisation et la pollution au charbon, le phénotype mélanisé est devenu majoritaire dans des zones plus industrialisées où les bouleaux avaient une écorce plus sombre. Cette distribution différentielle de ces phénotypes est due à une pression de sélection différente entre les deux milieux (les phalènes plus sombres sont moins visibles des prédateurs en milieu industrialisé que les phalènes plus claires et inversement) (Kettlewell 1955; Creed et al. 1980). Dans cet exemple, la différenciation phénotypique n'empêche pas pour autant les croisements entre ces deux phénotypes appartenant à une seule et même espèce.

A l'autre extrême, des organismes sans critère morphologique distinctif pertinent peuvent être des représentants d'espèces différentes, c'est ce que l'on appelle des espèces *cryptiques* (Bickford et al. 2007). Ce qui permet de les identifier est alors la différenciation des pools géniques (*i.e.* les différences alléliques entre populations ou entre espèces), voire l'occupation de niches écologiques différentes. En Méditerranée par exemple, il a été mis en évidence que les populations de loups, *Dicentrarchus labrax*, du bassin Ouest et du bassin Est ne partageaient pas le même pool génique (Bahri-Sfar et al. 2000).

Si l'on considère maintenant tout organisme comme un système symbiotique (holobioté), il est alors indispensable de prendre en compte également la population de symbiotes présente pour comprendre le phénotype de l'holobioté. En effet l'association avec certains symbiotes peut

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique également modifier le phénotype des individus hôte. Cela a ainsi déjà pu être observé chez le puceron qui présente, en fonction des lignées de symbiotes qu'il abrite, une couleur variable passant du vert au marron, ce qui peut augmenter ou diminuer la facilité avec laquelle les prédateurs détectent le puceron (Tsuchida et al. 2010).

II.2. Identification de pools génétiques et délimitation d'espèces

L'utilisation de critères morphologiques seuls ne garantit donc pas une identification efficace et pertinente des espèces. Dans l'absolu, aucun marqueur unique ne garantit la délimitation d'un groupe d'organismes interféconds qui évolueraient indépendamment d'autres organismes. Et c'est bien là la problématique de l'identification et de la délimitation des espèces qui est un préalable à la compréhension de l'évolution de ces espèces. En revanche, une combinaison d'un maximum de caractères (morphologiques, génétiques, comportementaux, écologiques) est la méthode la plus efficace pour identifier et délimiter de possibles espèces (De Queiroz 2007; Pante et al. 2015b), c'est ce que l'on nomme la taxonomie intégrative. Plus des espèces auront divergé depuis longtemps, plus cette divergence sera visible (Figure II.2-1). Dans les cas extrêmes d'espèces qui ont divergé depuis longtemps, cette divergence pourra être observable quel que soit le marqueur utilisé. Pour reprendre l'exemple de l'hippopotame et la baleine, ils partagent un ancêtre commun mais le temps de divergence entre ces deux taxons est tel qu'il est aisé d'identifier les deux organismes et de les attribuer à des espèces différentes. Le problème se pose quand des espèces sont relativement récentes ou quand la spéciation est en train d'avoir lieu : le signal de différenciation porté par les quelques marqueurs directement impliqués dans l'isolement des deux fonds génétiques serait potentiellement noyé à l'échelle du génome, rendant difficile la délimitation de ces fonds génétiques. Cette période de « transition évolutive » entre une espèce ancestrale et deux espèces clairement différenciées est appelée la *zone grise de spéciation* (De Queiroz 2007) (Figure II.2-1).

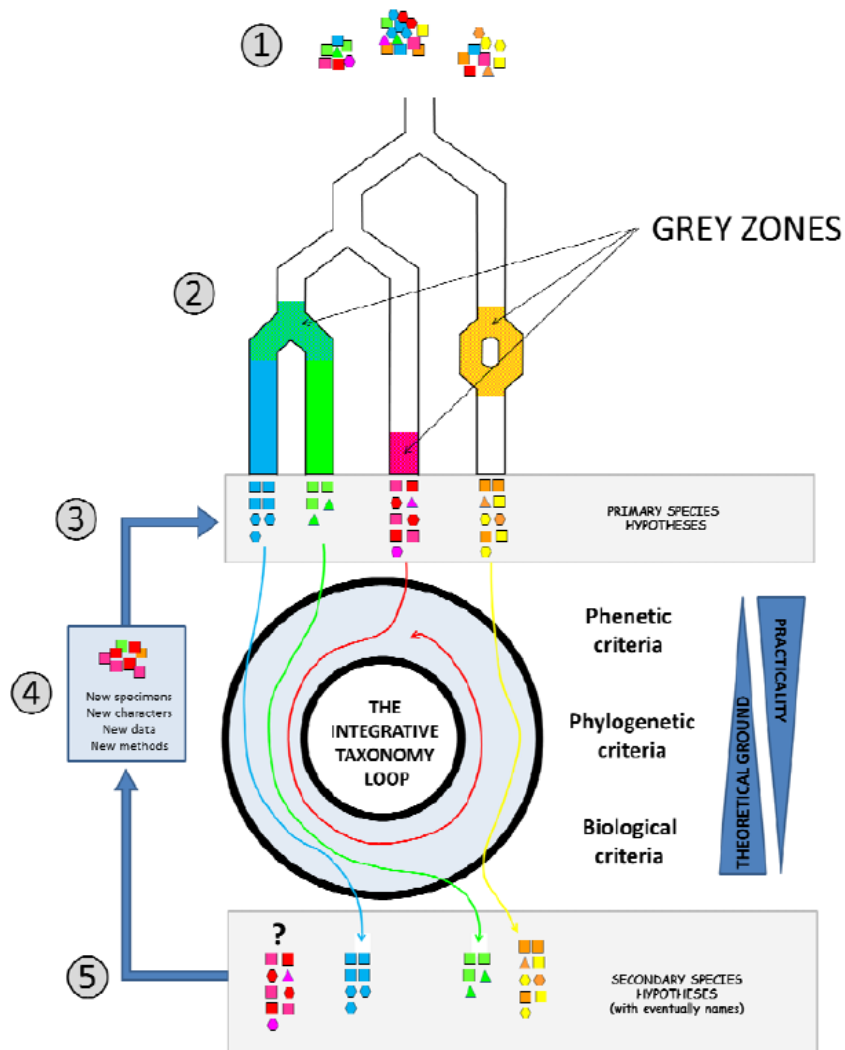


Figure II.2-1 : Les différentes étapes de la taxonomie intégrative.

(1) Echantillonnage en populations, ces échantillons peuvent correspondre à des espèces à différents étapes du processus de spéciation (2). Formulation d'hypothèses primaires d'espèces sur la base d'un caractère (3). Evaluation de ces hypothèses primaires (augmentation du nombre de caractères/échantillons, amélioration des techniques...)(4). Génération de nouvelles hypothèses d'espèces (hypothèses secondaires d'espèces) (5)

(Pante et al. 2015)

Les espèces qui sont dans cette zone grise peuvent se trouver à différentes étapes du continuum de spéciation, *i.e.* à différents jalons entre l'espèce ancestrale et les futures espèces. Elles peuvent peut-être déjà avoir des morphologies différentes mais avoir encore des allèles en commun, soit par le partage d'un polymorphisme ancestral, soit par l'existence de flux de gènes entre pools géniques. Il est possible d'estimer la part d'un pool génique « envahi » par un autre en mesurant la proportion de génome d'individus hybrides issus de ces deux pools géniques. On peut donc détecter une *introgression* d'un pool génique par un autre. Plus l'*introgression* est

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique récente, plus équilibrées seront les proportions de deux fonds génétiques chez l'hybride (50%-50% pour un hybride de première génération). L'existence d'un flux de gène, même faible, entre fonds génétiques peut rendre difficile la délimitation d'espèces qui ne sont donc pas tout à fait des pools génétiques indépendants. On peut alors parler de *complexe d'espèces*. En Europe, il a été par exemple mis en évidence des introgressions asymétriques plus ou moins récentes entre trois espèces de moules du genre *Mytilus* considéré aujourd'hui un complexe d'espèces (Fraïsse et al. 2016).

II.3. De la variation morphologique à la différenciation génétique chez les Cnidaires

Les Cnidaires sont connus pour leur diversité de formes et de couleurs. Ces critères ont servi historiquement à identifier les espèces. Pourtant, les variations morphologiques chez les Cnidaires ne sont pas symptomatiques d'une spéciation mais peuvent être une réponse à différentes conditions de lumière (Gattuso 1987), de courant (Todd 2008), ou de pH (Tambutté et al. 2015) qui modifient la morphologie comme l'aspect du squelette. Une étude a montré par la transplantation de coraux *Porites lobata* que les caractéristiques du squelette des colonies (en terme de masse et de développement en hauteur et latéral) pouvaient s'expliquer, du moins en partie, par une plasticité phénotypique chez l'adulte (Smith et al. 2007). En revanche, dans d'autres cas, les variations morphologiques restent sans explication. Chez la méduse *Cassiopea andromeda*, par exemple, il a été identifié six morphes chez cette espèce, caractérisés par différentes couleurs (Figure II.3-1.A) trouvés dans différents habitats et semblant partager la même diversité symbiotique (Lampert et al. 2012). Enfin, l'utilisation de marqueurs moléculaires a permis de mettre en évidence au sein de la même espèce *Stylophora madagascarensis* plusieurs structures de squelettes (Figure II.3-1.B) (Flot et al. 2011).

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

A contrario, toujours grâce au développement d'approches génétiques, nombre d'espèces de Cnidaire, décrites comme monomorphes, représentent en réalité un complexe d'espèces cryptiques. Chez l'espèce *Actinia fragacea* (Figure II.3-1.C), ont été identifiés deux réseaux d'haplotypes ribosomaux distincts suggérant l'existence de deux fonds génétiques différents partageant les mêmes critères morphologiques (Pereira et al. 2014).

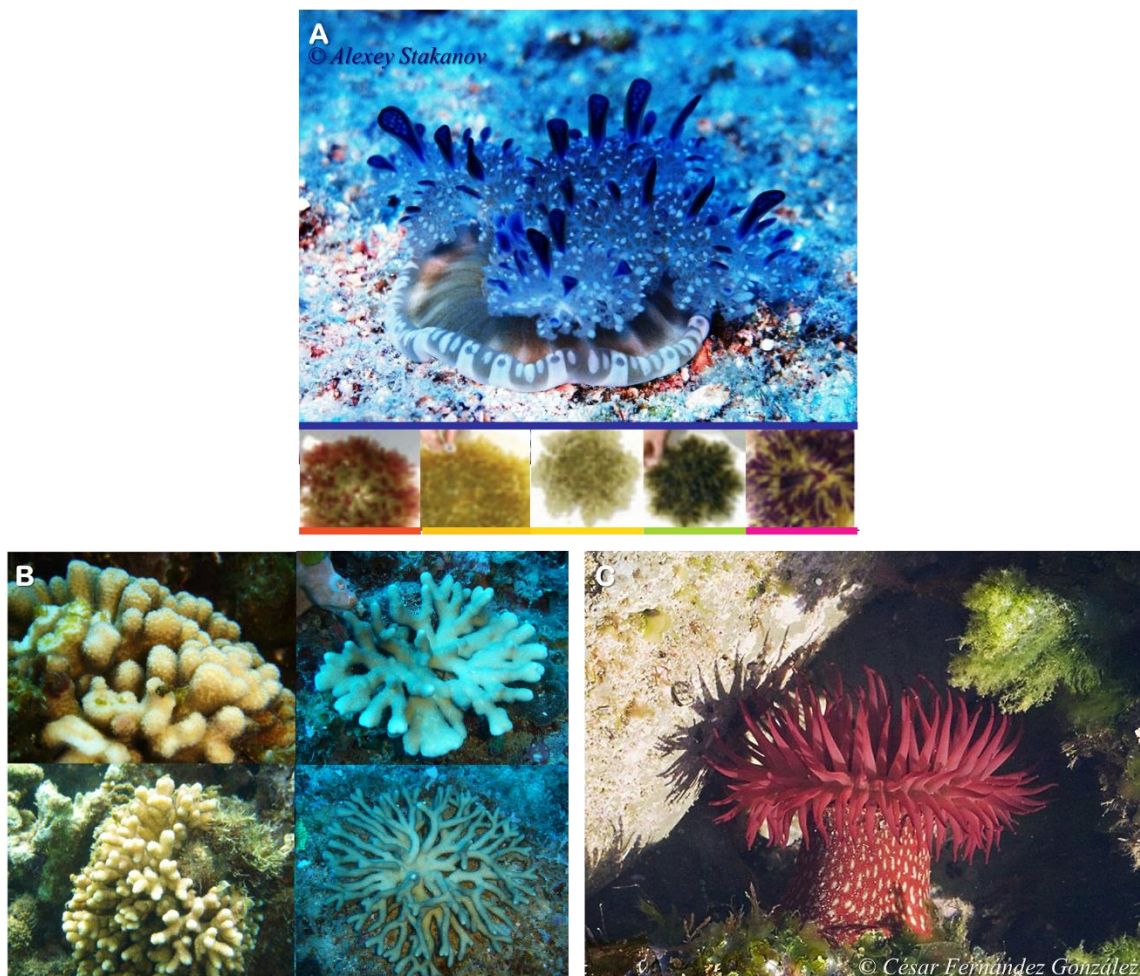


Figure II.3-1 : Diversité morphologique et différenciation génétique chez *Cassiopea andromeda* (A) *Stylophora madagascarensis* (B) et *Actinia fragacea* (C).

A. Six morphes (bleu, rouge, marron, blanc, vert et violet) dont l'origine est encore inconnue (Lampert et al. 2012)

B. Diversité de morphologie intraspécifique du squelette calcaire (Flot et al. 2011)

C. Exemple d'anémone dans laquelle deux haplotypes distincts ont été identifiés (Pereira et al. 2014)

De manière générale chez les Cnidaires, les données morphologiques ne sont donc pas représentatives de lignées génétiques et ne sont donc pas de bons marqueurs de spéciation (Tableau II.3-1), aussi bien chez les coraux (Flot et al. 2011; Schmidt-Roach et al. 2013; Veron

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique & Pichon 1976) que chez les anémones de mer (Douek et al. 2002; González-Muñoz et al. 2015; Pereira et al. 2014; Rodríguez et al. 2014; Spano et al. 2018). Par exemple, afin de vérifier la nature des groupes définis par la morphologie des colonies de *Pocillopora damicornis*, Schmidt-Roach et al. (2013) ont utilisé différents marqueurs pour délimiter des pools génétiques chez l'hôte mais également des marqueurs ribosomaux pour caractériser les populations de symbiotes. En fonction du marqueur moléculaire, les auteurs regroupaient ou au contraire sous-partitionnaient des groupes prédéfinis par la morphologie.

Tableau II.3-1 : Sensibilité des marqueurs moléculaires dans l'identification de groupes génétiques différenciés inter et intra espèces morphologiquement décrites chez des coraux (en gris) et des anémones de mer (en blanc)

Etude	Espèces (nb morphotypes)	Marqueurs génétiques	Groupes génétiques
Flot et al. 2011 (Figure II.3-1.A)	<i>Stylophora madagascarensis</i>	ITS2,	A
	<i>Stylophora mordax</i>	ORF et putative région de contrôle	B et C
	<i>Stylophora pistillata</i>	mitochondriaux	C
Schmidt-Roach et al. 2013	<i>Pocillopora damicornis</i> (5 écomorphes)	ORF et CR mitochondriaux	9 ^a
		HSP70	9 ^b
		ITS2	5
		Contenu symbiotique	6
González-Muñoz et al. 2015	<i>Phymanthus crucifer</i> (3 morphes)	12S mitochondrial	2
Pereira et al. 2014 (Figure II.3-1.B)	<i>Actinia equina</i> (3 morphes)	28S ribosomal	2
	<i>Actinia fragacea</i>		
Spano et al. 2018	<i>Anthothoe chilensis</i> (4 morphes)	SNP issus de séquençage RAD	7

9^a et 9^b indiquent un nombre similaire de groupes obtenus mais deux regroupements différents des écomorphes

Enfin, en plus de la diversité génétique des populations de Cnidaires en tant qu'animal, la présence de symbiotes associés ajoute un niveau de diversité génétique supplémentaire qui peut être corrélé avec les variations phénotypiques de l'holobiotte. Une étude a mesuré la diversité symbiotique entre trois morphes du corail *Madracis pharensis* (marron, violet et vert Figure II.3-2). Il s'avère que chez cette espèce, la composition en Symbiodiniacées est fortement corrélée aux morphes hôte indépendamment des conditions d'exposition lumineuse de la colonies corallienne (Frade et al. 2008).

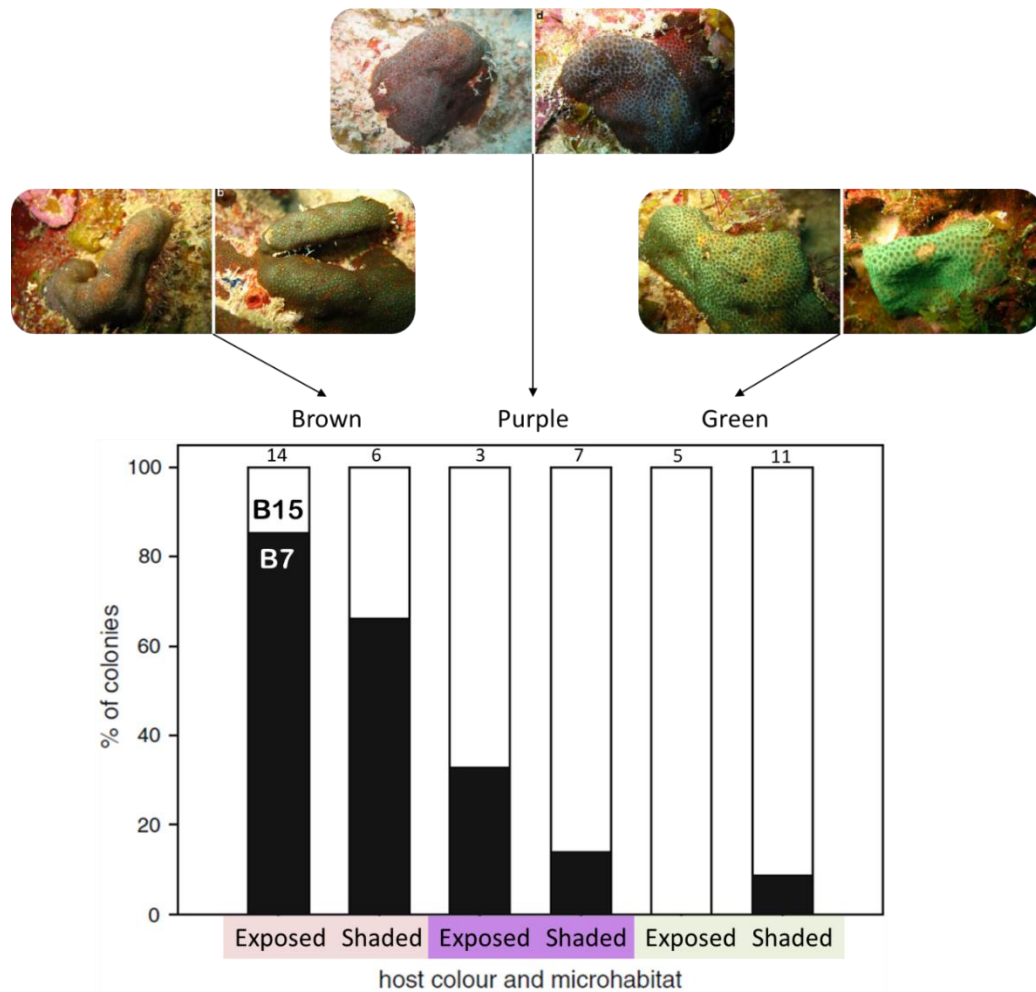


Figure II.3-2 : Composition en Symbiodiniacées en fonction de la couleur et l'habitat lumineux de l'hôte
 Les symbiotes appartiennent au genre *Breviolum* (B7 en noir et B15 en blanc) et sont caractérisés par les séquences ITS2. Le nombre de colonies testé est indiqué au-dessus des histogrammes.
 (modifié d'après Frade et al. 2008)

II.4. Des espèces cryptiques chez *Anemonia viridis* ?

Lors de mes travaux, je me suis donc interrogée sur la nature des morphes d'*A. viridis* pour laquelle cinq morphes ont précédemment été décrits (Figure I.4-4), tous symbiotiques : représentent-ils une signature de spéciation ou sont-ils le reflet d'une distribution différenciée de symbiotes ? Afin de définir la nature de ces morphes et d'explorer la diversité génétique de l'hôte et du symbiote, nous avons choisi une approche de génétique des populations sur des populations naturelles géographiquement distantes de Manche et de Méditerranée, où les trois morphes les plus fréquents (*rufescens*, *rustica* et *smaragdina*) sont trouvés en sympatrie.

II.4.1. Echantillonnage des morphes en Europe

Pour définir la nature taxonomique des morphes d'*Anemonia viridis*, les trois morphes les plus répandus (*rufescens*, *rustica* et *smaragdina*) ont été échantillonnés sur deux sites en Manche et plusieurs sites le long des côtes méditerranéennes (Figure II.4-1). Une espèce proche, *Paranemonia cinerea*, a servi de groupe externe. L'ADN total a été extrait, pour chaque anémone nous avons donc l'ADN de l'hôte animal et celui des Symbiodiniacées associées. L'échantillonnage marqué A1 est l'échantillonnage ayant servi à l'étude de Mallien et al. (2017), celui marqué A2 correspond à l'étude de Porro et al. (2019) (les deux articles sont disponibles en annexes de ce chapitre : A1 et A2).

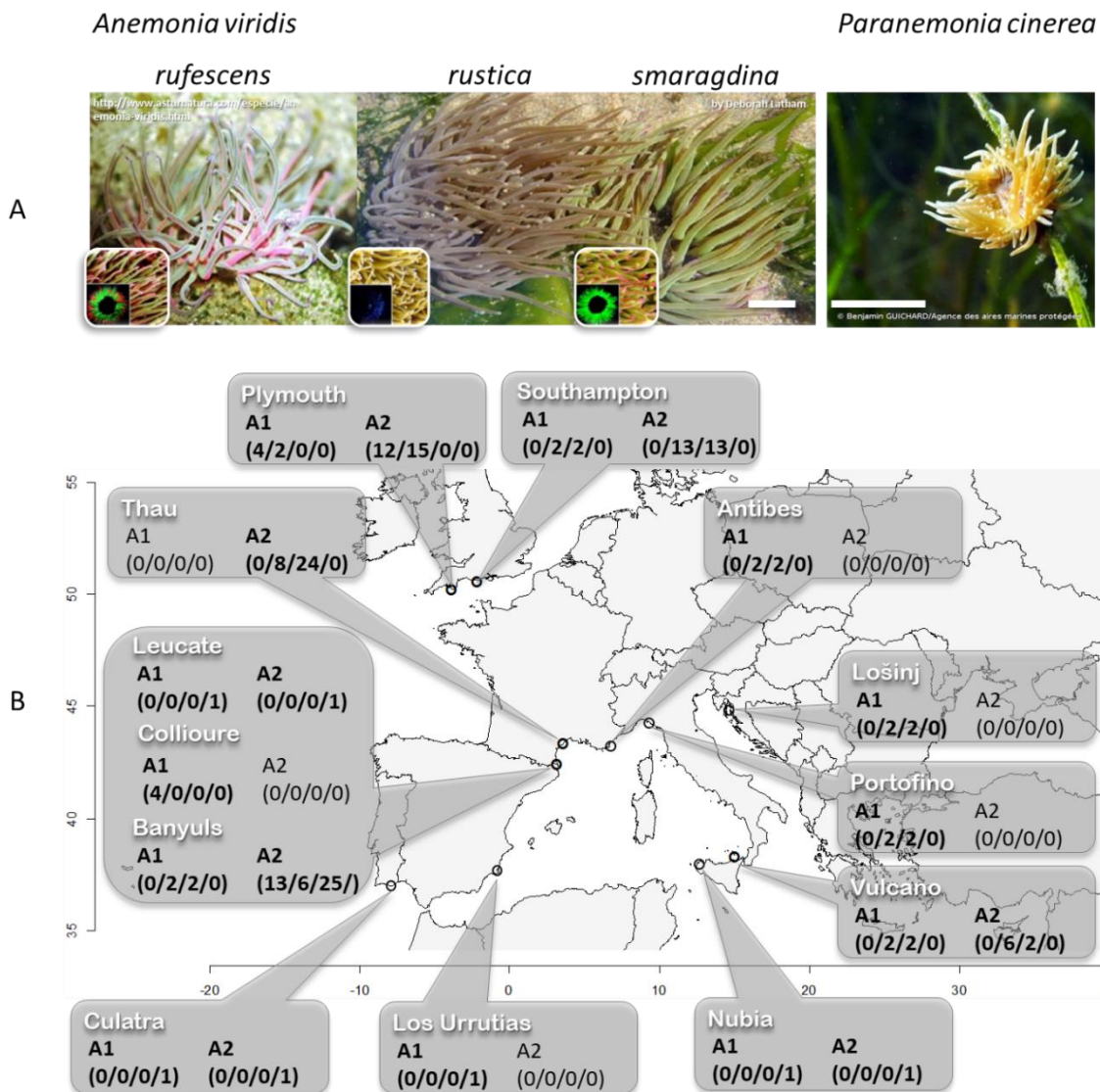


Figure II.4-1 : Morphes et localisation des individus d'*Anemonia viridis* échantillonnés sur les côtes européennes. A. Morphes d'*A. viridis* (*rufescens*, *rustica*, *smaragdina*) et le groupe externe *Paranemonia cinerea* les barres d'échelle correspondent à 5cm. B. Localisation des sites d'échantillonnage et nombre d'échantillons (*rufescens*/*rustica*/*smaragdina*/*P. cinerea*) pour chacune des études détaillées en annexes (A1 : Mallien et al. 2017, A2 : Porro et al. 2019)

II.4.2. Génotypage

II.4.2.1. Marqueurs génétiques et niveau de divergence de l'hôte animal

Pour estimer la position des morphes d'*A. viridis* le long d'un possible continuum de spéciation, nous avons choisi deux méthodes pour génotyper les anémones de mer. Pour la première méthode, nous avons sélectionné des gènes identifiés lors d'expériences de réponse à un stress thermique (Ganot et al. 2011; Moya et al. 2012). Ces gènes avaient une expression différentielle entre condition contrôle et condition stressée. Les gènes de réponse au stress peuvent être les gènes qui « voient » l'environnement. Ils sont donc susceptibles de porter un signal de différenciation entre populations plus fort que des marqueurs neutres (Bensch et al. 2002; Garvin et al. 2010). Nous avons développé des marqueurs EPIC (*Exon-Primed Intron-Crossing*) sur un set de ces gènes de stress (Mallien et al. 2017; Mallien 2017) (Figure II.4-2).

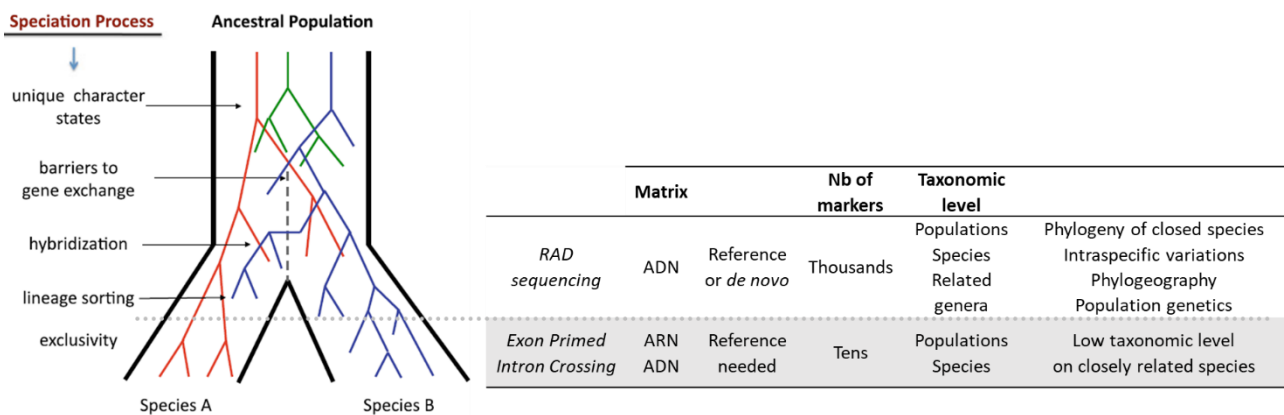


Figure II.4-2 : Efficacité des approches EPIC et Séquençage RAD dans la différenciation de pools géniques. Les marqueurs EPICs (en gris dans le tableau) sont plus appropriés dans l'étude d'espèces en fin de continuum de spéciation alors que les marqueurs issus du séquençage RAD peuvent permettre d'identifier des populations en cours de spéciation.

(image tirée de Shaw and Mullen 2011; tableau partiellement reproduit de Zimmer and Wen 2015)

Pour la deuxième approche, nous avons utilisé la méthode du séquençage RAD (ou *RADsequencing* pour *Restriction site Associated DNA sequencing*) (Porro et al. 2019). Par cette approche, plusieurs milliers de marqueurs SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ont pu être

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique générés, fournissant par la même autant de caractères génétiques. Le grand nombre de marqueurs générés par le séquençage RAD permet l'accès à une plus grande proportion du génome que l'amplification spécifique de quelques marqueurs et donc fournir un niveau de résolution plus approprié pour étudier des cas où le processus de spéciation est en cours (Emerson et al. 2010; Pante et al. 2015a; Ree & Hipp 2015) (Figure II.4-2).

II.4.2.2. Caractérisation des populations de Symbiodiniacées

Les populations de symbiotes d'*A. viridis* ont été génotypées à l'aide d'un des marqueurs ribosomaux canoniques utilisés pour l'identification des Symbiodiniacées, l'ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*), une portion variable de l'ADN ribosomal nucléaire. Pour caractériser les populations des symbiotes, nous avons considéré le catalogue des séquences ITS2 amplifiées dans chaque anémone. Pour définir ce catalogue, nous avons choisi une méthode *ad hoc* basée sur la profondeur de séquençage (le nombre de *reads*, ou lectures, par séquence par anémone) et le partage de ces séquences ITS2 entre anémones. Cette méthode est similaire aux approches utilisées pour identifier les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) et est identifiée par le code D&S (pour *Depth and Sharing* car un seuil de profondeur de lectures et de partage entre individus a été appliqué pour valider les séquences) dans la suite du manuscrit. Nous avons également utilisé la procédure d'analyse des séquences ITS2 SymPortal (Hume 2019; Hume et al. 2019) qui est basée sur l'algorithme du *Minimum Entropy Decomposition* (Eren et al. 2015) (pour les précisions se reporter à l'annexe A2 de ce chapitre, Porro et al 2019).

II.4.3. Résultats majeurs

II.4.3.1. Divergence des morphes d'*A. viridis*

Initialement la divergence génétique entre les morphes d'*A. viridis* a donc été testée en utilisant les cinq marqueurs EPIC analysés au sein des individus des trois morphes. A partir des données de séquençage recueillies, nous avons ainsi estimé l'arbre d'espèce le plus probable parmi différents partitionnements des individus (au travers d'une méthode basée sur la coalescence).

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

Cette approche nous a permis de tester plusieurs scénarios de spéciation : (i) en regroupant comme une seule espèce les différents morphes d'*A. viridis*, (ii) en considérant les morphes comme des entités différentes, en séparant les individus par origine géographique (la Manche *versus* la Méditerranée), (iii) ou enfin en combinant et en hiérarchisant les deux derniers partitionnements avec soit une différenciation morphologique puis géographique, soit d'abord une différenciation par l'origine géographique puis une différenciation morphologique locale (Figure II.4-3).

Le partitionnement le plus vraisemblable (défini avec SpedeSTEM, Ence & Carstens 2011), regroupe les trois morphes en une seule espèce, différenciée du groupe externe, *P. cinerea*. Ainsi sur la base de ces cinq marqueurs EPICs, les morphes d'*A. viridis* ne semblent donc pas être des groupes génétiques ayant divergé depuis longtemps. Ces résultats ont fait l'objet d'une première publication présentée en annexe A1 de ce chapitre, (Mallien et al 2017)

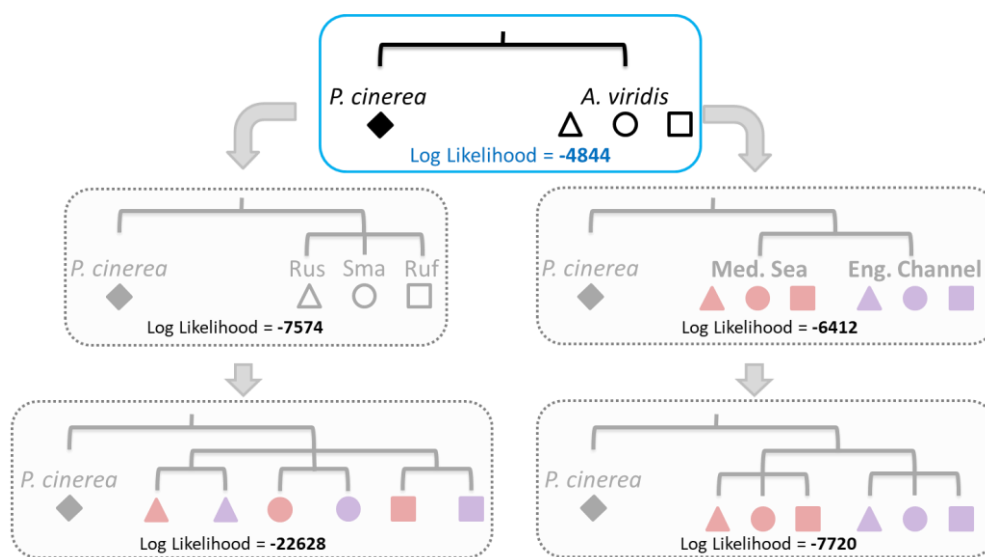


Figure II.4-3 : Différents partitionnements des individus d'*A. viridis* et leur vraisemblance. Les figurés représentent les différents morphes (Δ : *rustica*, \circ : *smaragdina*, \square : *rufescens*), les couleurs indiquent l'origine géographique (\blacktriangle \bullet : Méditerranée, \blacktriangle \bullet : Manche). Les vraisemblances ont été calculées avec SpedeSTEM (Ence and Carstens 2011).

A ce stade, nous ne pouvons néanmoins pas écarter l'hypothèse que les marqueurs génétiques choisis n'apportent pas la résolution nécessaire pour détecter un phénomène de spéciation

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique récent (ou en cours) entre les morphes. Nous avons donc mené une étude complémentaire en augmentant le nombre d'échantillons et de marqueurs génétiques (grâce au séquençage RAD). Nous avons alors pu identifier (après correction de l'effet de la clonalité sur l'analyse de la structure génétique) quatre groupes génétiques dans l'échantillonnage A2 à l'aide d'une méthode de reconstruction d'arbre d'espèces basée également sur la coalescence (SVDquartets, Chifman & Kubatko 2014), et avec une méthode de clustering (l'algorithme sNMF implémenté dans le paquet LEA sous R sous le nom de fonction *snmf*, Frichot & François 2015). Ces quatre groupes génétiques (correspondant aux clades de l'arbre généré par SVDquartets, ou aux clusters obtenus avec *snmf*) regroupent des individus de morphes différents et sont distribués géographiquement avec : un groupe en Manche (identifié comme *EngCh* dans l'annexe A2 et correspondant au cluster 3 dans la Figure II.4-4), un groupe majoritairement composé des individus de provenance de l'étang de Thau (*Med1* dans l'annexe A2, cluster 2 dans la Figure II.4-4), un groupe composé des autres individus méditerranéens (*Med2* dans l'annexe A2, cluster 1 dans la Figure II.4-4) et un groupe composé des individus de morphe *rufescens* provenant de Banyuls (*BanRuf* dans l'annexe A2, cluster 4 dans la Figure II.4-4).

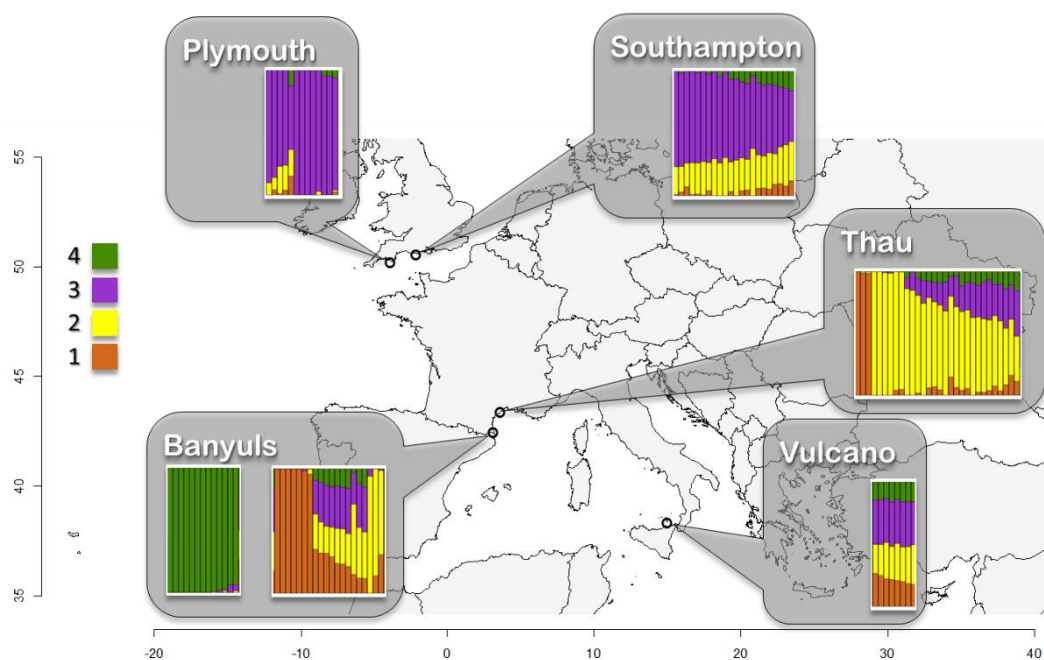


Figure II.4-4 : Distribution géographique des clusters génétiques identifiés avec *snmf*. cluster1=*Med2*, cluster2=*Med1*, cluster3=*EngCh*, cluster4=*BanRuf*

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

Les individus de Vulcano ont été attribués au clade *Med2* sur la base des résultats de SVDquartets (annexe A2, Figure 3) qui les placent de façon non-ambigüe dans ce clade alors que l'analyse de clustering génétique, plus sensible aux données manquantes (la qualité médiocre des individus de Vulcano a limité le nombre de lectures disponibles), ne peut clairement attribuer ces individus à un cluster. Un seul groupe génétique est constitué des individus d'un seul morphe (*rufescens*), localisé uniquement à Banyuls (*BanRuf*, cluster 4), et s'avère aussi divergeant que le groupe externe (cf. annexe A2, Figure 2 : arbre RAxML). Par ailleurs, trois de ces groupes génétiques sont trouvés en sympatrie à Banyuls : *Med1*, *Med2* et *BanRuf* et nous n'avons détecté que peu d'introgessions entre *Med1* et *Med2* et aucune entre *BanRuf* et les autres lignées.

A l'instar des tests d'hypothèses effectués pour l'analyse des marqueurs EPICs, nous avons testé la pertinence de ce partitionnement par coalescence avec BFD* (Leaché & Ogilvie 2016). Ce partitionnement a été comparé avec le partitionnement par morphe ou par région (Manche *versus* Méditerranée *versus* *BanRuf*). Le partitionnement des individus par clades/clusters est bien le meilleur parmi ceux testés (Figure II.4-5 et annexe A2, *table S3*) et implique que les quatre groupes génétiques identifiés sont des espèces différentes.

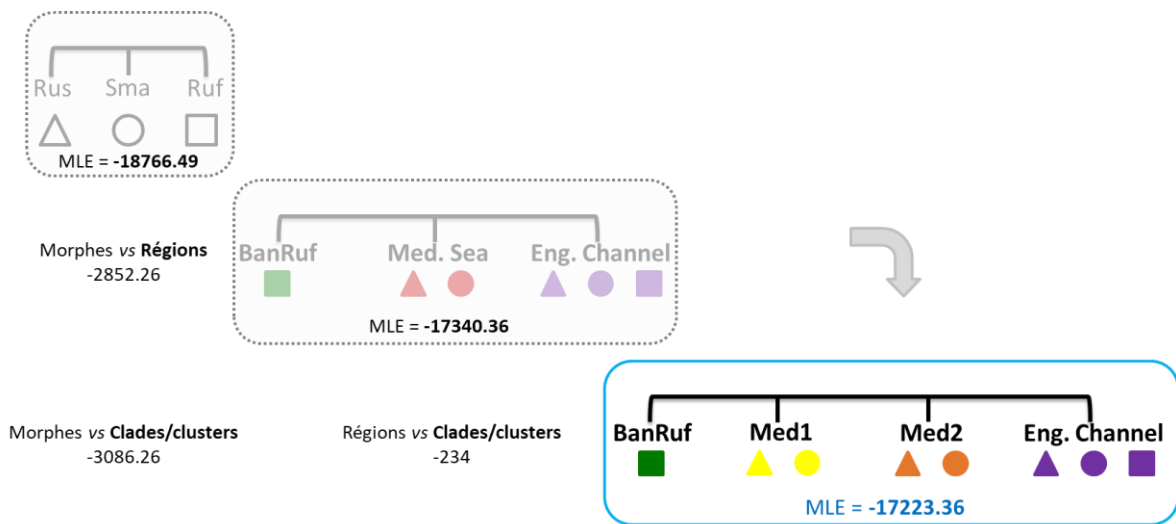


Figure II.4-5 : Pertinence du partitionnement des anémones de mer en fonction des morphes, de la région d'origine ou des clusters génétiques

L'hypothèse des morphes comme espèces correspond à l'hypothèse nulle choisie pour BFD*, l'hypothèse d'espèces secondaire basée sur la région d'origine distingue les *rufescens* de Banyuls des anémones de mer de Méditerranée et de Manche. La deuxième hypothèse d'espèces secondaire correspond au partitionnement obtenu avec les clades issus de l'analyse SVDquartets et les clusters génétiques snmf.

Les valeurs dans les cadres sont les *Maximum Likelihood Estimates* de BFD*, les valeurs dans la partie inférieure indiquent la significativité et le signe l'hypothèse d'espèce la plus vraisemblable (en gras).

Trois de ces groupes génétiques indépendants (*Med1*, *Med2* et *EngCh*) partagent des morphes différents et semblent plutôt structurés par l'origine géographique des échantillons (Figure II.4-4 et Tableau II.4-1). La divergence entre *EngCh* et les autres anémones méditerranéennes pourrait donc s'expliquer par un processus de vicariance mis en place pendant la colonisation post-glaciaire des côtes de la Manche, ne fournissant pas jusqu'alors d'habitat aux organismes marins.

L'existence d'espèces cryptiques au sein d'*A. viridis* est néanmoins renforcée dans cette étude par la présence de la lignée *BanRuf* en sympatrie avec des individus des lignées *Med1* et *Med2* sans qu'aucune introgression ne soit détectée. De même certains individus des lignées *Med1* et *Med2* vivant en sympatrie à Banyuls ou à Thau ne montrent pas ou peu de signaux de brassage génétique. Dans une autre étude, développée dans le chapitre III (page 127), nous avons étudié plus en détail les populations d'*A. viridis* en Méditerranée (annexe A3 du chapitre III). Elle nous a permis de confirmer l'existence de plusieurs groupes génétiques en Méditerranée (désormais au nombre de cinq) vivant en sympatrie.

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

En conclusion, il est pour l'heure toujours impossible de relier les différences morphologiques à des différences génétiques chez *A. viridis*, bien que nous ayons pu mettre en évidence un complexe d'espèces cryptiques au sein de l'espèce *A. viridis*.

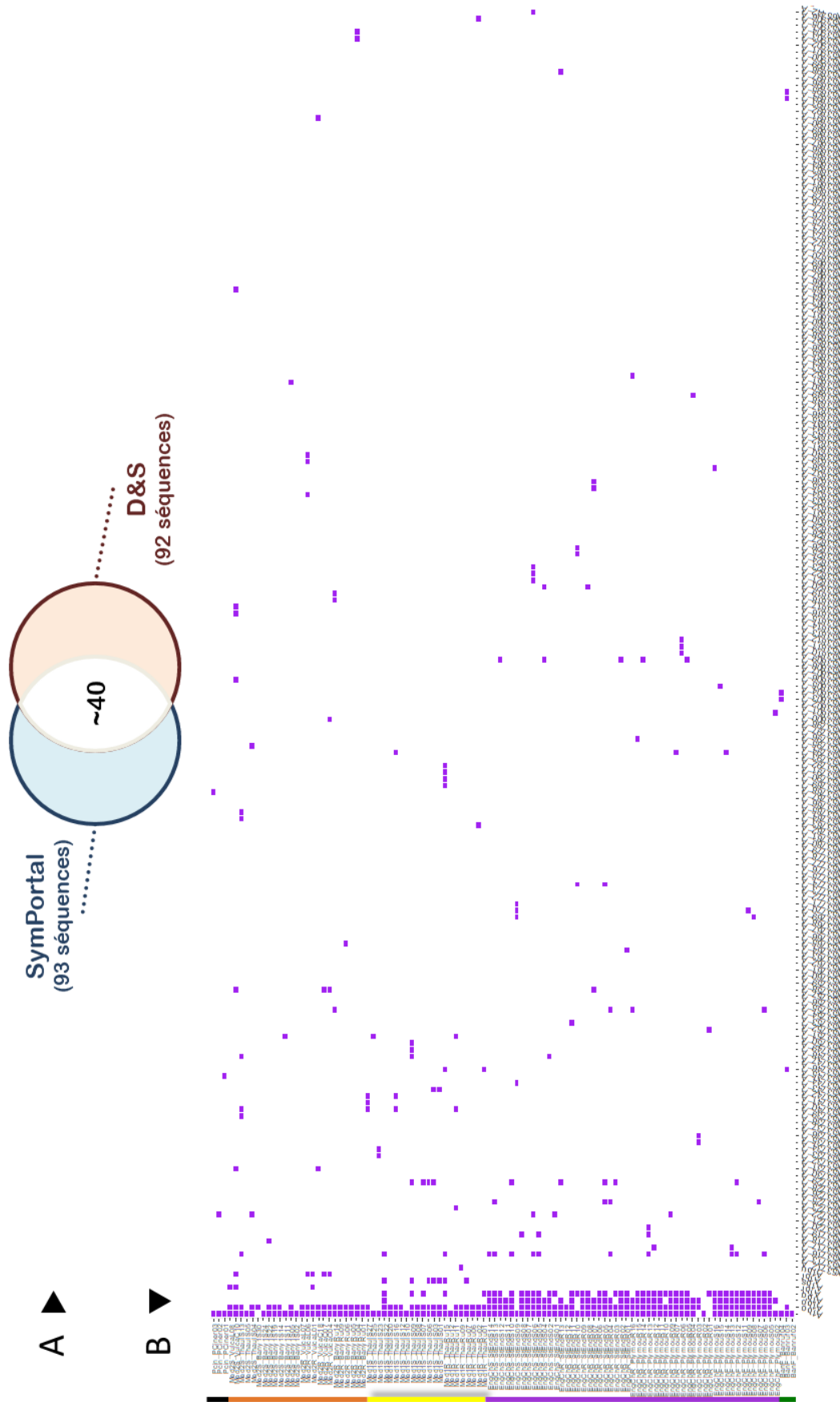
Tableau II.4-1 : Distribution géographique des espèces cryptiques chez *Anemonia viridis* en Méditerranée et en Manche.

L'attribution des anémones de mer au cluster majoritaire est indiquée dans la colonne « Cluster snmf ». * indique une difficulté d'attribution des individus de Vulcano à un quelconque cluster alors qu'ils sont placés de façon non-ambigüe dans le clade Med2 avec SVDquartets.

	Cluster snmf	Morphes	Vulcano	Etang de Thau	Banyuls	Plymouth	Southampton
BanRuf	4	<i>rufescens</i>					
Med1	2	<i>rustica</i> <i>smaragdina</i>					
Med2	1	<i>rustica</i> <i>smaragdina</i>	*				
EngCh	3	<i>rufescens</i> <i>rustica</i> <i>smaragdina</i>					

II.4.3.2. Différenciation génétique hôte et composition symbiotique

Le mystère des morphes n'étant pas résolu, nous avons voulu déterminer s'il existait une corrélation entre la composition en Symbiodiniacées et les différenciations morphologiques et génétiques observées chez *A. viridis*. La diversité de symbiotes d'*A. viridis* a été déterminée par le marqueur ribosomal, ITS2. A l'aide de deux approches (D&S et SymPortal), nous avons identifié, pour chacune, environ 90 séquences différentes (dont une quarantaine commune aux deux approches) (Figure II.4-6.A). Toutes ces séquences ont bien été identifiées comme appartenant à des Symbiodiniacées du clade A tempéré (la distribution des séquences du jeu de données SymPortal au sein des anémones est donnée Figure II.4-6.B).



Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

La comparaison de la différenciation morphologique et du contenu symbiotique n'a pas mis en évidence de corrélation (annexe A2, Table 1 et Table S6). En revanche, nous avons mesuré une différence statistiquement significative (testée en PERMANOVA) dans les populations de symbiotes entre les lignées génétiques précédemment identifiées chez les hôtes. Les comparaisons deux-à-deux ont révélé une composition différente en symbiote pour chacune d'entre elles à l'exception de *BanRuf* qui semble partager, en fonction du jeu de données, une partie de la diversité de *Med1* ou de *Med2* (Tableau II.4-2).

Tableau II.4-2 : Comparaison deux-à-deux de la distribution de la diversité d'ITS2 entre clades/clusters génétiques hôtes. Les p-values en gras correspondent aux comparaisons statistiquement significatives après une correction FDR

	Dataset obtenu avec D&S			Dataset obtenu avec SymPortal		
	F	R ²	Adjusted p-value	F	R ²	Adjusted p-value
BanRuf vs EngCh	2.738076	0.04742236	0.003	5.512642	0.09262977	0.0022
BanRuf vs Med1	1.844418	0.06870769	0.0156	1.430598	0.05215337	0.1369
BanRuf vs Med2	1.013963	0.03071315	0.439	1.984534	0.07943049	0.04524
EngCh vs Med1	2.166855	0.02844879	0.0003	14.271417	0.15809453	0.0003
EngCh vs Med2	4.364921	0.0511325	0.0003	18.941614	0.20601785	0.0003
Med1 vs Med2	2.225183	0.04180696	0.0066	2.374094	0.05011376	0.0093

En complément de ces travaux et en se basant sur la distribution des ITS2 obtenus à l'aide SymPortal, j'ai réalisé une analyse discriminante en composante principale, *dapc*, afin de déterminer la nature de la différenciation mise en évidence avec la PERMANOVA. Seule la différenciation symbiotique observée entre la Manche et la Méditerranée, portée par le premier axe de la *dapc* (Figure II.4-7), est due à un des variants ITS2 majoritaires (A1bq avec un poids supérieur à 20% sur cet axe). C'est sur l'axe 3 que l'on peut différencier *Med1* de *Med2* (à l'aide du variant 53712) et la différenciation entre *BanRuf* et les autres anémones est visible dans la troisième dimension de la *dapc* et semble due à deux variants (53803 et 53804). La différenciation entre la Manche et la Méditerranée serait donc due à la présence dans la Manche d'une souche particulière de Symbiodiniacées identifiable avec le variant ITS2 A1bp.

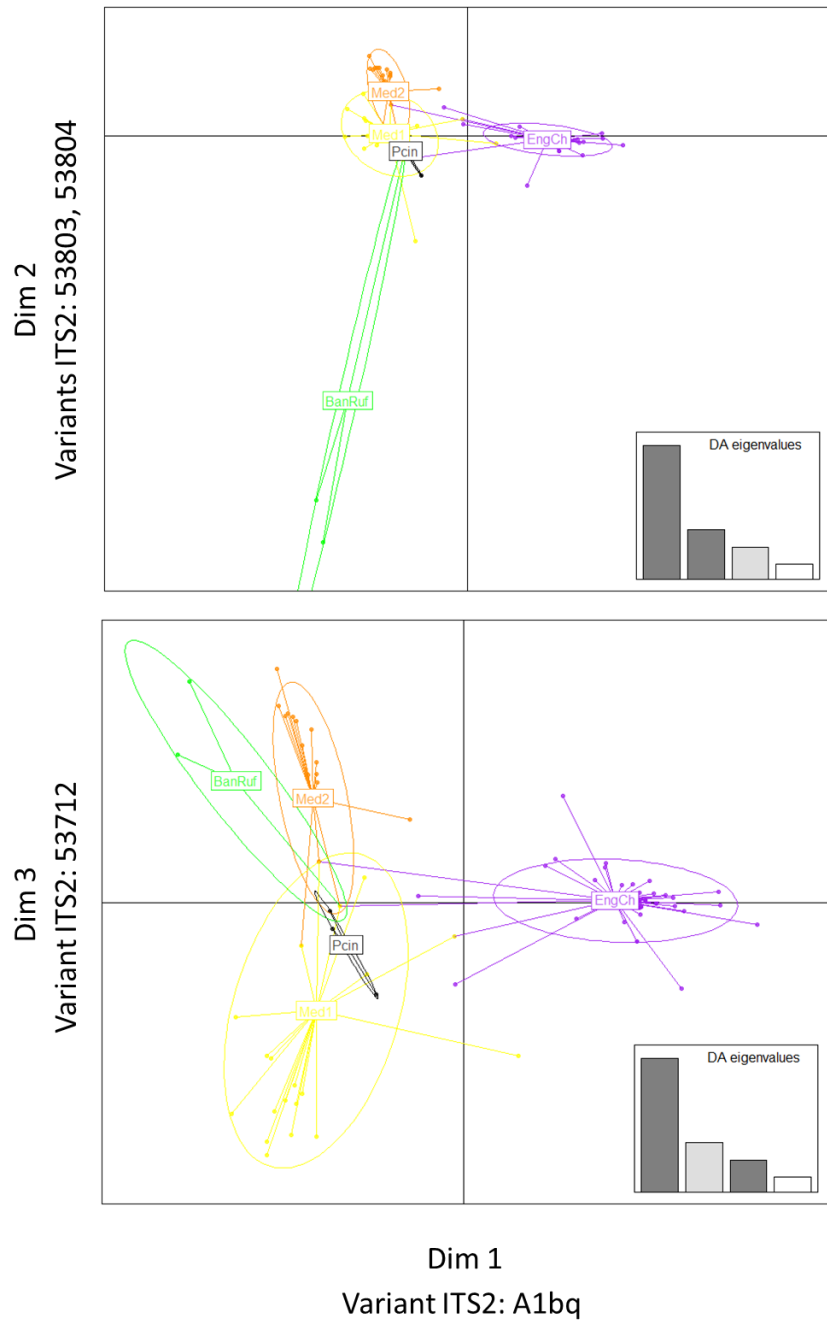


Figure II.4-7 : Analyse discriminante en composante principale sur les ITS2 (SymPortal) en fonction des clades/clusters hôte
EngCh en violet, *BanRuf* en vert, *Med1* en jaune, *Med2* en orange, *P. cinerea* en noir

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

Les morphes observables chez *A. viridis* ne sont donc pas liés à la composition en Symbiodiniacées. En revanche, celle-ci est différenciée en fonction des clades/clusters génétiques identifiés chez l'hôte, avec semble-t-il un effet de la région d'origine des anémones, différenciant fortement Manche et Méditerranée. La différenciation des populations de symbiotes entre Manche et Méditerranée semble suivre les résultats obtenus chez une autre anémone symbiotique, *Aiptasia couchii*, pour laquelle une « lignée » méditerranéenne et une « lignée » atlantique ont été identifiées au sein du clade A tempéré (Grajales et al. 2016).

L'utilisation de l'ITS2 est particulièrement appropriée pour la mesure et la compréhension de la diversité génétique à l'échelle de l'espèce (Coffroth & Santos 2005; LaJeunesse & Thornhill 2011). Comme la différenciation symbiotique entre les lignées méditerranéennes semble être due à des variants rares d'ITS2, l'amélioration de la mesure de la diversité symbiotique au sein d'*A. viridis* par l'utilisation de marqueurs plus résolutifs sur des temps évolutifs courts (comme des marqueurs microsatellites) permettrait de préciser le niveau de différenciation des populations de Symbiodiniacées entre *BanRuf*, *Med1*, *Med2*.

La nature des morphes d'*A. viridis* reste encore à éclaircir (Chapitre IV.1.2), mais la génération du nombre important de marqueurs grâce au séquençage RAD pourrait servir à une analyse d'association phénotype-génotype qui pourrait identifier des SNPs corrélés avec la différenciation morphologique des anémones (Korte & Farlow 2013). Mais cette variation pourrait aussi être due à une réponse plastique aux conditions locales au moment de l'établissement de la larve suivie d'une canalisation développementale (Kawecki & Ebert 2004; Zamer & Mangum 1979).

Annexes

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

A1. Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria)

Systematics and Biodiversity (2017), 1–16



Research Article



Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria)

CÉDRIC MALLIEN ¹, BARBARA PORRO ¹, THAMILLA ZAMOUM ¹, CAROLINE OLIVIER¹, JÖRG WIEDENMANN ^{2,3}, PAOLA FURLA ¹ & DIDIER FORCIOLI ¹

¹Sorbonne 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

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

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

(Received 25 January 2017; accepted 5 September 2017; published online 13 November 2017)

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 amongst 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.

Key words: 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 25 m 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 (Choresch, 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, 1884; 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 (1884) within *A. sulcata* has been raised to the species level as *A. rustica* (Bulnheim & Sauer, 1984), although no clear morphological differences amongst 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

Correspondence to: Didier Forcioli. Email: forcioli@unice.fr

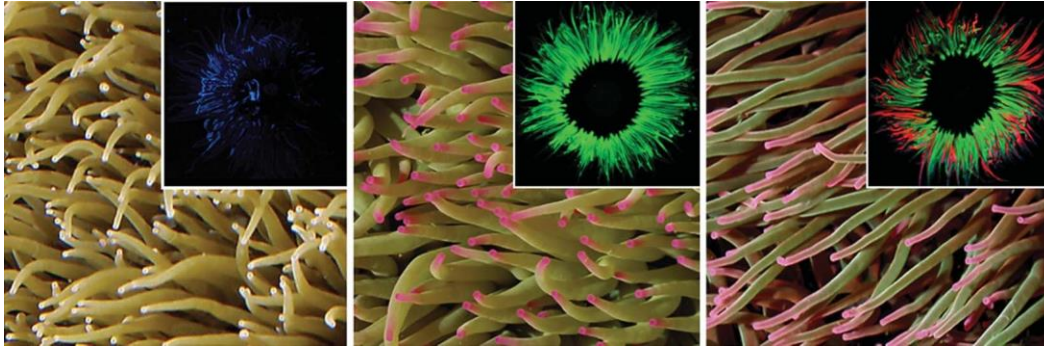


Fig. 1. Colour morphs of *A. viridis* defined by the content of GFP-like proteins. The inset shows the fluorescence of the animals excited by ultraviolet light (366 nm). From left to right: var. *rustica*, var. *smaragdina*, and var. *rufescens*.

choose to denominate them as varieties within the species *A. viridis* (Forskal, 1775), given the priority arising from the earlier description date. Five different morphs (var. *rufescens*, *rustica*, *smaragdina*, *viridis*, and *vulgaris*) have been differentiated amongst a larger number of colour variants initially described by Andres (1884) and Gosse (1860) based on the type of green fluorescent, red fluorescent and pink non-fluorescent host pigments that define the tentacle colouration (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 et al., 1999; Wiedenmann, Elke, Spindler, & Funke, 2000a). *Anemonia 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 et al., 1999, 2000a). The tentacles of var. *rustica* and *vulgaris* do not contain GFP-like proteins in amounts that can be detected by spectroscopic techniques (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, 1884) had been described, displaying white tentacles, respectively with and without pink tips (Wiedenmann, Kraus, Funke, & Vogel, 2000b). They have however already been shown to be aposymbiotic clones of var. *vulgaris* (*alabastrina*) and var. *rustica* (*albida*) (Wiedenmann et al., 2000b).

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 et al., 1999, 2000b). 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 et al., 1999, 2000b). 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). Amongst 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

markers in cnidarians (Shearer & Coffroth, 2008; Shearer, Van Oppen, Romano, & W€orheide, 2002, but see Keshavmurthy et al., 2013) is all the more prevalent in sea anemones (Daly, Gusmao, Reft, & Rodriguez, 2010, Dohna & Kochzius, 2016, Daly et al., 2017, see however Canales-Aguirre, Quiñones, Hernandez, 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 ExonPrimed 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 S1, see online supplemental material). 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 S1, see online supplemental material). To identify the morphotypes, we detected their respective diagnostic fluorescence patterns using a fluorescence torch (Tekna T6, FireDiveGear, the Netherlands). For each individual, tentacles were cut, flash frozen in dry ice or immersed in 70–95% ethanol in a 2 mL Eppendorf container and stored at -80C.

DNA extractions. DNA extractions were performed using a salting out protocol (Miller, Dykes, & Polesky, 1988) modified as follows. For each individual, 15–30mg of tentacles was digested in a 530mL solution containing up to 300mg/mL of proteinase K at 56C for 3h. Proteins and sugars were then precipitated with 200mL 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 -20C. Finally, after a second 5min centrifugation at 10,000g, the supernatant was eliminated, the DNA pellet was resuspended in 200mL Tris-EDTA buffer and stored at -20C. The final DNA concentration was measured using a Nanodrop1000 and varied from 100 to 1000ng/mL.

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 nonsymbiotic 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 orthologues in both genomes (matrix cost DC5/4, 65% similarity, gap opening D 50, gap extension D 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 25mL with 1 μ l Invitrogen™ PCR buffer mix, 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1mM each of forward and reverse primer, 0.8U Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA polymerase and 3ml of a 1/100 dilution of the DNA extracts. To determine the optimal annealing temperature for each primer pair, temperature gradient PCR was performed as follows: initial denaturation at 95C for 5min, 35 cycles each composed of denaturation for 30s at 95C, hybridization for 30s at temperatures between 50 and 68C, and elongation for 2 min at 72C. A final extension step was carried out at 72C for 7 min.

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 0.8–2% agarose gel, depending on PCR product size, with GelRed™ (Biotium) at 0.25 μ l concentration and using TAE 1 μ l 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 1 μ l as electrophoresis buffer and migration time and amperage depending on fragment size.

For the validated primer pairs (Table 1), 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 4–6 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 p for each locus on the whole dataset using MEGA6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipowski, & Kumar, 2013).

Locus validation pipeline. The alignment of sequences amongst 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. Amongst 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 was determined by two

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 cut-off 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).

Table 1. Molecular markers details. Name of the markers, designed by their specific primers, optimal PCR hybridizing temperature, and either the observed nucleotide 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	Forward and Reverse Primers (5'–3')	Tm (°C)	Nucleotide diversity (%)	Intron size (bp)	Repeat	Allele Nb	Size variation
Ca2m	Carbonic anhydrase 2 membrane	CCCCAGTGAAAGTGAACATTAAG TCTTTGACTTTGAGTGGTTTTGA	63	2.4	0	–	–	–
Ca2c	Carbonic anhydrase 2 cytosolic	GACCAAGGAAGAAATCACTTA TGAAGAGATCTGTTCAGTGA	62	0.0	0	–	–	–
TyrK	Tyrosine kinase receptor	GTTATGAAAGCGTTTATGAAAGACAGA CAGTTCTGCTAGAAAATCCTTCTTG	66	2.7	520–540	–	–	–
RNAbind5	RNA-binding motif protein 5	TACAAATGGCACAACTGGACAATA TTCAGTAGCAGATGTCGTAGCTGT	62	2.5	260–270 440–550	–	–	–
Sym32	Putative cell adhesion protein Sym32	GACTTTTGGAGTAAATACACTTTGTCA ATTTGGCAACTTCTGCAAGATT	63	1.3	0	–	–	–
DUF140	DNA unwinding factor 140	CTCTCTTCTCGGATGGTTCAT GCGAAAATCATGAAGACAATCA	54	2.7	535–545 595–605	–	–	–
RNF34	E3 ubiquitin-protein ligase RNF34-like	GCTAGTCGGCTGTAGCTTTTCG GGGTGCTTGTTGTAATGGTA	66	0.0	0	–	–	–
L19	Microsatellite	GATGCAATGACAAGGCCTACC GTATACGTCAATTCGCGCCTC	62	–	–	(ACAG)	12	100–457
L42	Microsatellite	CCCAACTTGTATCACCGAC ATCATGTTTGAGGGCCACCTTG	51	–	–	(AT)	8	215–223
L47	Microsatellite	CCTGATCATTTCTGGTCGAAAGC CCATGGCAACCGATTCAAAG	66	–	–	(AT)	9	288–320

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 $u D 0.16$ for *A. viridis* populations following Sole-cava and 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 \times site' or by 'morph \times region' groups taking into account that BPP can merge, but not split, these groups into species. The population size parameters (μ) were assigned the gamma prior $G(32, 200)$, with mean $32/200 D 0.16$. The divergence time at the root of the species tree (t_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. Eighty individuals of *A. viridis* were sampled in September 2015 in Saint-Jean-Cap-Ferrat ($4341^{\circ}59^{\circ} 0'N$, $719^{\circ}27^{\circ} 0'E$). On each side of the bay, two pure patches, one of var. *smaragdina*, one of var. *rustica* (10 individuals each) and a $2m^2$ 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 1) 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: 1mL (for L19 and L42) or 3mL (for L47) of a 1/100 dilution of the DNA extracts. The amplification cycle was as described above, except for an annealing temperature of 65C and a 30s 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 electrophorized 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

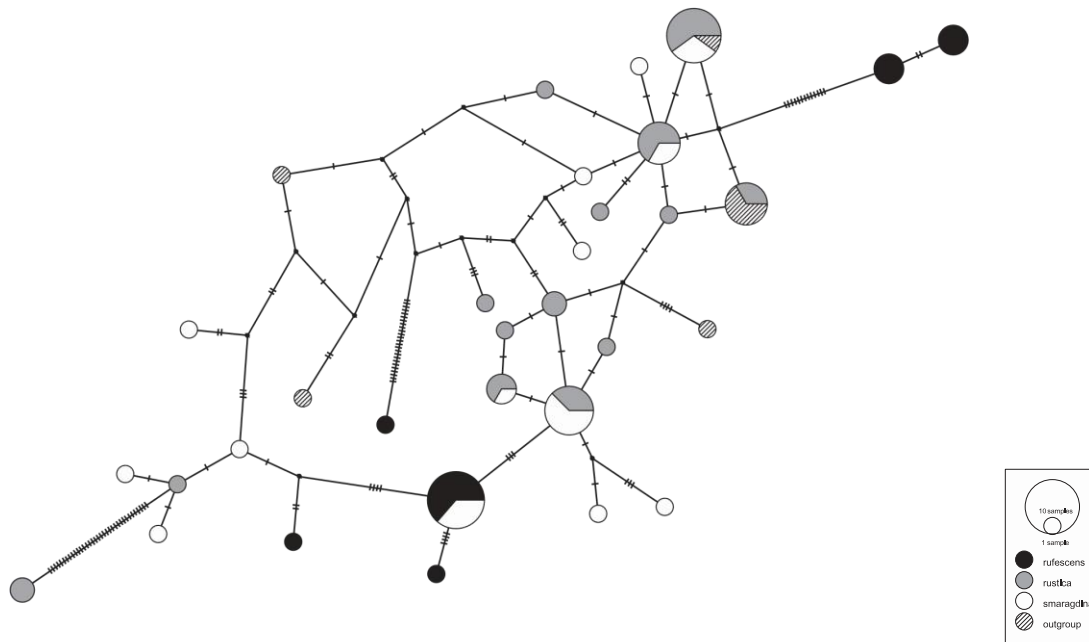


Fig. 2. Haplotype network of TyrK. A TCS haplotype network was drawn on each EPIC independently in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

MLG was lower than 5%, this MLG was considered as clonal.

The proportions of clonal individuals or MLGs were compared amongst 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 amongst loci between 0 and 5% (Table 1). 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 amongst the individuals analysed (outgroup included). Across all polymorphic loci, we obtained 303 parsimony informative positions. The obtained sequences are stored in GenBank under the accession's numbers: MF567601–MF567676 for TyrK, MF567677–MF567752 for Ca2m, MF567753–MF567824 for Sym32, MF567825–MF567892 for duf140 and MF567893–MF567966 for RNAbinding5.

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 Figure S1 (see online supplemental material). For all loci, both analyses gave similar results, with most trees being only partially resolved, with no clear clustering either by morphs or geography.

None of the haplotype networks showed grouping of alleles depending on morphology or geography (Figs 2–6). Whatever the locus, all morphs shared common alleles. Reticulation could be high (for tyrK and duf140, Figs 2, 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 was 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 2) and BPP (Table S1, see online supplemental material) 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 2). 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) (Table S2, see online supplemental material). 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 2).

Clonality

In total, 38 var. *smaragdina* and 39 var. *rustica* individuals were genotyped for three microsatellite markers L19, L42, and L47 (Table 1). We obtained 36 different genotypes (20 for var. *smaragdina*, 16 for var. *rustica*). Amongst these genotypes, 25 were unique (found in a single individual) (16 for var. *smaragdina*, nine for var. *rustica*). The other 11 genotypes were each found in two to

eight 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 1).

Even if clonality seemed more frequent in our samples in var. *rustica* (MLG D 7) than in var. *smaragdina* ecotype I (MLG D 4) (Table S2, see online supplemental material), 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).

Amongst 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 1) 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 sequences, even at degenerate codon positions, is a testimony of the high level of background selection

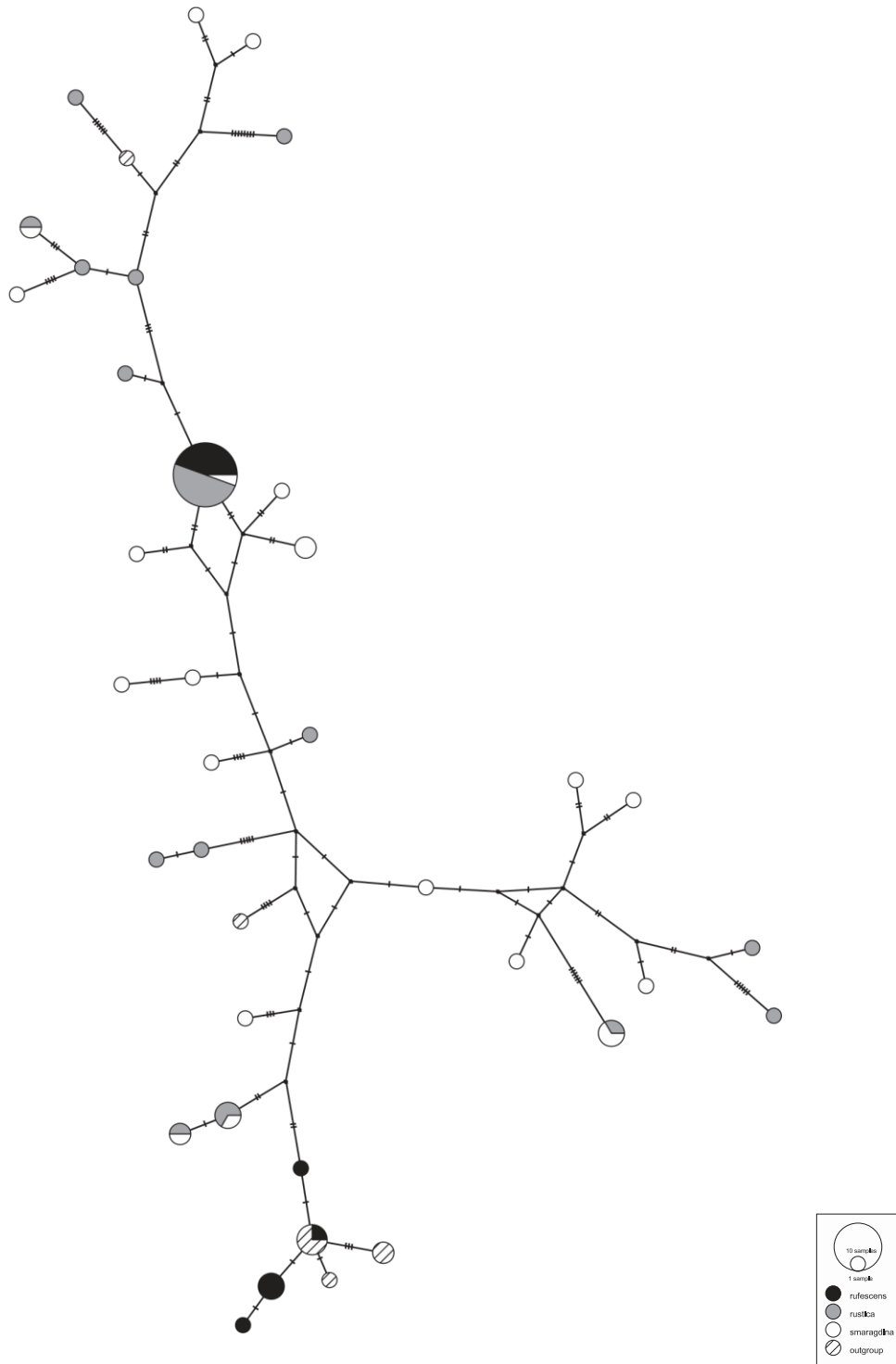


Fig. 3. Haplotype network of DUF140. A TCS haplotype network was drawn on each EPIC independently in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

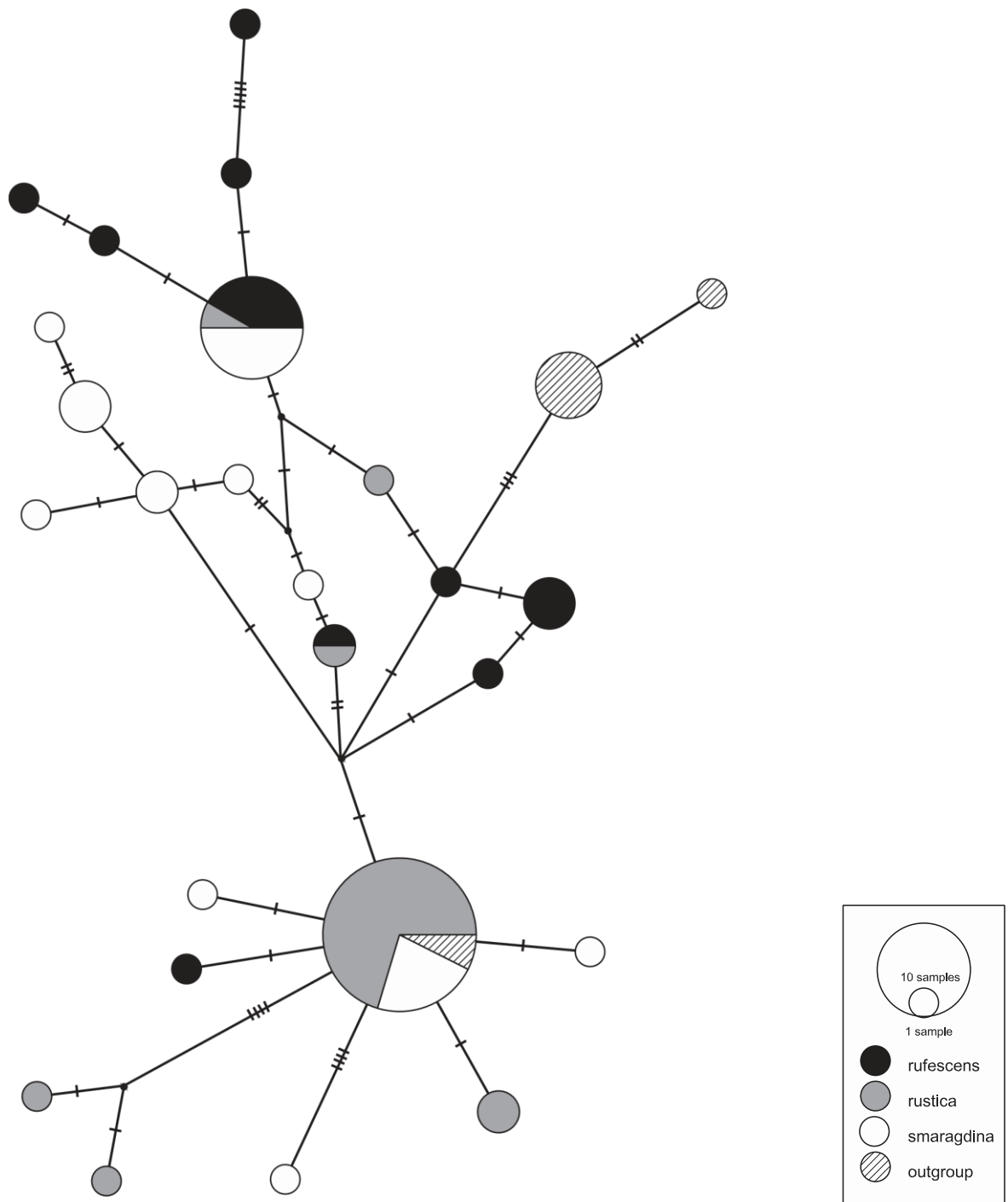


Fig. 4. Haplotype network of RNAbinding5. A TCS haplotype network was drawn on each EPIC independently in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

Table 2. 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 & 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, (RufMedCSmaMedCRusMedCRufEnCCSmaEnCCRusEnC)	-34745.86	1
RufMed, (Pcin, (SmaMedCRusMed) (RufEnCCSmaEnCCRusEnC))	-39994.15	3
RufMed (Pcin, (SmaMedCRusMed), (RufEnC, (SmaEnCCRusEnC))	-40324.37	4
Pcin, (RufMedCSmaMedCRusMed), (RufEnCCSmaEnCCRusEnC)	-40107.16	2
Pcin, (RufMedCRufEnC), (SmaMedCSmaEnC), (RusMedCRusEnC)	-40438.23	3
Pcin, RufMed, RufEnC, SmaMed, SmaEnC, RusMed, RusEnC	-40324.45	6

acting on these two loci, and therefore of their crucial role for the organism (i.e., pH homeostasis and protein turnover, respectively). It is interesting to note that in *A. viridis*, the loss of introns whose positions were conserved amongst *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* (Gonzalez-Muñoz et al., 2015).

In the case of *A. viridis*, species status for the colour morphs first described by Andres (1884) and Gosse (1860) has been widely discussed. The major variants are characterized by different reproductive strategies (Sauer, 1986; Wiedenmann et al., 1999, 2000b), different depth distributions (Sauer, 1986; Sauer et al., 1986; Wiedenmann et al., 1999, 2007) 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 amongst 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 amongst 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 2; Table S1, see online supplemental material).

One may argue that the apparent genetic homogeneity amongst 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 amongst 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*

of the genome can display such a lack of differentiation even amongst established species (Sato, Satoh, & Bishop, 2012). The sharing of alleles amongst independent lineages could also be due to incomplete sorting of ancestral alleles, a pervasive phenomenon amongst recently derived species, the so-called 'grey zone' (De Queiroz, 2007), and a major source of incongruence amongst gene trees and species trees (Fujita, Leache, 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).

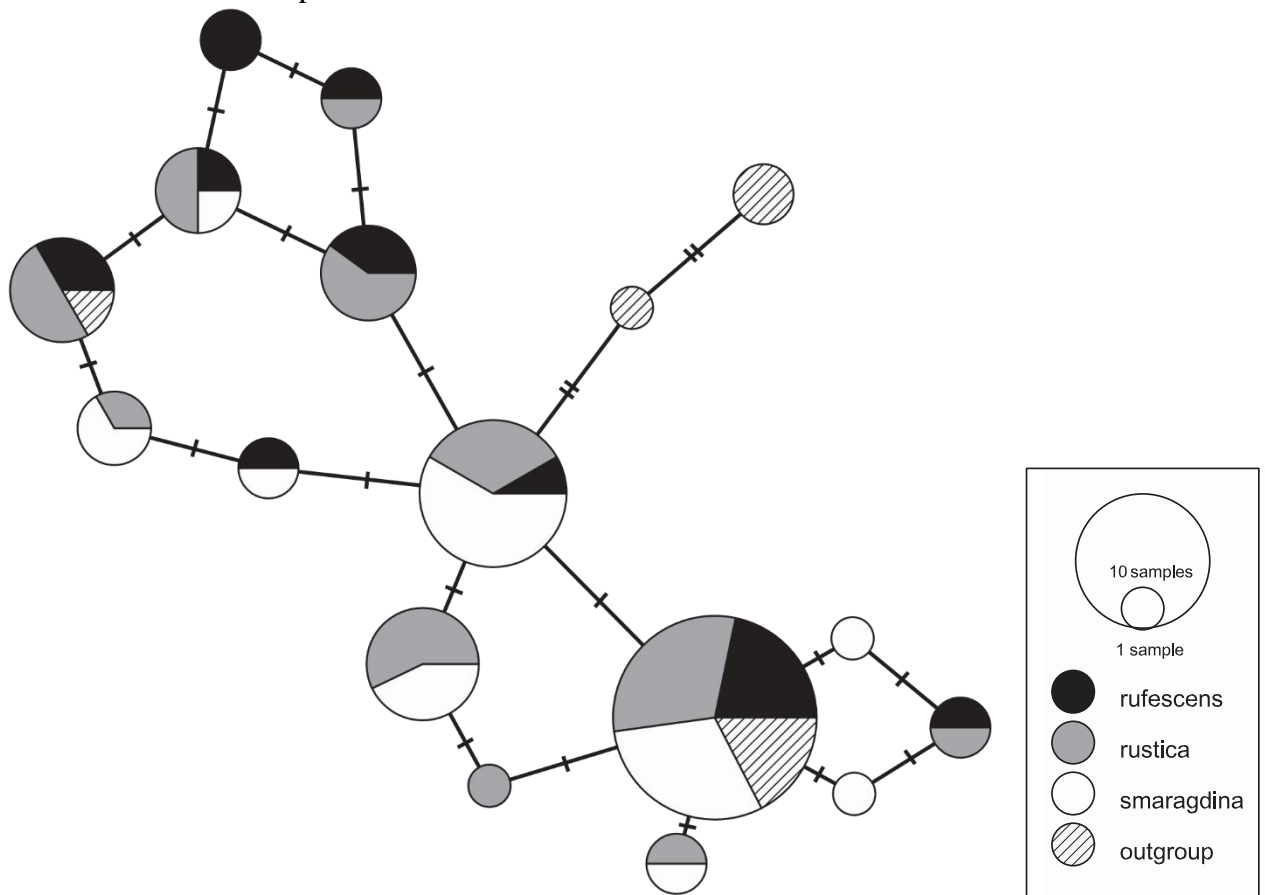


Fig. 5. Haplotype network of CA2m. A TCS haplotype network was drawn on each EPIC independently in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences.

individuals (Figs 2–6). As such, the repeated lack of differentiation is not per se a proof of absence of reproductive barrier amongst the morphs. As it has been shown in *Ciona*, parts

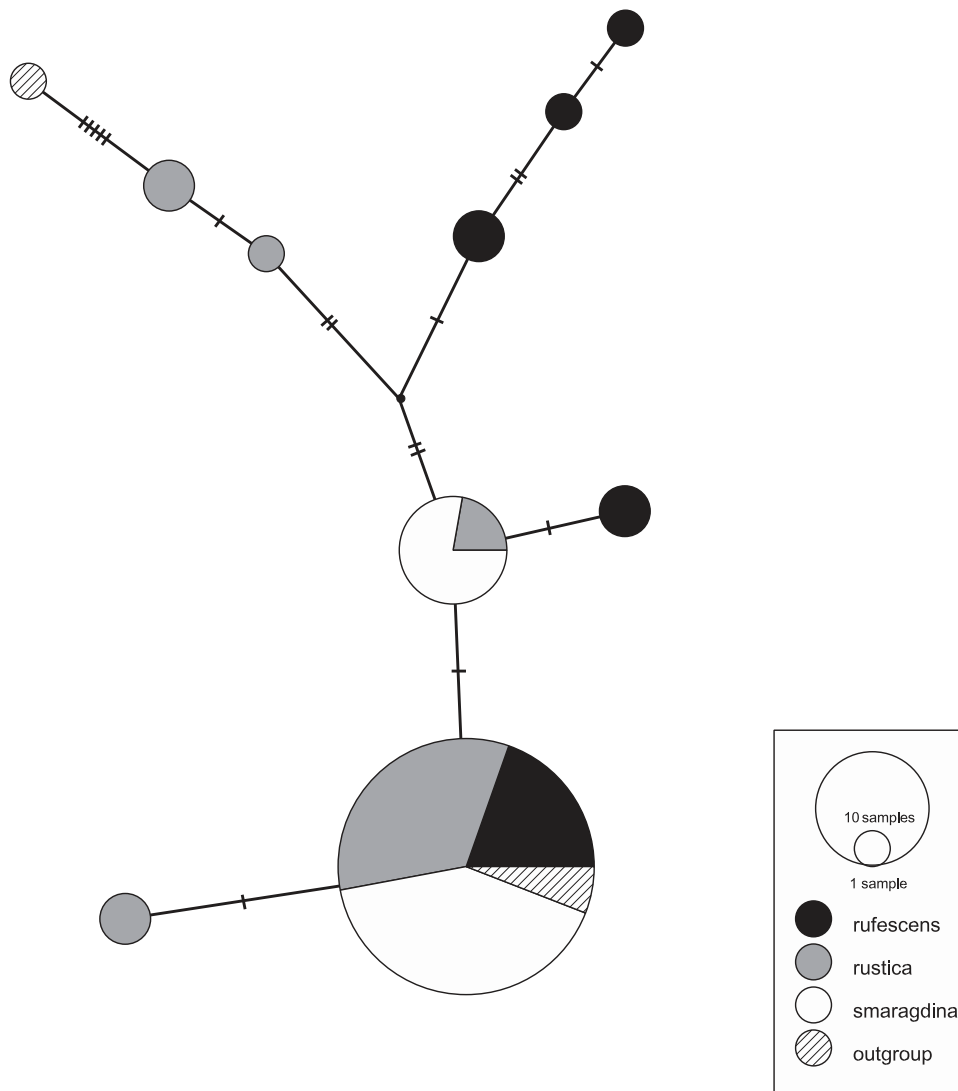


Fig. 6. Haplotype network of Sym32. A TCS haplotype network was drawn on each EPIC independently in PopART. Colours are attributed to morphs according to legend. For each haplotype, circle size indicates the number of occurrences

Applying both SpedeSTEM (Ence & Carstens, 2011) and BPP (Yang, 2015) analyses (Table 2 and Table S2, see online supplemental material) 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 amongst *A. viridis* individuals that was picked up by these analyses was not amongst 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 (Table S3, see online supplemental material). 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 amongst species niche exclusion. Indeed, the results of our species delimitation analysis clearly show that genetic differentiation amongst *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). Amongst them, the initially proposed photoprotective function of FPs and CPs in zooxanthellate, shallowwater cnidarians (Kawaguti, 1944; Salih, Larkum, Cox, K€uhl, & 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 amongst 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 biogeographic

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-Wang€uemert, 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). J.W. acknowledges funding from the 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 longstanding question of the nature of the morphs of *Anemonia viridis*.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors

Funding

This work was supported by the Natural Environment Research Council [grant number NE/I01683X/1]; H2020 European Research Council [grant number 311179]; Deutsche Forschungsgemeinschaft [grant number Wi1990/2-1] and Agence Nationale pour la Recherche [grant number ANR-12-ADAP-0016]

Supplemental data

Supplemental data for this article can be accessed at: <https://doi.org/10.1080/14772000.2017.1383948>

ORCID

Cedric Mallien <http://orcid.org/0000-0001-8701-6520>

Barbara Porro <http://orcid.org/0000-0003-0294-1886>

Thamilla Zamoum <http://orcid.org/0000-0002-2649-5772>

Joërg Wiedenmann <http://orcid.org/0000-0003-2128-2943>

Paola Furla <http://orcid.org/0000-0001-9899-942X>

Didier Forcioli <http://orcid.org/0000-0002-5505-0932>

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. (1884). *Le Attinie Volume primo, contenente bibliografia, introduzione e specigrafia*. Monographie, Leipzig, Germany: Fauna und Flora des Golfes von Neapel Teil 9.
- 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.14718286.2006.01522.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.
- 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, 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 Zoologischen Gesellschaft*, 77, 264.
- Canales-Aguirre, C. B., Quiñones, A., Hernandez, 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.
- Choresch, 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.

- Contarini, C. N. (1844). *Trattato delle attinie, ed osservazioni sopra alcune di esse viventi nei Contorni di Venezia* (198 p.). Venice: Stabilimento Di G. Antonelli.
- 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.
- Daly, M., Crowley, L. M., Larson, P., Rodriguez, E., Heestand Saucier, E., & Fautin, D. G. (2017). Anthopleura and the phylogeny of Actinioidea (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Organisms Diversity & Evolution*, 17545. doi:10.1007/s13127-017-0326-6
- Dana, J. D. (1846). *Zoophytes. Volume VII of the United States Exploring expedition during the years 1838, 1839, 1840, 1841, 1842. Under the command of Charles Wilkes, U.S.N.* (740 p.). Philadelphia: Lea & Blanchard.
- 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, 175–192.
- 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. (2016). 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.
- Forskal, P. (1775). *Descriptiones Animalium Avium, Amphibiorum, Piscium, Insectorum, Vermium; quae in itinere orientali observavit* (164 p.). Copenhagen: Mølleri, Havniae.
- 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., Leache, 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>

Gonzalez-Muñoz, R., Simões, N., Mascaro, M., Tello-Musi, J. L., Brugler, M. R., & Rodriguez, 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.

Gosse, P. H. (1860). *A historie of the British sea anemones and corals*. London: Van Voorst, Paternoster Row.

Grajales, A., & Rodriguez, 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.

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 nonfluorescent sea anemones from the Mediterranean Sea during a bleaching event. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 353, 221–234. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jembe> (accessed 13 September 2007).
- 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., & Maddison, D. R. (2017). Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 3.2. Retrieved from <http://mesquiteproject.org> (accessed 1 January 2017).
- 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.
- Pennant, T. (1777). *A British Zoology* (136 p.). London: Benj. White.
- Pfenninger, M., & Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed amongst 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*, 49, 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). Germany: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., K€uhl, M., & Hoegh-Guldberg, O. (2000). Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature*, 408, 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 r€aumlicher Einnischung. *Verhandlungen Der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 79, 11–30.
- Sauer, K. P., M€uller, M., & Weber, M. (1986). Alloimmune memory for glycoprotein recognition molecules in sea anemones competing for space. *Marine Biology*, 92, 73–79.
- Schmidt, H. (1972). *Prodromus 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., & W€orheide, 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 hydromedusa, *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.
- Sole-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.
- Stephenson, T. A. (1935). *The British sea anemones* (Vol. II, 426 p.). London: The Ray Society.
- 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. (2000a). Cracks in the b-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. (2000b). 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 amongst 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, 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.

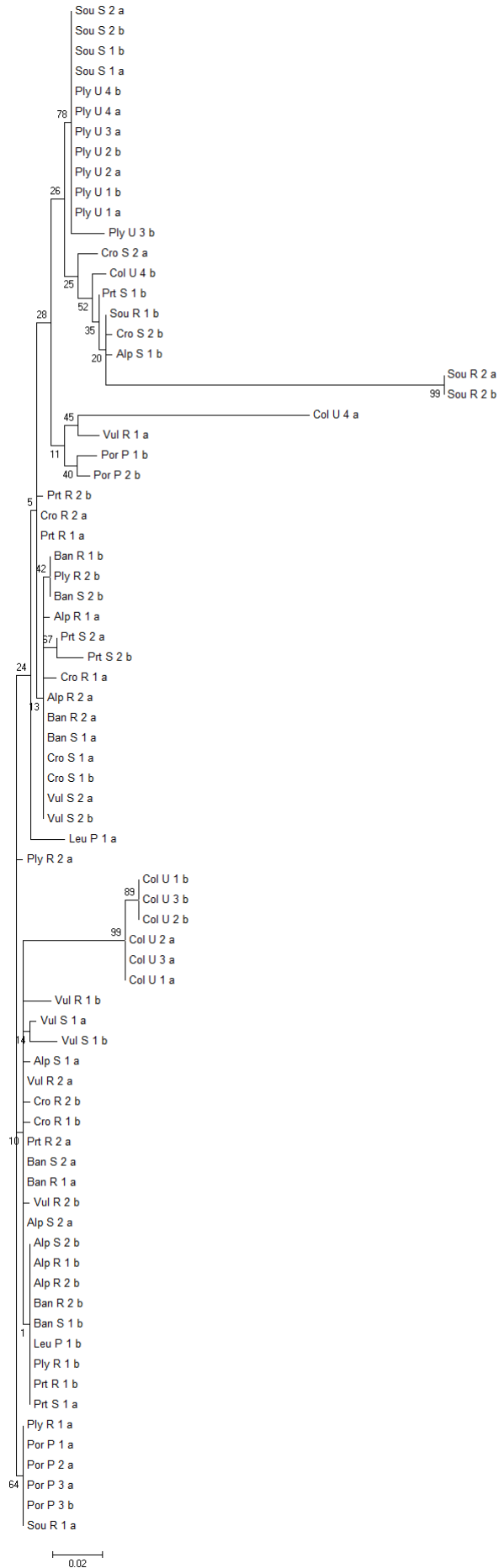
Zamer, W. E., & Mangum, C. P. (1979). Irreversible nongenetic temperature adaptation of oxygen uptake in clones of the sea anemone *Haliplanella Luciae* (Verrill). *The Biological Bulletin*, 157, 536–547.

Associate Editor: Andrea Waeschenbach

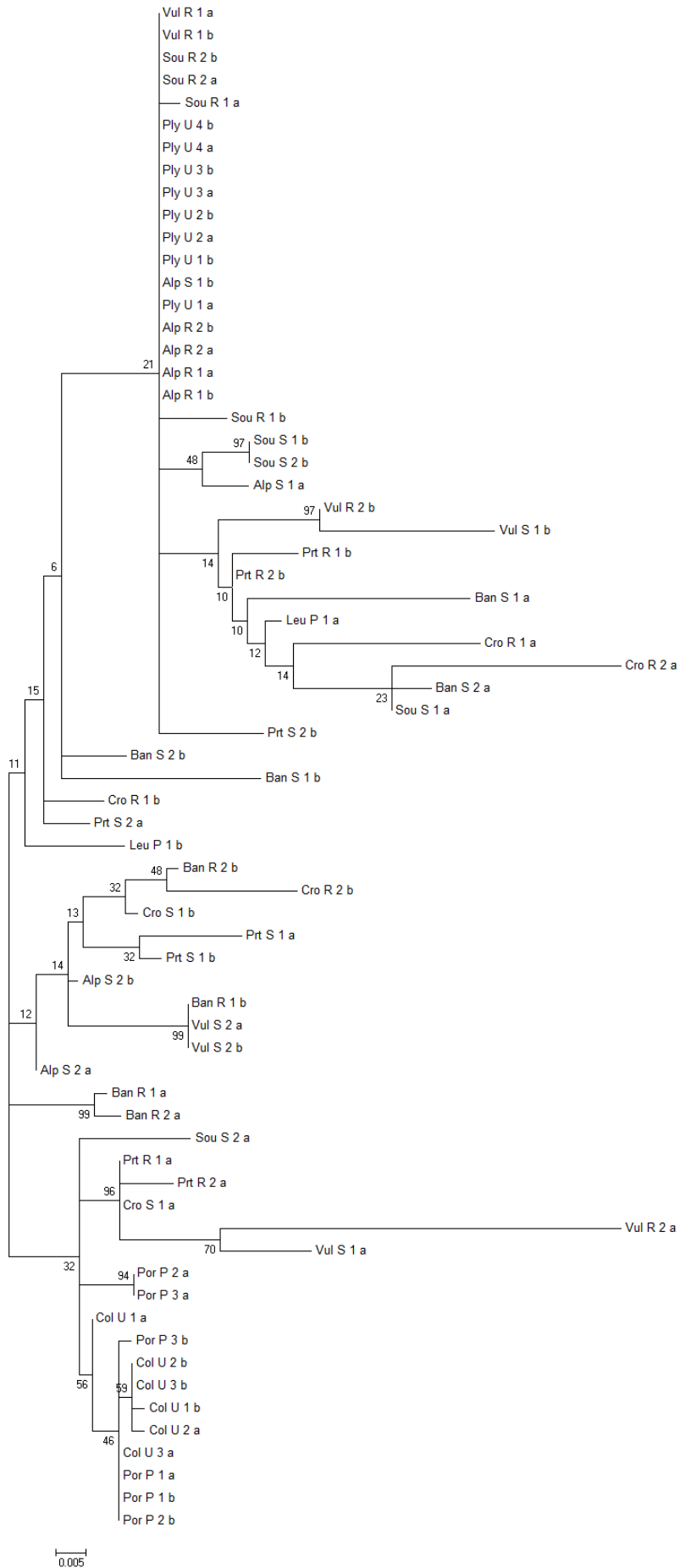
Supplementaries

Figure S1: 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).

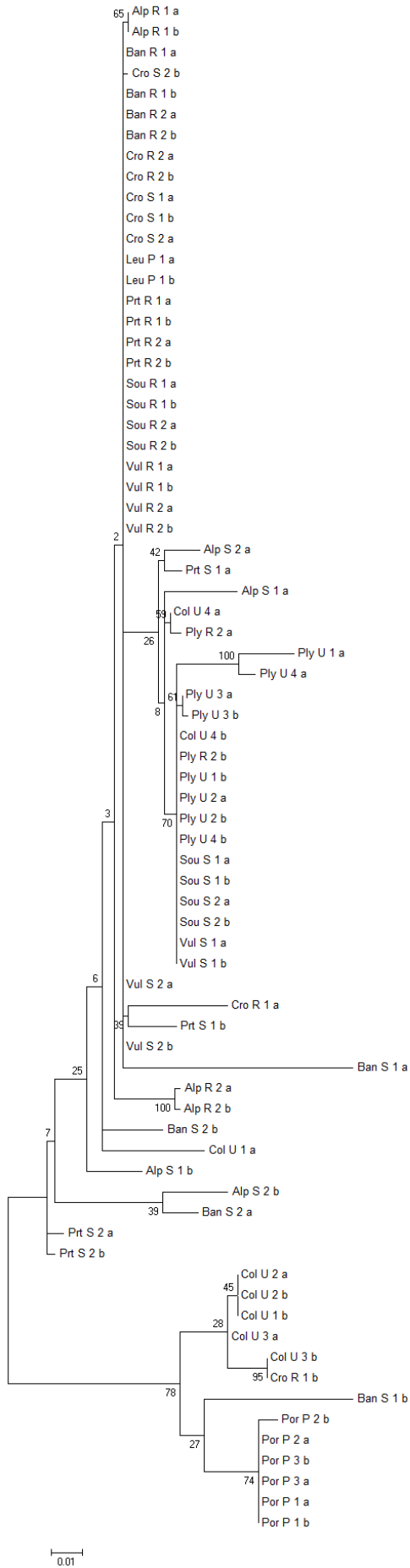
TyrK



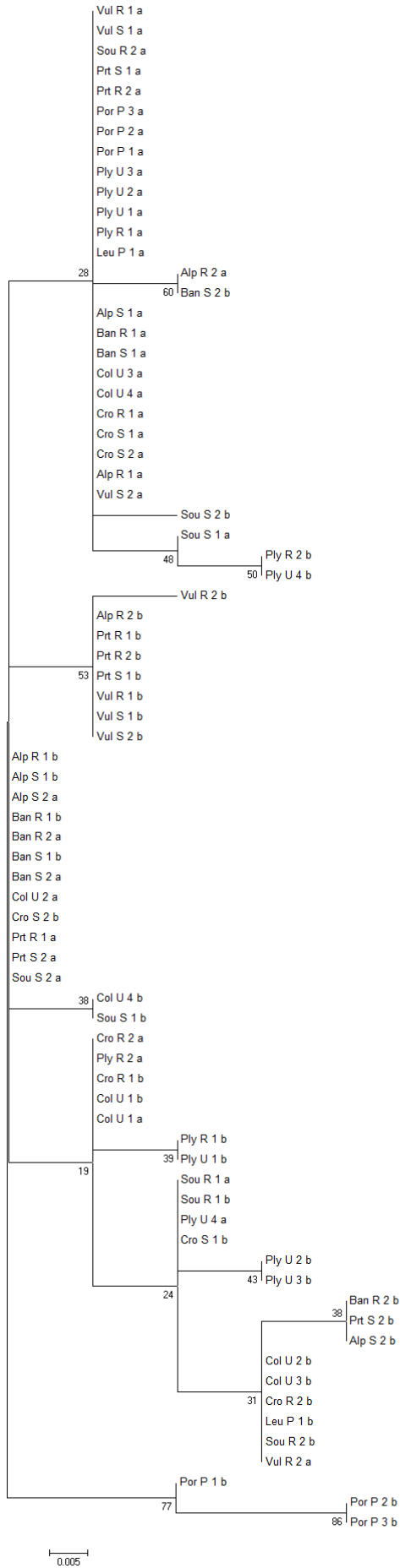
DUF140



RNAbinding5



CA2m



Sym32

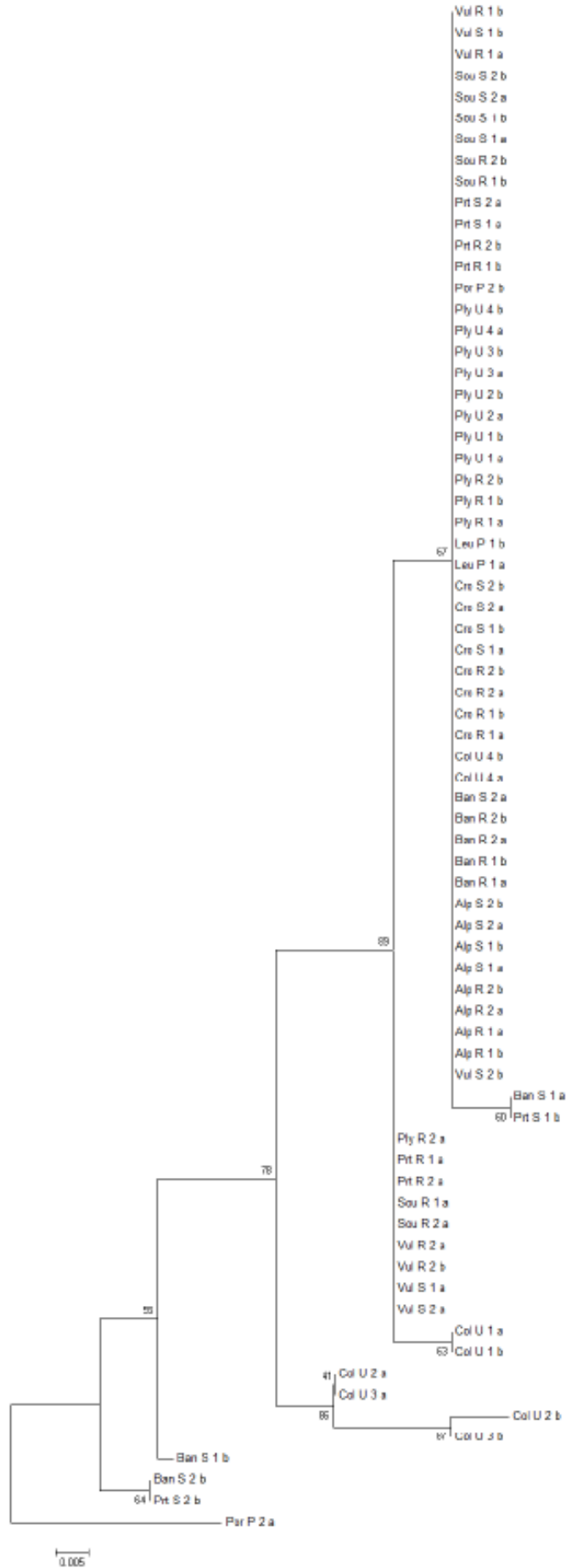


Table S1: Sampling Population details

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

Table S2: 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

Table S2: 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	pgen	pgen (fis)	Nb ramets	recounte r	psex reccounte r	psex(fis) reccounte r	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
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
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.; pgen, genotype probability assuming sexual reproduction; pgen (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; **psex reencounter**, probability of observing the number of repeated occurrences assuming sexual reproduction; **psex (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.

Table S2: 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

A2. The many faced symbiotic snakelocks anemone (*Anemonia viridis*, Anthozoa): host and symbiont genetic differentiation among colour morphs.

Heredity
https://doi.org/10.1038/s41437-019-0266-3

geneticsociety

ARTICLE



The many faced symbiotic snakelocks anemone (*Anemonia viridis*, Anthozoa): host and symbiont genetic differentiation among colour morphs

Barbara Porro ^{1,2} · Cédric Mallien¹ · Benjamin C. C. Hume ³ · Alexis Pey⁴ · Emilie Aubin^{1,5} · Richard Christen¹ · Christian R. Voelstra ^{3,6} · Paola Furla^{1,2} · Didier Forcioli^{1,2}

Received: 24 December 2018 / Revised: 30 July 2019 / Accepted: 15 August 2019
© The Author(s), under exclusive licence to The Genetics Society 2019

Abstract

How can we explain morphological variations in a holobiont? The genetic determinism of phenotypes is not always obvious and could be circumstantial in complex organisms. In symbiotic cnidarians, it is known that morphology or colour can misrepresent a complex genetic and symbiotic diversity. *Anemonia viridis* is a symbiotic sea anemone from temperate seas. This species displays different colour morphs based on pigment content and lives in a wide geographical range. Here, we investigated whether colour morph differentiation correlated with host genetic diversity or associated symbiotic genetic diversity by using RAD sequencing and symbiotic dinoflagellate typing of 140 sea anemones from the English Channel and the Mediterranean Sea. We did not observe genetic differentiation among colour morphs of *A. viridis* at the animal host or symbiont level, rejecting the hypothesis that *A. viridis* colour morphs correspond to species level differences. Interestingly, we however identified at least four independent animal host genetic lineages in *A. viridis* that differed in their associated symbiont populations. In conclusion, although the functional role of the different morphotypes of *A. viridis* remains to be determined, our approach provides new insights on the existence of cryptic species within *A. viridis*.

Introduction

The most straightforward way to recognize a species is from its morphological description. However, there are limits to

the applicability of this. Indeed, in several cases, different species have no distinguishing phenotypic features, leading to the concept of cryptic species (see for review Struck et al. 2018; Fišer et al. 2018). Many studies have shown that cryptic species are quite common in most of the animal phyla (Pfenninger and Schwenk 2007; Pérez-Ponce de León and Poulin 2016). In the marine realm, the number of described cryptic species has increased in the last years, thanks to new and diversified molecular approaches (see for review Pante Puillandre et al. 2015), but Appeltans et al. (2012) estimated that many species remain to be discovered.

These authors contributed equally: Barbara Porro, Cédric Mallien

These authors contributed equally: Paola Furla, Didier Forcioli

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41437-019-0266-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Barbara Porro
barbara.porro@hotmail.com

✉ Didier Forcioli
forcioli@unice.fr

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

² Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, 06107 Nice, France

³ Red Sea Research Center, Division of Biological and Environmental Science and Engineering, King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal 23955-6900, Saudi Arabia

⁴ THALASSA Marine research & Environmental awareness, 17 rue Gutenberg, 06000 Nice, France

⁵ Laboratoire Génome et Développement des Plantes—UMR CNRS/UPVD 5096, Université de Perpignan, 66860 Perpignan, France

⁶ Department of Biology, University of Konstanz, 78457 Konstanz, Germany

Introduction

The most straightforward way to recognize a species is from its morphological description. However, there are limits to the applicability of this. Indeed, in several cases, different species have no distinguishing phenotypic features, leading to the concept of cryptic species (see for review Struck *et al.*, 2018; Fišer *et al.*, 2018). Many studies have shown that cryptic species are quite common in most of the animal phyla (Pfenninger and Schwenk, 2007; Pérez-Ponce de León and Poulin, 2016). In the marine realm, the number of described cryptic species has increased in the last years thanks to new and diversified molecular approaches (see for review Pante, Puillandre, *et al.*, 2015), but Appeltans *et al.* (2012) estimated that many species remain to be discovered. The forces explaining the existence of cryptic species in some groups are not clear, but could be the result of low standing genetic variation or environmental/developmental constraints (see for review Struck *et al.*, 2018).

On the other hand, morphological polymorphisms could be due to phenotypic plasticity and response to a given environment (Price *et al.*, 2003). Many species transplant experiments have shown that the same genotype could generate different phenotypes depending on the environmental conditions (Merilä and Hendry, 2013). Those morphological variations among individuals could even be due to environmentally stabilized allelic polymorphisms, as in the well-known example of the peppered moth *Biston betularia* (Creed *et al.*, 1980), rather than to a loss of interfecundity among morphs.

In cnidarians, morphological variation is often a poor indicator of species divergence. Corals are especially well known to demonstrate extraordinary variation in ecomorphology that may or may not correspond well with the underlying genetic diversity (Veron and Pichon, 1976; Flot *et al.*, 2011; Schmidt-Roach *et al.* 2013). In addition, Schmidt-Roach *et al.* (2013) showed that depending on the molecular marker used, the

ecomorphs could be either grouped together or sub-divided. In sea anemones also, morphological traits are poor predictors of species delimitation (Rodríguez *et al.*, 2014). In the species *Actinia equina* (Douek *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2014) and *Phymanthus crucifer* (González-Muñoz *et al.*, 2015), phenotypic diversity was not strictly linked to genetic differences. Moreover, in the genus *Anthothoe*, Spano *et al.* (2018) recently identified the existence of several cryptic species not revealed by the characters used in morphological classification. In addition, many species of cnidarians live in symbiosis with intracellular photosynthetic dinoflagellates belonging to the family Symbiodiniaceae (LaJeunesse *et al.*, 2018) that play an important trophic role (Muscatine *et al.*, 1991) and could also influence the cnidarian phenotype. Indeed, it has been shown that in the coral *Madracis pharensis*, a correlation between the symbiont *Breviolum* sp. (formerly Clade B) present in the host cells and the colour morph of the host exists (Frade *et al.*, 2008). The authors suggested that this diversity in colour could be a functional response to light, thus demonstrating, the existence of putative strong links between host phenotype and symbiont population.

The sea anemone *Anemonia viridis* (Forskål 1775) is a conspicuous member of benthic communities throughout the Mediterranean Sea and from the Azores to the North Sea. It is among the largest sea anemones in the region and can form extensive aggregations of clonemates that can carpet the benthos. It thus plays an important role in shaping benthic community structure, as a dominant benthic predator in temperate habitats. *A. viridis* 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; Wiedenmann, Elke, *et al.*, 2000). The

taxonomic nature of these morphs have been debated for a long time and the functional role of the fluorescence is not elucidated in *A. viridis* yet. Recently, De Brauwer *et al.* (2018) suggested to use the fluorescence properties of coral reef fishes as a survey tool for cryptic marine species. Therefore, the hypothesis of the existence of a correlation between genetic differentiation and fluorescence among *A. viridis* morphs could be relevant. In the past, based on allozyme differentiation and presumed different reproduction strategies, some authors already raised the non-fluorescent var. *rustica* to species level, (Bulnheim and Sauer, 1984; Sauer, 1986; Sauer *et al.*, 1986). Furthermore, Wiedenmann *et al.* (1999) highlighted a differential bathymetric distribution of the var. *rustica* and var. *smaragdina* in the first two meters of depth, raising the question of the adaptive nature of the morphs. In our previous work (Mallien *et al.*, 2017), using Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) polymorphism analysis with relatively few EPIC loci ($n = 5$) for a relatively low number of individuals ($n = 34$), we did not detect any clear phylogenetic split among the morphs. However, our conclusions may have lacked the resolution needed to detect incompletely separated lineages. This last scenario will correspond to what De Queiroz (2007) defined as the “grey zone of speciation” where the level of population interconnectivity is decreasing leading to the build-up of independent genetic pools. This scenario could not be *a priori* excluded for the *A. viridis* colour morphs, but to evaluate such an ongoing split between emergent morph lineages, it is necessary to use more powerful molecular investigations than the ones we used previously. Consequently, here we have used a RADsequencing (RADseq) approach in order to generate several tens of thousands of genetic markers in a larger collection of individuals, a sampling scheme fit to uncover population level diversity patterns, species delimitation, and their phylogenetic relationships (Emerson *et al.*, 2010; Pante, Abdelkrim, *et al.*, 2015; Ree and Hipp, 2015). Moreover, previous studies investigating the nature of *A. viridis* morphs did not systematically consider *A. viridis* as a

holobiont. *A. viridis*' gastrodermal tissue harbours millions of dinoflagellate cells (Muscatine *et al.*, 1998; Suggett *et al.*, 2012; Zamoum and Furla, 2012; Ventura *et al.*, 2016) belonging to the family Symbiodiniaceae (LaJeunesse *et al.*, 2018) that live in a close trophic relationship (Davy *et al.*, 1996) and which are vertically transmitted (Schäfer 1984). The Symbiodiniaceae associated to *A. viridis* belong to the Temperate Clade A (LaJeunesse *et al.*, 2018; or A' *sensu* Savage *et al.*, 2002; and Visram *et al.*, 2006) presenting not only an intra-clade genetic diversity partially structured by host species but also an intra-host genetic diversity (Visram *et al.*, 2006; Forcioli *et al.*, 2011; Casado-Amezúa *et al.*, 2014). Among *A. viridis* morphs, no study provided a clear view of the symbiont genetic diversity distribution which could however be a driver of the morphological differentiation of *A. viridis* morphs.

In the present study, we tested for the existence of genetic divergence among the three most frequent *A. viridis* morphotypes var. *smaragdina*, *rustica* and *rufescens* using high throughput host genotyping by RADseq. In addition, we also tested for correlation between host morph and the genetic diversity of symbiont populations. This diversity was assessed using the rDNA ITS2 sequence variation, a known standard for Symbiodiniaceae diversity assessment, through a targeted sequencing approach and using two independent methods for the identification of the ITS2 variants; SymPortal (Hume *et al.*, 2019) and an *ad hoc* pipeline (D&S).

Materials and Methods

Sampling

We sampled 177 individuals of *Anemonia viridis* belonging to the three most frequent colour 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 sites are detailed in figure 1. For each specimen, a dozen tentacles were cut, fixed as soon as possible in 70% ethanol and preserved at -80°C until DNA extraction.

DNA extraction

All DNA extractions were performed as in Mallien *et al.* (2017) using a modified “salting out” protocol (Miller *et al.*, 1988). However, to test for Symbiodiniaceae DNA influence on RADseq efficiency, we isolated symbiont-free epidermal tissue of a tentacle from a subset of 63 samples following Richier *et al.* (2003) and performed DNA extraction on this tissue fraction following the same procedure. This allowed us to compare the yield in total RADseq loci among symbiont-rich and symbiont-poor samples to infer the impact of Symbiodiniaceae DNA contamination. Extracted DNA concentrations were determined using Quant-it Picogreen kit (Invitrogen).

Host RADsequencing and genetic analyses

Library preparation

For this study, libraries were prepared following Etter *et al.* (2011) with these modifications: (i) DNA extracts were classified depending on DNA degradation (measured by electrophoresis of the total DNA) and symbiont contamination level (measured by PCR using Symbiodiniaceae cp23S specific primers from Santos *et al.* (2003)) and split into 9 libraries containing between 32 and 44 individuals; (ii) libraries were constructed using 0.6 to 1 µg of DNA per individual digested by PstI-HF enzyme (New England Biolabs), and ligated to sample specific RADseq adapters; (iii) each pooled library was 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 RADseq loci identification

Raw sequence 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 turned out almost unamplified and were consequently discarded from the subsequent 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 to a dataset of 137 *A. viridis* individuals (25 from var. *rufescens*, 48 from var. *rustica*, 64 from var. *smaragdina*) and three *P. cinerea* individuals (see figure 1 for their geographical origin). The iPyRAD loci were further 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 allowed us to define a first total dataset,

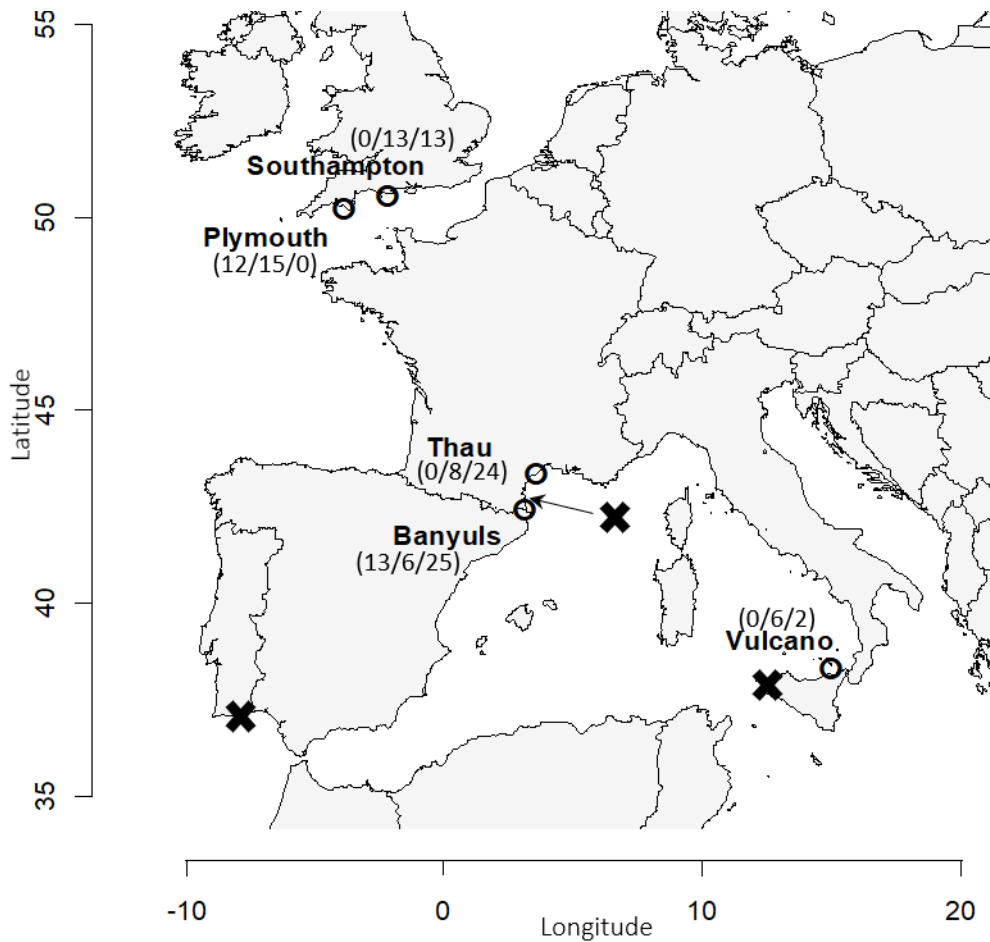


Figure 1: Sampling sites of the N140 dataset in the Mediterranean Sea (Vulcano: 38°21'14"N 14°59'22"E; Thau lagoon: 43°23'32.82"N 3°36'1.43"E; Banyuls: 42°28'50"N 03°07'50"E) and in the English Channel (Plymouth : 50°16'40"N 03°54'49"W; Southampton: 50°36'38.16"N 02°8'3.252"W). The brackets indicate the number of sampled individuals per site per morph (var. *rufescens*/ var. *rustica*/ var. *smaragdina* respectively). The black crosses mark the three sampling sites for the three *P. cinerea* individuals.

N140, of 140 individuals (137 *A. viridis* and 3 *P. cinerea* anemones), containing a total of 45519 SNPs.

We verified the distribution of the missing data within this 140 host individuals' dataset by computing the proportion of shared loci between all the pairs of individuals in R using the package RADami (Hipp, 2014). This analysis led to the selection of a subset of 85 individuals (N85 dataset) with an average of 5% of missing data. The distribution of missing data was represented with a heatmap using R (figure S1).

Host phylogeny

An individual based tree was built for the N140 dataset using RAxML v8.2.4 (Stamatakis, 2014), from the phylip output of iPyRAD, using a GTR+ Γ nucleotide substitution model and bootstrap support was estimated from 100 replicates. Mega v6.06 (Tamura *et al.*, 2013) was used to visualize the output of RAxML.

Clonality test

Considering the propensity for clonal reproduction of *A. viridis* (Wiedenmann *et al.*, 1999; Wiedenmann, Kraus, *et al.*, 2000; Mallien *et al.*, 2017), we determined the putative presence of clonal lineages within host samples. Since all the individual RADseq genotypes we obtained were different, the classical way of identifying

clonal genets through the detection of repeated multi locus genotypes was not applicable. Instead, using the R package RClone (Bailleul *et al.*, 2016), we computed between individuals pairwise genetic distances keeping only SNPs present in all individuals in the N85 dataset (396 SNPs). These distances were computed at the level where recombination would be expected to occur that is within each of the secondary hypothesis species that we obtained after a first run of SVDquartets on the N140 dataset (see below). The observed distributions of pairwise genetic distances thus obtained were compared each to a simulated distribution of expected genetic distances under the assumption of purely sexual reproduction (with or without inbreeding) computed with RClone. This allowed us to define for each SVD clade a threshold pairwise distance value that we used to affect individuals to clonal lineages (MLL) using the function `mlg.filter` from the R package `poppr` (Kamvar *et al.*, 2014). Keeping only one ramet per genet, this led us to the definition of a 109 individuals dataset (N109). To test for an effect of clonality on species delimitation, SVDquartets, `snmf` and BFD* analyses were performed as well on this non clonal dataset (see below).

Host species delimitation

To construct species hypotheses within *A. viridis*, we first performed a taxonomic partitioning from the N140 and the N109 datasets 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 and uses this information to build the species tree. *P. cinerea* individuals were identified as outgroups. We performed a 500 bootstrap replicate analysis for each dataset. We considered the strongest monophyletic clades identifying at least the expected split between Mediterranean and English Channel individuals as possible species hypothesis to test. To validate these hypotheses, we also

performed a quantitative genetic clustering by computing individual ancestry coefficients in the N109 dataset using the `snmf` function from the LEA R package (Frichot and François, 2015). This function allows for the identification of population structure in a way similar to STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) and ADMIXTURE (Alexander *et al.*, 2009) analysis, but in a more efficient way (Frichot *et al.*, 2014). First, the optimal number of clusters (identified as ancestral populations, K) from which the individuals in the dataset could be traced back was determined using an entropy criterion. The admixture coefficient among these K clusters was then estimated for each individual, using sparse non-negative matrix factorization (`snmf`) (Frichot and François, 2015). The result was visualized using a STRUCTURE-like representation showing, for each individual, the contribution of each cluster to its multilocus genotype.

We then compared our primary species hypothesis (the three morphs as species, irrespective of the geographical origins of the individuals) to the secondary species hypothesis obtained with SVDquartets and `snmf`. We also compared the SVD clades/`snmf` clusters to another, more geographically based, primary species hypothesis in which the two non *rufescens* Mediterranean SVD clades/`snmf` clusters were lumped together. These species delimitation hypotheses were tested using BFD* (Leaché *et al.*, 2014). In order to manage computing times, these analyses were performed using only a subset of non clonal individuals representing most of the genetic diversity from the N85 dataset (see table S1) and a set of 1000 filtered biallelic SNPs (no missing data, minor allele frequency 0.1). The BFD* analysis were performed in BEAST2 (Bouckaert *et al.*, 2014) with 48 path sampler sets of 100000 MCMC repetitions, a 10% burnin to sample in 1000000 MCMC iterations of SNAPP (Bryant *et al.*, 2012). The number of SNAPP iterations was chosen to ensure proper convergence of the species tree inference. The parameters for the BFD* analysis were chosen following the recommendations of the 2018 version of the BFD* tutorial

(<https://github.com/BEAST2-Dev/beast-docs/releases/download/v1.0/BFD-tutorial-2018.zip>), that is mutation rates priors set to 1, coalescent rate sampled from the data, and a fixed prior value of the speciation rate Lambda estimated as stated in the document table.

The Wright's F-statistics among and within populations, along with basic diversity indices, were computed using the R package hierfstat (Goudet and Jombart, 2015). These statistics were calculated on the N109 dataset for the SVD clades/snmf cluster.

Temperate clade A Symbiodiniaceae ITS2 and genetic analyses

Amplification and sequencing of the rDNA ITS2

To infer the genetic diversity of the temperate clade A Symbiodiniaceae populations, the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) region was amplified by PCR using the primers from Stat *et al.* (2009): the forward `itsD` (5'-GTGAATTGCAGAACTCCGTG-3') and the reverse `its2rev2` (5'-CCTCCGCTTACTTATATGCTT-3').

PCR amplifications of the ITS2 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

The aim here was to build a catalogue of all Symbiodiniaceae ITS2 sequences out of the sequencing background noise for each host sea anemone. To do so, we tested two different ITS2 genotyping pipelines: one based on the depth (*i.e.* number of reads) and the sharing of the variants among individuals (identified as D&S pipeline in the rest of the article), and another based on minimum entropy decomposition (MED) algorithm (Eren *et al.*, 2015) and referred to as the SymPortal pipeline in the remainder of this article (Hume *et al.*, 2019; Hume, 2019).

The D&S pipeline consisted in assembling forward and reverse reads using OBITools scripts (Boyer *et al.*, 2016). We then aligned the assembled reads to a temperate A reference ITS2 sequence obtained in the laboratory, using BWA MEM v0.7.12-5 (Li, 2013). To separate the real ITS2 alleles from sequencing errors in the reads which mapped to the reference, we used a three-step protocol (table S2). For the first step, we clustered the reads across all samples at a threshold of 80% of identity among the reads, and we conserved only clusters which contained more than 5% of the total number of reads to exclude the rarest sequences, most likely sequencing errors. For the second step, we pooled all the sequences that passed the first step and applied a second clustering identity threshold of 100% to identify unique sequences. Finally, a last step was necessary to determine which unique sequence was a valid ITS2 variant and not background sequencing noise. For this, we considered (i) the number of hosts harbouring a given unique sequence (with a minimum of two individuals) and (ii) the median number of reads per host for this unique sequence, to set up a validation threshold as follows:

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

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 it was found. This dataset was identified as the T50 dataset.

For the second pipeline, the MED algorithm implemented in SymPortal (Hume *et al.*, 2019; Hume, 2019) was used. In the MED algorithm (Eren *et al.*, 2015), the most variable positions in the sequences (those with the highest Shannon's entropy value forming an entropy peak) were used to split the dataset and decompose it into more homogeneous groups within the symbiont population of each animal host. At each step of decomposition, if there are still entropy peaks in the entropy profile of the dataset, the dataset is sub-split depending on the identified variable position, otherwise the algorithm stops. The number of homogeneous groups (or MED nodes) obtained thus corresponded to the biologically informative ITS2 sequence

variants within each animal host (see Hume *et al.*, 2019 for a more thorough description of SymPortal). We used SymPortal up to this step to obtain a dataset comparable with the D&S pipeline previously described. This dataset was identified as the SP dataset.

ITS2 diversity

To visualise the diversity of the ITS2 variants, we built an ITS2 median joining network (Bandelt *et al.*, 1995, 1999) for each pipeline, using SplitsTree (Huson and Bryant, 2006). PopART v1.7 (Leigh and Bryant, 2015) was used to calculate the nucleotide diversity (π) among the sequences obtained by the both pipelines.

Measure of the differentiation among symbiont populations

Each sea anemone hosts up to one million *Symbiodinium* cells per cm² of tissue (Suggett *et al.*, 2012), and therefore constitutes a pooled sample of symbionts. Because we could not estimate properly the number of symbionts per anemone in our samples, we considered the presence (1) or the absence (0) of each ITS2 variants rather than its number of reads in each individual. Consequently, the genotype of each symbiont population was coded as for binary haploids.

We tested the differences in the composition of symbiont populations among sea anemones depending on (i) the morph of the host, or (ii) the host genetic lineages by PERMANOVA using Jaccard's distance (based on presence/absence of variants) over 9999 permutations 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 an FDR correction to avoid false positives.

Results

Host species delimitation

The analysis of sequences obtained by RADseq, as described in the Materials and Methods, allowed the identification of an average of 33 407 \pm 1162 SE RADseq loci (with a minimum number of SNPs of 4 214 up to 45 447 for the maximal value) per animal host individual.

As there is still no reference genome either for *Anemonia viridis* nor for the Symbiodiniaceae Temperate clade A, there was no efficient way to filter symbiont contamination from the obtained RADseq loci. However, the symbiont-poor samples obtained from the epidermal DNA extracts displayed significantly more RADseq loci (N=65, 57 696.26 \pm 25 693,28 loci) than the symbiont-rich samples obtained from both the epidermal and the gastrodermal DNA extracts (N=116, 29 720.77 \pm 30 948.38 loci) (Student *t* test *p* value = 9,58 10⁻¹⁰), even if they contained less DNA per extract (N=65, 56.52 \pm 28.65ng/ μ L vs N=116, 122.30 \pm 56.62 ng/ μ L, Student *t* test *p* value = 5,42 10⁻²⁰).

After the different filtering steps, these RAD loci provided 45 519 bi-allelic SNPs shared by at least 70% of the 140 selected individuals. The missing data were not structured by host populations but depended on the quality of DNA extracts (figure S1). On the full dataset, we computed a global F_{st} and a F_{is} of 0.38 and 0.37, respectively.

To measure the actual genetic differentiation among host individuals, we computed a

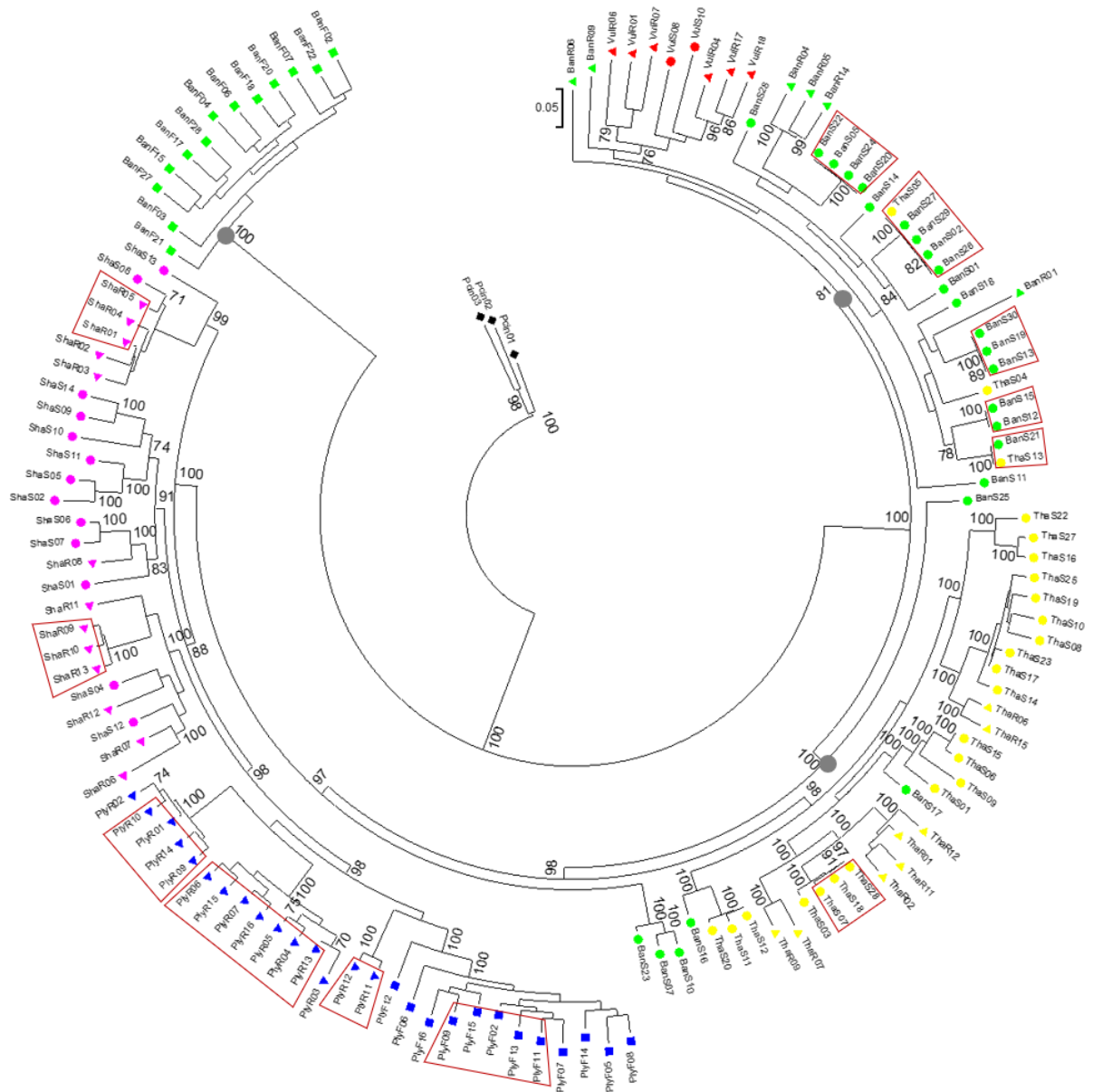


Figure 2: Animal host RAD differentiation at the individual level. Maximum likelihood phylogeny of the N140 dataset using RAxML with GTR+ Γ model of evolution and 100 bootstrap replicates. For each individual, the origin is coded by colour (red: Vulcano, orange: Thau, green: Banyuls, blue: Plymouth, pink: Southampton 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*). The outgroup *P. cinerea* is marked by a diamond symbol. The individuals falling in the same MLL are boxed in red.

RAxML individual tree on the N140 dataset (figure 2). The outgroup *P. cinerea*, which was well differentiated from *A. viridis* was used to root the tree. We identified three monophyletic clades in *A. viridis* (grey circles on the figure 2): the first clear split separated the sea anemones var. *rufescens* from Banyuls from the other individuals, then a Mediterranean clade with sea anemones mostly from Banyuls and Vulcano was separated from a clade with the English Channel and Thau sea anemones (each with bootstrap values higher than 80%).

Some of the individuals did cluster very closely in this RAxML tree. We therefore tested for the occurrence of clonal lineages in the N85 dataset that was the most relevant to detect extremely close RAD genotypes, as it contained very few missing data. Rclone (Bailleul *et al.*, 2016) simulations allowed us to identify individuals that, although genetically different, were too genetically close to be issued from sexual recombination (figure S2). Several clonal lineages (MLLs) were thus identified: five (of respectively 2, 2, 3, 4 and 5 individuals) were found among

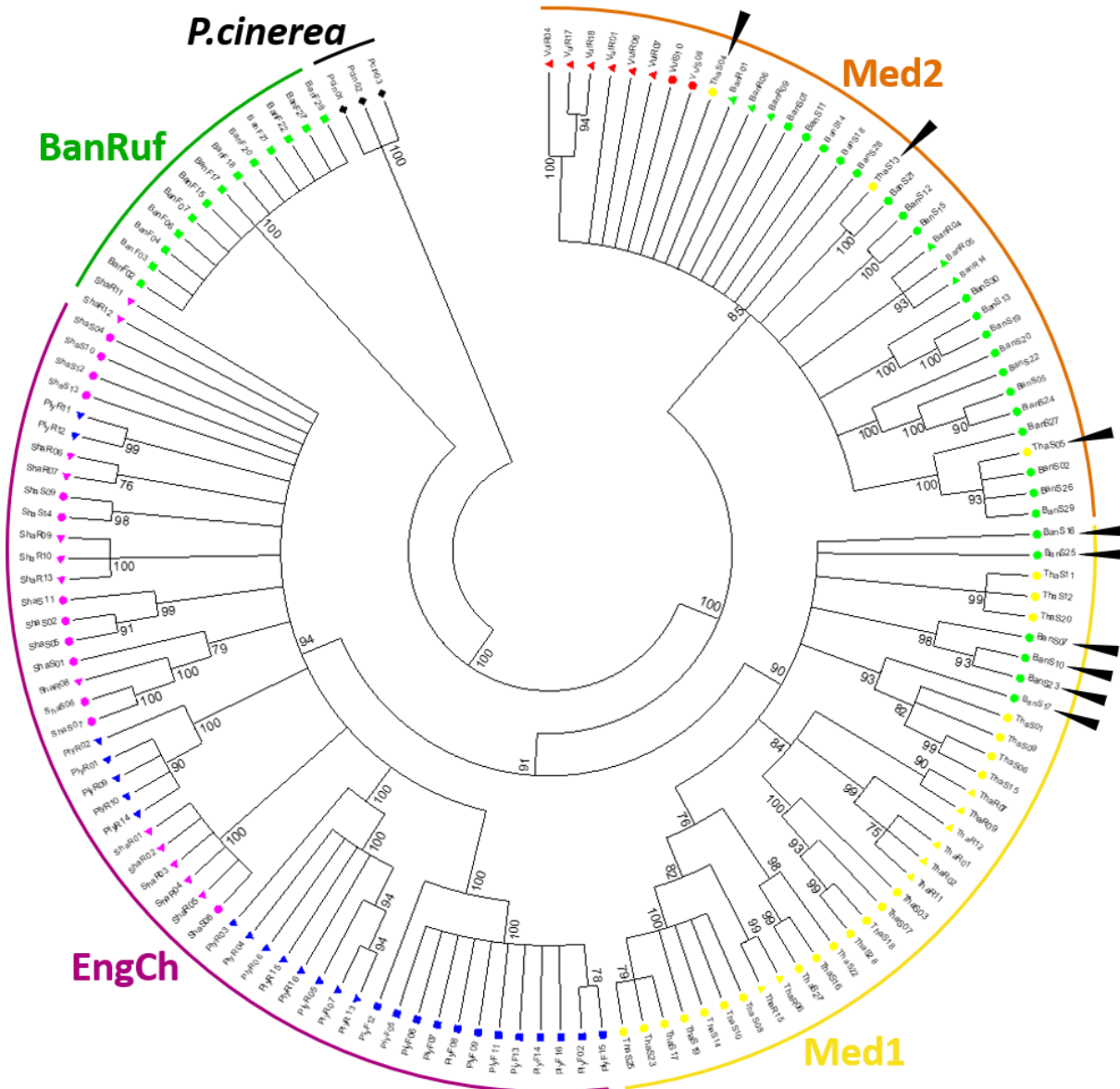


Figure 3: Non-Bayesian taxonomic partitioning among *A. viridis* morphs (SVDquartets analysis on the N140 dataset) at the individual level. Support values at the nodes are shown only if equal or superior to 70%. The coloured bars correspond to the five identified clades (i) *P. cinerea* (black), (ii) BanRuf (green), (iii) English Channel (EngCh, purple), (iv) Med1 (yellow), (v) Med2 (orange). The black arrowheads point to the sea anemones from Banyuls attributed to the Med1 clade and to the Thau sea anemones attributed to the Med2 clade.

non var. *rufescens* individuals from the Banyuls sampling site, one of three individuals in Thau, two of three individuals each in Southampton and four in Plymouth (of 2, 4, 5 and 7 individuals). The var. *rufescens* individuals were very likely the products of sexual reproduction (figure S2). Keeping only one individual per clonal genetic lineage (*i.e.* one ramet per genet), we thus obtained the N109 dataset on which we checked the species hypotheses formulated on the N140 dataset.

To formulate secondary species hypotheses from these data, we used SVDquartets to produce a coalescent taxonomic partitioning from the N140 dataset (figure 3) and N109 dataset (figure S3) and snmf clustering on the N109 dataset (figure 4).

For the SVDquartets analyses, as in the RAxML tree, the *P. cinerea* individuals were separated from *A. viridis* and formed an independent clade. Then the first split among *A. viridis* separated with high support the var. *rufescens* anemones from Banyuls and all the other anemones, forming the BanRuf

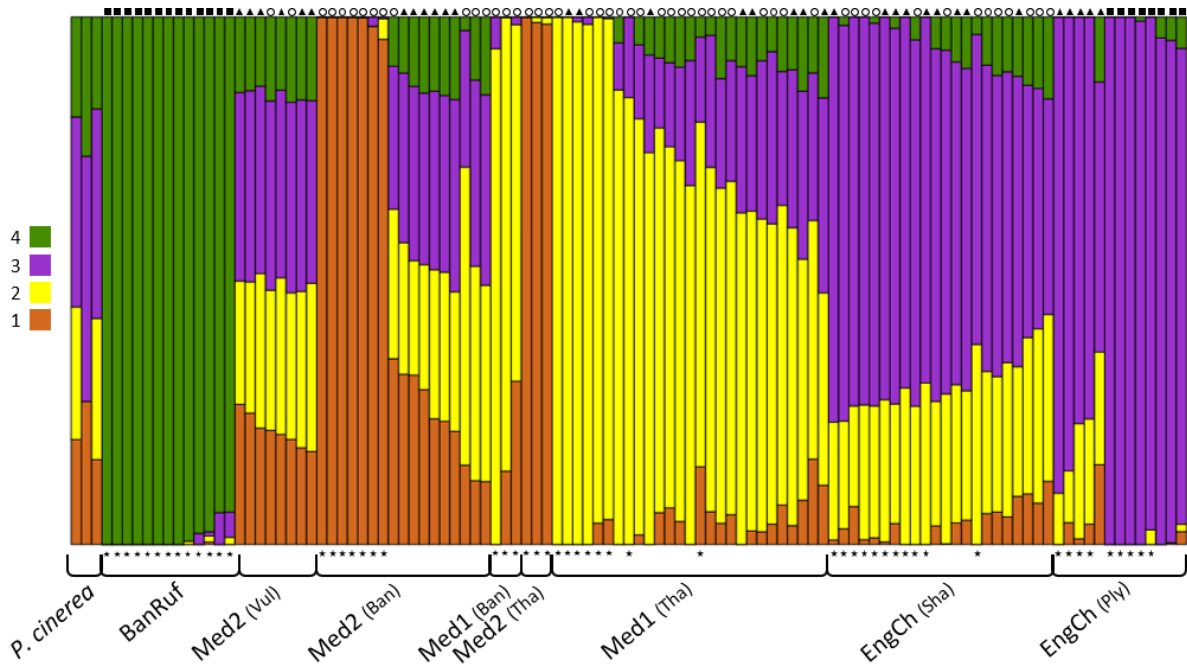


Figure 4: snmf clustering on the N109 dataset: The probabilities of attribution to the most probable K=4 clusters or ancestral populations are displayed in a bar plot for each individual. The morph of *A. viridis* sea anemones is coded by the shape above the diagram (triangle: var. *rustica*, circle: var. *smaragdina*, square: var. *rufescens*). The individuals kept in the N85 dataset are identified by black stars below the diagram. The sampling sites are detailed in brackets (Vul: Vulcano, Ban: Banyuls, Tha: Thau, Sha: Southampton, Ply: Plymouth). The 4 clusters are identified by the colours of the corresponding SVD clades.

clade. These individuals from Banyuls were in fact as divergent as the outgroup (100% of the quartets including var. *rufescens* anemones from Banyuls supported this split). In addition, two clades were identified, one grouping the other Banyuls individuals and the Vulcano ones, that we named the Med2 clade, and the second grouping individuals from the English Channel and Thau. This last clade was further split in two by SVD quartets separating English Channel populations (EngCh clade) from Thau (Med1 clade). The BanRuf, Med1 and Med2 SVD clades can be found in sympatry: the three have been sampled in Banyuls (6 var. *smaragdina* Banyuls individuals belonged to the Med1 clade), and the Med1 and Med2 clades have been sampled in Thau (3 var. *smaragdina* Thau individuals were attributed to the Med2 clade). These few rare individuals that did not belong to the locally more frequent clade are identified by arrowheads in figure 3.

These SVD clades were retained in the analysis of the MLL pruned N109 dataset (figure S3).

To validate these SVD clades as secondary species hypotheses, we also performed a quantitative genetic clustering by snmf (Frichot and François, 2015). We determined K = 4 as the optimal number of genetic clusters in this dataset, based on the minimum value of cross-entropy (figure S4). For the individuals with less missing data (marked with stars in figure 4), the snmf clustering was in complete accordance with the SVD clades. On the other hand, most of the individuals with too much missing data had similar probabilities of attribution to all four

Table 1: PERMANOVA analysis of the differentiation and partitioning of the Temperate Clade A T50-ITS2 diversity in *A. viridis*

	df	Sums of squares	F	R ²	P(>F)
Among Morphs	2	0.779	1.2732	0.02325	0.0764
Residual	107	29.974		0.89478	
Total	109	33.499		1	
Among Host genetic lineage	3	2.329	2.6416	0.06952	0.0001
Among Morphs within Host genetic lineage	4	1.196	1.0175	0.05117	0.0031
Residual	102	29.974		0.89478	
Total	109	33.499		1	

The values in bold are statistically significant with p-value < 0.05.

Table 2: PERMANOVA analysis of the pairwise differentiation and partitioning of the Temperate Clade A T50-ITS2 diversity among *A. viridis* genetic lineages

	F	R ²	Adjusted p-value
BanRuf vs EngCh	2.738076	0.04742236	0.003
BanRuf vs Med1	1.844418	0.06870769	0.0156
BanRuf vs Med2	1.013963	0.03071315	0.439
EngCh vs Med1	2.166855	0.02844879	0.0003
EngCh vs Med2	4.364921	0.0511325	0.0003
Med1 vs Med2	2.225183	0.04180696	0.0066

The values in bold are statistically significant with p-value < 0.05. The p-value was adjusted with an FDR correction

clusters (figure 4), showing the impact of low data quality on this analysis.

In individuals with high quality data, snmf clustering can be used to measure introgression (Frichot and François, 2015). The *a priori* most likely introgressed individuals, *i.e.* the var. *smaragdina* from Thau lagoon belonging to the Med2 clade/cluster and the ones from Banyuls belonging to the Med1 clade/cluster (identified by arrowheads in figure 3 and identified as Med2(Tha) and Med1(Ban) respectively on the figure 4), had coancestry patterns similar to those of anemones from the same cluster. However, whereas no admixture was detected in the Med2(Tha) individuals, the Med1(Ban) individuals were weakly introgressed by Med2 genetic background (figure 4). Likewise, the BanRuf clade corresponded to a homogenous cluster

different from the other clusters, and notably from the others found in Banyuls.

The SVD clades/snmf clusters are the best secondary species hypothesis as shown by the Bayes Factor comparisons following BFD* computations (table S3). Splitting the individuals according to their SVD clades/snmf clusters is decisively better than splitting them either by their morphs or by their sampling region. Hence, we identified five clear independent genetic lineages in the dataset: (i) the outgroup *P. cinerea*, and among *A. viridis* samples (ii) the var. *rufescens* individuals from Banyuls (BanRuf), (iii) English Channel populations (EngCh), and two main Mediterranean groups (iv) one with mostly anemones from Thau lagoon (Med1), and (v) one with mostly sea anemones from Banyuls and Vulcano (Med2). These lineages harboured the same level of diversity and all displayed a marked deficit in heterozygosity (table S4).

Influence of the symbiont on morphs differentiation

The analysis of the ITS2 sequences, following the D&S pipeline, allowed the identification of 92 ITS2 sequence variants (T50 dataset) from the populations of *A. viridis* symbionts (figure S5.A, table S2). Most of the sampled populations harboured more than half of this allelic diversity: between 44 and 91 alleles were present within each host genetic lineage (table S4, T50 dataset). Similarly, each anemone harboured on average 32.4 ± 1.6 ITS2 variants. The most abundant variant was harboured by 95% of the animal hosts (figure S5.A). There was a low divergence among the ITS2 sequences, 90% of them were one substitution away from the most frequent one and the nucleotide diversity was $\pi=0.0117$. *P. cinerea* harboured less variants than *A. viridis* (twelve alleles from three individuals, table S4) but all the sequence variants found in *P. cinerea* were also found in *A. viridis* (figure S5.A).

There was no statistically significant differentiation of the symbiont populations among the three morphs (table 1). As host independent genetic lineages were identified (figure 3 and table S3), we tested the differentiation in symbiont populations and the ITS2 composition of these populations among genetic lineages and among morphs nested within these lineages. These analyses revealed an influence of the genetic lineage on the symbiont populations (table 1). The pairwise comparisons highlighted a difference among EngCh and Mediterranean lineages, and also between Med1 and Med2 (table 2). A weak difference between BanRuf and Med1 was detected (table 2). Within these lineages, we detected a differentiation among morphs in symbiont content (table 1). However, the morphs were not systematically differentiated within all lineages but only within the Med2 lineage (PERMANOVA comparisons table S5).

To validate this image of symbiont differentiation, we also used the MED algorithm implemented in SymPortal to identify the ITS2 sequence variants by an alternative method (SP dataset). We obtained

93 ITS2 variants in 106 animal hosts. 39 of these variants were common with the T50 dataset (grey circles on the figure S5). The different populations harboured four to 23 variants out of the 93 identified (table S4, SP dataset), with an average of 4.17 ± 0.2 variants per sea anemone. The most frequent variant was harboured by 97% of the anemones and the ITS2 sequences were less divergent than the sequences obtained with D&S pipeline ($\pi = 0.0019$). *P. cinerea* was also less diverse than *A. viridis* and again did not harbour any unique ITS2 variant.

In agreement with the SP dataset, the var. *smaragdina* and *rustica* shared the same symbiont ITS2 diversity (table S7). By contrast, the var. *rufescens* individuals were differentiated for their symbiont content (table S7) which led to an overall statistically significant differentiation among morphs (table S6). It should however be noted that all the var. *rufescens* anemones did not share a common symbiont pool, as the English Channel var. *rufescens* individuals were more differentiated from Mediterranean var. *rufescens* individuals than from individuals belonging to the other morphs (table S8). Indeed, the composition of symbiont populations was correlated to the host genetic lineages independently of the morphs (table S6). The pairwise analysis of the SP-ITS2 variants among *A. viridis* lineages showed that the EngCh lineage was different from the Mediterranean ones and that Med1 and Med2 were different from each other (table S9). No difference between BanRuf and Med1 lineages has been detected with the SP-ITS2 variants. Moreover, no effect of the morphs was detected within lineages with the SP dataset (table S6).

Discussion

NGS data validation

Symbiont contamination among host RADseq loci

One of the major concerns when working on symbiotic organism is separating the effects

due to each of the partners. This is all the more true when using reduced representation sequencing to measure the genetic diversities of the host and symbionts separately without reference genomes. However, in symbiotic hexacorals, as the sequencing depth is usually tailored for the host, it results in an under sampling of the bigger symbiont genome, and therefore, an even modest filtering on missing data yields a very low Symbiodiniaceae contamination in the final set of loci (Bellis *et al.*, 2016, Titus and Daly, 2018). Moreover, the size of *A. viridis* tentacles allowed us to efficiently dissect the symbiont-free epidermis from the symbiont rigged gastrodermal cell layer in fresh or properly preserved samples. In the epidermis fraction, Symbiodiniaceae contamination at the protein level was estimated at a mere 3% (Richier *et al.*, 2003). This probably explains the fact that the mean number of RAD loci per individual we obtained after filtering on missing data was significantly lower in symbiont-rich DNA extracts (from whole tentacles), although they contained more DNA than the symbiont-poor DNA extracts (from epidermis only). The lower yield of the symbiont-rich extracts probably reflects the contamination dispersion effect as described by Titus and Daly (2018).

Moreover, in the subsequent analysis, symbiont-rich and symbiont-poor samples did finally belong to the same lineages. Additionally, the BanRuf lineage that was the most divergent on host RADseq (figure 2) did not contain a divergent ITS2 symbiont population (tables 2 and S9). Although we cannot exclude that a few of the loci among the tens of thousands per individual we obtained could be Symbiodiniaceae loci, we are therefore quite confident that the RAD genotypes reflect the host's genetic diversity and not the symbiont's.

Pipelines for the identification of symbiont ITS2 sequence variants

To detect intra-cladal/generic diversity, we used sequencing of ITS2 amplicons, now a standard method for genotyping Symbiodiniaceae populations (Quigley *et al.*, 2014; Arif *et al.*, 2014; Batovska *et al.*, 2017;

Bonthond *et al.*, 2018). An Operational taxonomic units (OTU) approach is commonly used to filter and quality check the huge quantity of raw data obtained by NGS. OTUs are identified by a clustering approach of the variant sequences, at for example a 97% similarity threshold (Arif *et al.*, 2014). . However, such a 97% cut-off would miss most of the intra-cladal/generic Symbiodiniaceae diversity. To overcome that issue, we used two different pipelines generating catalogues of ITS2 sequence variants: one based on sequencing depth and shared occurrence of variants among individuals, D&S, that we developed (generating T50 dataset) and the other based on the MED algorithm applied within animal hosts, implemented in SymPortal (Hume *et al.*, 2019) (generating the SP dataset). Through the D&S and SP pipelines, we identified 92 and 93 ITS2 sequence variants, most of which were identical between both pipelines. In fact, the two datasets differed mainly in two ways: they did not detect the same rare sequence variants (figure S5) and the SymPortal pipeline conserved less sequences per animal host (table S4). These differences are due to the different rationale of the two pipelines: to identify ITS2 sequence variants, one works over the whole dataset (D&S pipeline) whereas the other works within individuals (SymPortal pipeline). Cuning *et al.* (2017), using an OTU based approach, did also obtain different images of the same raw diversity whether they applied a 97% identity threshold over their whole dataset or within individuals.

Obviously, a large part, or even the majority, of this detected genetic diversity probably corresponds to multi-copy intragenomic ITS2 variants, considering the number of sequence variants we obtained within each host individual (Sampayo *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2017). However, these intragenomic variants can be used to better define the Symbiodiniaceae lineages harboured by the hosts, this is even the very goal of the SymPortal pipeline (Hume *et al.*, 2019) But, in order to be able to use this information, SymPortal relies on the assumption that majority of hosts harbours a single dominant genetic strain per symbiont genera.

Considering that in the Mediterranean Sea, the previously observed genetic diversity corresponds to within clade/genera diversity (Forcioli *et al.*, 2011) it seems that this basic assumption may not be respected. The dearth of Symbiodiniaceae Temperate Clade A ITS2 sequences in SymPortal database so far precludes a formal test of this hypothesis. Further analyses could however be done using single copy markers (as psbA sequences LaJeunesse and Thornhill, 2011). By consequence, we chose to use the observed ITS2 sequence diversity as a fingerprint of the symbiont population content, without further tentative to sort intragenomic variation from among strains differentiation.

Absence of genetic differentiation among the morphs of *Anemonia viridis*

In the present study we investigated whether the different *A. viridis* morphs were genetically differentiated and therefore could represent adaptations to different environmental conditions. This hypothesis is supported by the previous observations of Wiedenmann *et al.* (1999) who identified a differential bathymetric distribution for some of the recognized *A. viridis* morphs (var. *rustica* and *smaragdina*). Previously, using five EPIC markers, we showed that these morphs were not differentiated species (Mallien *et al.*, 2017). However, we could have missed a low level of differentiation if the morphs were still in the speciation grey zone (De Queiroz, 2007). In the present work using high throughput RADseq, we could demonstrate that *A. viridis* var. *smaragdina* and *rustica* are definitely not monophyletic groups, independent of the origin of the samples (Mediterranean Sea or English Channel). However, independent genetic lineages were found in our dataset (figure 3 and S3), but those were not correlated to morphology but, on the whole, rather correlated to the geographic origin of the samples. In addition, the clustering pattern analysis identified several groups of individuals mixing different morphs together and demonstrating admixture, and hence interfecondity between morphs (figure 4). Concerning var. *rufescens*, our previous

study suggested that only this morph was more differentiated (Mallien *et al.*, 2017). The present analysis showed that this morph was not a monophyletic independent lineage because the var. *rufescens* individuals belonged to at least two different genetic lineages (BanRuf in the Mediterranean Sea and EngCh in the English Channel, figure 3 and 4). This discordance between morphological differentiation and genetic polymorphism was also found in another sea anemones, e.g. *Actinia equina*, which displays three different morphotypes (brown, red and green), out of which at least two have been shown by phylogenetic analysis to share two genetic units (Pereira *et al.*, 2014). In the study models for developmental and functional studies belonging to the genus *Exaiptasia*, Grajales and Rodríguez (2016) identified a new cryptic species, *E. brasiliensis*, morphologically indistinguishable and living in sympatry with *E. pallida*. Spano *et al.* (2018) using RAD sequencing, inferred the existence of a “widespread complex of sea anemones” in the genus *Anthothoe*, not correlated with classical morphological features but here also structured by geographical distribution.

A similar symbiotic dinoflagellate composition among the morphs

Having demonstrated that *A. viridis* var. *smaragdina* and *rustica* belong to the same genetic pool, we tested the correlation between the symbiotic composition and the morphotypes mainly differentiated by fluorescent protein (FP) and related pigments expression (Wiedenmann *et al.*, 1999; Wiedenmann, Elke, *et al.*, 2000). These proteins may have photoprotective functions (Salih *et al.*, 2000; Gittins *et al.*, 2015) or they may enhance symbiont photosynthesis (Quick *et al.*, 2018), suggesting a possible correlation between morph fluorescence pattern and the symbiotic composition of the morphs, irrespective of genetic differentiation. To assess the genetic diversity of the *A. viridis* symbiont populations, that all belong to the unique Temperate Clade A (Savage *et al.*, 2002; Visram *et al.*, 2006; Forcioli *et al.*, 2011; Casado-Amezúa *et al.*,

2014), we genotyped the pooled Symbiodiniaceae from each single host and compared the obtained symbiotic compositions with one another in order to detect any differentiation among the different host morphs or lineages.

In *A. viridis*, the distribution of the ITS2 sequence variants did not correlate with the three host morphs. If a differentiation between var. *smaragdina* and *rustica* was indeed detected with the T50-dataset (table S5), it was restricted to within the Med2 lineage, thus suggesting a sampling artefact. Such a differentiation was not found with the SP dataset and if we only used the individuals present in the SP datasets in the D&S pipeline, this morph differentiation within Med2 lineage disappears (result not shown). This absence of correlation between colour morphs and symbiont populations was not in accordance with the previous observations in the coral *Madracis pharensis* (Frade *et al.*, 2008), where a relation between the symbiont type harboured by the coral colonies and the colour of the colonies was found. As such the generalisation that the cnidarian FP pattern is a response to Symbiodiniaceae diversity may be excluded. We also could hypothesise that the FP expressed by *A. viridis* has a less important role in the photoprotection of Symbiodiniaceae than in other symbiotic cnidarians (Salih *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2013; Gittins *et al.*, 2015).

What is the origin of morph differentiation in *A. viridis*?

The question of the nature of the *A. viridis* morphs still remains. Even if the morphs are not divergent host lineages nor due to morph specific symbiont assemblages, we still cannot exclude that morphs are genetically determined. Very few genes could be involved in such morphological variation, and even a unique gene could be responsible for a critical effect on the phenotype, as in maize (Dorweiler *et al.*, 1993). Even in *Littorina saxatilis*, a marine gastropod harbouring different ecomorphs along the foreshore and known as a classical example of ecological speciation, only 4% of SNPs were identified as outliers between the morphologically differentiated species (Kess

et al., 2018). Given this, a Genome Wide Association Study could be powerful enough to detect SNPs correlated to the morph pattern (Korte and Farlow, 2013) in *A. viridis* if the morphs are due to allelic differences at a few major genes. Unfortunately, the RADseq loci generated in our study covered only a small part of the genome (less than 1% considering the number of RADseq loci obtained and an estimated genome size of around 480Mb) and would not be enough for this analysis.

Obviously, the morphological variations within *A. viridis* could also be a plastic phenotypic response of the organism. In corals, the expression profile of fluorescent proteins can vary during the different development stages (Roth *et al.*, 2013). However, to the best of our knowledge, there was no report of this kind of variation in *A. viridis* neither in the literature, nor during monitored embryonic development (Zamoum *et al.*, *pers. com.*). Nevertheless, *A. viridis* morphs could still be the consequence of a local plastic response at the larval settlement stage, followed by developmental canalization (Zamer and Mangum, 1979; Kawecki and Ebert, 2004).

Cryptic species in the snakelocks anemone

The RADseq was resolute enough to detect differentiation among different independent genetic groups but not among the studied morphs. This approach enabled us to identify four cryptic species (BanRuf, Med1, Med2 and EngCh) in *A. viridis*, that were supported by three lines of analysis: SVDquartets (figure 3), *snmf* (figure 4) and BFD* (table S3)figure. Three of these species globally coincided with the geographical origin of the sea anemones: an English lineage (EngCh), a Mediterranean Sea lineage (Med2) and a mostly Mediterranean lagoon lineage (Med1). Our data also suggest further structuring within these lineages, as all displayed relatively strong F_{IS} values probably diagnostic of Wahlund effects (table S4).

Vicariance between the English Channel and Mediterranean Sea

During the last glacial period, the English Channel coasts were not suitable habitats for *A. viridis* (Bianchi and Morri, 2000). The English populations of *A. viridis* are therefore the result of a post-glacial recolonization. The differences observed between EngCh and the Mediterranean lineages could then be the result of a vicariance process, in line with what was described for the lagoon cockle *Cerastoderma glaucum* (Sromek *et al.*, 2019) or *Cymodocea nodosa* (Alberto *et al.*, 2008). This cleavage was also supported by the distribution of the symbiont assemblages (table 2 and S9). A similar pattern of distribution of the symbiotic genetic diversity was observed in another sea anemone species, *Aiptasia couchii*, with a Temperate Clade A “Atlantic strain” in the English Channel and a “Mediterranean strain” on Portuguese and Spanish Atlantic and Mediterranean coasts (Grajales *et al.*, 2016). However, the lack of sampling points between the North-western Mediterranean and English Channel in our datasets does not allow for a formal test of this scenario.

Cryptic species within the Western Mediterranean basin?

In our study, the Med1 lineage individuals were, for their vast majority, sampled in the Thau lagoon. This lineage could therefore correspond to some differentiation due to ecological conditions (Thau lagoon *versus* Mediterranean open-sea), as found in other lagoon species (Lemaire *et al.*, 2000; Chaoui *et al.*, 2012). This was reinforced by the differentiation of symbiont populations between Med1 and Med2 which could be linked to a functional intra cladal diversity (Howells *et al.*, 2012); or as the result of a strict vertical transmission of the symbionts in *A. viridis* (Schäfer, 1984). Nevertheless, we also found individuals belonging to the Med1 lineage at Banyuls (*i.e.* not in a lagoon) and individuals belonging to the Med2 lineage in the Thau lagoon. Furthermore, we do not know the extent of the geographical distribution of the species in the Western Mediterranean Sea.

At Banyuls, we found three species in sympatry (BanRuf, Med1, Med2) with or without introgression among them (figure 4). We know however that the BanRuf lineage could not be a “sampling site effect” because the var. *rufescens* individuals in the study of Mallien *et al.* (2017) came from another more northern site (Collioure, France, about 7 km away from Banyuls) and were already differentiated from the others *A. viridis* individuals. Nevertheless, as Banyuls was the more genetically diverse site, we hence hypothesise that the French-Spanish border could harbour a secondary contact zone between a Western Mediterranean genetic pool (which contains the Med2 and Med1 lineages) and another highly divergent one (BanRuf) from the Northern coast of Africa or from the Atlantic Ocean. Again, a formal test of this hypothesis would require a more thorough sampling of the geographical zone than the one we performed for this study, that was aimed at clarifying the taxonomic status of *A. viridis* colour morphs.

To conclude, *A. viridis*, as it is described today, appears as a complex of more or less introgressed cryptic species sharing morphotypes and harbouring differentiated symbiont populations. These different lineages, from the English Channel to the Mediterranean Sea, do live under different environmental conditions. Therefore, if there is any adaptive genetic differentiation to be found in *A. viridis*, it should be looked for among the genetic lineages rather than among the morphs.

Acknowledgements

This work was supported by the ANR Bioadapt research program “AdaCni” (ANR-12-ADAP-0016) as a PhD grant to CM and by a doctoral fellowship from the French Ministère de l’Enseignement supérieur et de la Recherche to BP. We thank J. Wiedenmann, P. Ventura, A. Haguenaer, R. Rodolpho-Metalpa, IMBE and M. Wanguemert for their contribution to the sampling effort. We also thank P-A. Gagnaire and L. Sromek for the RADseq individual tags; P. Barbry from IPMC who gave us the authorization to use the CovarisB sonicator and V. Magnone and

M-J.Arguel for their help during its utilization.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Alberto F, Massa S, Manent P, Diaz-Almela E, Arnaud-Haond S, Duarte CM, *et al.* (2008). Genetic differentiation and secondary contact zone in the seagrass *Cymodocea nodosa* across the Mediterranean-Atlantic transition region. *Journal of Biogeography* **35**: 1279–1294.

Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* **19**: 1655–1664.

Appeltans W, Ahyong ST, Anderson G, Angel MV, Artois T, Bailly N, *et al.* (2012). The Magnitude of Global Marine Species Diversity. *Current Biology* **22**: 2189–2202.

Arif C, Daniels C, Bayer T, Banguera-Hinestroza E, Barbrook A, Howe CJ, *et al.* (2014). Assessing *Symbiodinium* diversity in scleractinian corals via next-generation sequencing-based genotyping of the ITS2 rDNA region. *Molecular Ecology* **23**: 4418–4433.

Bailleul D, Stoeckel S, Arnaud-Haond S (2016). RClone: a package to identify MultiLocus Clonal Lineages and handle clonal data sets in r. *Methods in Ecology and Evolution* **7**: 966–970.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**: 37–48.

Bandelt HJ, Peter Forster, Bryan C Sykes, Richards MB (1995). Mitochondrial Portraits of Human Populations Using Median Networks. *Genetics* **141**: 743–753.

Batovska J, Cogan NOI, Lynch SE, Blacket MJ (2017). Using Next-Generation Sequencing for DNA Barcoding: Capturing Allelic Variation in *ITS2*. *G3&#amp;#58; Genes/Genomes/Genetics* **7**: 19–29.

Bellis ES, Howe DK, Denver DR (2016). Genome-wide polymorphism and signatures of selection in the symbiotic sea anemone *Aiptasia*. *BMC Genomics* **17**.

Bianchi CN, Morri C (2000). Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine pollution bulletin* **40**: 367–376.

Bongaerts P, Riginos C, Brunner R, Englebert N, Smith SR, Hoegh-Guldberg O (2017). Deep reefs are not universal refuges: Reseeding potential varies among coral species. *Science Advances* **3**: e1602373.

Bonthond G, Merselis DG, Dougan KE, Graff T, Todd W, Fourqurean JW, *et al.* (2018). Inter-domain microbial diversity within the coral holobiont *Siderastrea siderea* from two depth habitats. *PeerJ* **6**: e4323.

Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, Xie D, *et al.* (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLOS Computational Biology* **10**: e1003537.

Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E (2016). OBITOOLS: a UNIX -inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* **16**: 176–182.

Bryant D, Bouckaert R, Felsenstein J, Rosenberg NA, RoyChoudhury A (2012). Inferring Species Trees Directly from Biallelic Genetic Markers: Bypassing Gene Trees in a Full Coalescent Analysis. *Mol Biol Evol* **29**: 1917–1932.

Bulnheim HP, Sauer KP (1984). *Anemonia sulcata*-two species? Genetical and ecological evidence. *Verhandlungen der Deutschen Zoologische Gesellschaft* **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.
- Chaoui L, Gagnaire P-A, Guinand B, Quignard J-P, Tsigenopoulos C, Kara MH, *et al.* (2012). Microsatellite length variation in candidate genes correlates with habitat in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Molecular Ecology* **21**: 5497–5511.
- Chifman J, Kubatko L (2014). Quartet Inference from SNP Data Under the Coalescent Model. *Bioinformatics* **30**: 3317–3324.
- Creed ER, Lees DR, Bulmer MG (1980). Pre-adult viability differences of melanic *Biston betularia* (L.) (Lepidoptera). *Biol J Linn Soc* **13**: 251–262.
- Cunning R, Gates RD, Edmunds PJ (2017). Using high-throughput sequencing of ITS2 to describe *Symbiodinium* metacommunities in St. John, US Virgin Islands. *PeerJ* **5**: e3472.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, *et al.* (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* **27**: 2156–2158.
- Davy SK, Lucas IAN, Turner JR (1996). Carbon budgets in temperate anthozoan-dinoflagellate symbioses. *Marine Biology* **126**: 773–783.
- De Brauwere M, Hobbs J-PA, Ambo-Rappe R, Jompa J, Harvey ES, McIlwain JL (2018). Biofluorescence as a survey tool for cryptic marine species. *Conservation Biology* **32**: 706–715.
- De Queiroz K (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* **56**: 879–886.
- Dorweiler J, Stec A, Kermicle J, Doebley J (1993). Teosinte glume architecture 1: A Genetic Locus Controlling a Key Step in Maize Evolution. *Science* **262**: 233–235.
- Douek J, Barki Y, Gateño D, Rinkevich B (2002). Possible cryptic speciation within the sea anemone *Actinia equina* complex detected by AFLP markers. *Zool J Linn Soc* **136**: 315–320.
- Eaton DAR (2014). PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **30**: 1844–1849.
- Emerson KJ, Merz CR, Catchen JM, Hohenlohe PA, Cresko WA, Bradshaw WE, *et al.* (2010). Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *PNAS* **107**: 16196–16200.
- Eren AM, Morrison HG, Lescault PJ, Reveillaud J, Vineis JH, Sogin ML (2015). Minimum entropy decomposition: Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *The ISME Journal* **9**: 968–979.
- Etter PD, Preston JL, Bassham S, Cresko WA, Johnson EA (2011). Local De Novo Assembly of RAD Paired-End Contigs Using Short Sequencing Reads. *PLOS ONE* **6**: e18561.
- Fišer C, Robinson CT, Malard F (2018). Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Molecular Ecology* **27**: 613–635.
- Flot J-F, Blanchot J, Charpy L, Cruaud C, Licuanan WY, Nakano Y, *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 ecology* **11**: 22.
- Forcioli D, Merle P, Caligara C, Ciosi M, Muti C, Francour P, *et al.* (2011). Symbiont diversity is not involved in depth acclimation in the Mediterranean Sea whip *Eunicella singularis*. *Marine Ecology Progress Series* **439**: 57–71.
- Frade PR, Englebert N, Faria J, Visser PM, Bak RPM (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.
- Frichot E, François O (2015). LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods in Ecology and Evolution* **6**: 925–929.
- Frichot E, Mathieu F, Trouillon T, Bouchard G, François O (2014). Fast and Efficient Estimation of Individual Ancestry Coefficients. *Genetics* **196**: 973–983.
- Gittins JR, D'Angelo C, Oswald F, Edwards RJ, 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.
- González-Muñoz R, Simões N, Mascaró M, Tello-Musi JL, Brugler MR, 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.
- Goudet J, Jombart T (2015). Hierfstat: estimation and tests of hierarchical F-statistics. *R package version 004-22*.
- 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.
- Grajales A, Rodríguez E, Thornhill DJ (2016). Patterns of *Symbiodinium* spp. associations within the family Aiptasiidae, a monophyletic lineage of symbiotic of sea anemones (Cnidaria, Actiniaria). *Coral Reefs* **35**: 345–355.
- Hipp AL (2014). RADami: R package for phylogenetic analysis of RADseq data. *R package version: 1–0*.
- Howells EJ, Beltran VH, Larsen NW, Bay LK, Willis BL, van Oppen MJH (2012). Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nature Climate Change* **2**: 116–120.
- Hume BCC, Smith EG, Ziegler M, Warrington HJM, Burt JA, LaJeunesse TC, et al. (2019). SymPortal: a novel analytical framework and platform for coral algal symbiont next-generation sequencing ITS2 profiling. *Molecular Ecology Resources*. 19(4): 1063-1080.
- Hume BCC (2019). *didillysquat/SymPortal_framework: v0.2.7*. Zenodo.
- Huson DH, Bryant D (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol Biol Evol* **23**: 254–267.
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* **2**: e281.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**: 1225–1241.
- Kess T, Galindo J, Boulding EG (2018). Genomic divergence between Spanish *Littorina saxatilis* ecotypes unravels limited admixture and extensive parallelism associated with population history. *Ecology and Evolution* **8**: 8311–8327.
- Korte A, Farlow A (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* **9**: 29.
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, et al. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology* **28**: 2570-2580.e6.

- LaJeunesse TC, Thornhill DJ (2011). Improved Resolution of Reef-Coral Endosymbiont (*Symbiodinium*) Species Diversity, Ecology and Evolution through *psbA* Non-Coding Region Genotyping (P López-García, Ed). *PLoS ONE* **6**: e29013.
- Leaché AD, Fujita MK, Minin VN, Bouckaert RR (2014). Species Delimitation using Genome-Wide SNP Data. *Syst Biol* **63**: 534–542.
- Leigh JW, Bryant D (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* **6**: 1110–1116.
- Lemaire C, Allegrucci G, Naciri M, Bahri-Sfar L, Kara H, Bonhomme F (2000). Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Molecular Ecology* **9**: 457–467.
- Li H (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv:13033997 [q-bio]*.
- Mallien C, Porro B, Zamoum T, Olivier C, Wiedenmann J, Furla P, *et al.* (2017). Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria). *Systematics and Biodiversity* **0**: 1–16.
- Merilä J, Hendry AP (2013). Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. *Evolutionary Applications* **7**: 1–14.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* **16**: 1215.
- Muscatine L, Ferrier-Pagès C, Blackburn A, Gates RD, Baghdasarian G, Allemand D (1998). Cell-specific density of symbiotic dinoflagellates in tropical anthozoans. *Coral Reefs* **17**: 329–337.
- Muscatine L, Grossman D, Doi J (1991). Release of symbiotic algae by tropical sea anemones and corals after cold shock. *Marine Ecology Progress Series* **77**: 233–243.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, *et al.* (2016). *vegan: Community Ecology Package*.
- Pante E, Abdelkrim J, Viricel A, Gey D, France S, Boisselier M, *et al.* (2015). Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity*: 450–459.
- Pante E, Puillandre N, Viricel A, Arnaud-Haond S, Aurelle D, Castelin M, *et al.* (2015). Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular ecology*.
- Pereira AM, Brito C, Sanches J, Sousa-Santos C, Robalo JI (2014). Absence of consistent genetic differentiation among several morphs of *Actinia* (Actiniaria: Actiniidae) occurring in the Portuguese coast. *Zootaxa* **3893**: 595–600.
- Pérez-Ponce de León Gerardo, Poulin Robert (2016). Taxonomic distribution of cryptic diversity among metazoans: not so homogeneous after all. *Biology Letters* **12**: 20160371.
- Pfenninger M, Schwenk K (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 121.
- Price Trevor D., Qvarnström Anna, Irwin Darren E. (2003). The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **270**: 1433–1440.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Quick C, D’Angelo C, Wiedenmann J (2018). Trade-Offs Associated with Photoprotective Green Fluorescent Protein Expression as

- Potential Drivers of Balancing Selection for Color Polymorphism in Reef Corals. *Front Mar Sci* **5**.
- Quigley KM, Davies SW, Kenkel CD, Willis BL, Matz MV, Bay LK (2014). Deep-Sequencing Method for Quantifying Background Abundances of Symbiodinium Types: Exploring the Rare Symbiodinium Biosphere in Reef-Building Corals. *PLOS ONE* **9**: e94297.
- Ree RH, Hipp AL (2015). Inferring phylogenetic history from restriction site associated DNA (RADseq). *Next-Generation Sequencing in Plant Systematics* (Eds E Hörandl, MS Appelhans): 181–204.
- Richier S, Merle P-L, Furla P, Pigozzi D, Sola F, Allemand D (2003). Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1621**: 84–91.
- Rodríguez E, Barbeitos MS, Brugler MR, Crowley LM, Grajales A, Gusmão L, et al. (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.
- Roth MS, Fan T-Y, Deheyn DD (2013). Life History Changes in Coral Fluorescence and the Effects of Light Intensity on Larval Physiology and Settlement in *Seriatopora hystrix* (SCA Ferse, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e59476.
- Salih A, Larkum A, Cox G, Kühl M, Hoegh-Guldberg O (2000). Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* **408**: 850–853.
- Sampayo EM, Dove S, Lajeunesse TC (2009). Cohesive molecular genetic data delineate species diversity in the dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular Ecology* **18**: 500–519.
- 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. *Marine Biotechnology* **5**: 130–140.
- Sauer KP (1986). Strategien zeitlicher und räumlicher Einnischung. In: *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, Fischer Vol 79, pp 11–30.
- Sauer KP, Müller M, Weber M (1986). Alloimmune memory for glycoprotein recognition molecules in sea anemones competing for space. *Marine Biology* **92**: 73–79.
- Savage AM, Goodson MS, Visram S, Trapido-Rosenthal H, Wiedenmann J, Douglas AE (2002). Molecular diversity of symbiotic algae at the latitudinal margins of their distribution: dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* in corals and sea anemones. *Marine ecology progress series* **244**: 17–26.
- Schäfer W (1984). Fortpflanzung und Entwicklung von *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actiniaria). I: Fortpflanzungszyklus und Struktur der Oocyten vor und nach der Besamung. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **38**: 135–148.
- Schmidt-Roach S, Lundgren P, Miller KJ, Gerlach G, Noreen AME, Andreakis N (2013). Assessing hidden species diversity in the coral *Pocillopora damicornis* from Eastern Australia. *Coral Reefs* **32**: 161–172.
- Smith EG, 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.
- Smith EG, Ketchum RN, Burt JA (2017). Host specificity of *Symbiodinium* variants revealed by an ITS2 metahaplotype approach. *The ISME Journal* **11**: 1500–1503.

- Spano CA, Häussermann V, Acuña FH, Griffiths C, Seeb LW, Gomez-Uchida D (2018). Hierarchical biogeographical processes largely explain the genomic divergence pattern in a species complex of sea anemones (Metridioidea: Sagartiidae: Anthothoe). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **127**: 217–228.
- Sromek L, Forcioli D, Lasota R, Furla P, Wolowicz M (2019). Next-generation phylogeography of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Highly heterogeneous genetic differentiation in a lagoon species. *Ecology and Evolution* **9**: 4667–4682.
- Stamatakis A (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**: 1312–1313.
- Stat M, Pochon X, Cowie R, Gates R (2009). Specificity in communities of *Symbiodinium* in corals from Johnston Atoll. *Marine Ecology Progress Series* **386**: 83–96.
- Struck TH, Feder JL, Bendiksby M, Birkeland S, Cerca J, Gusarov VI, et al. (2018). Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. *Trends in Ecology & Evolution* **33**: 153–163.
- Suggett DJ, Hall-Spencer JM, Rodolfo-Metalpa R, Boatman TG, Payton R, Tye Pettay D, et al. (2012). Sea anemones may thrive in a high CO₂ world. *Global Change Biology* **18**: 3015–3025.
- Swofford DL (1998). *Phylogenetic analysis using parsimony (paup)*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725–2729.
- Titus BM, Daly M (2018). Reduced representation sequencing for symbiotic anthozoans: are reference genomes necessary to eliminate endosymbiont contamination and make robust phylogeographic inference? *bioRxiv*: 440289.
- Ventura P, Jarrold MD, Merle P-L, Barnay-Verdier S, Zamoum T, Rodolfo-Metalpa R, et al. (2016). Resilience to ocean acidification: decreased carbonic anhydrase activity in sea anemones under high pCO₂ conditions. *Marine Ecology Progress Series* **559**: 257–263.
- 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. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **86**: 1281–1283.
- Wiedenmann J, Elke C, Spindler KD, 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 (Anthozoa, Actinaria). *Ophelia* **52**: 57–64.
- 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 Vol 29, pp 497–503.
- Zamer WE, Mangum CP (1979). Irreversible nongenetic temperature adaptation of oxygen uptake in clones of the sea anemone *Haliplanella luciae* (verrill). *The Biological Bulletin* **157**: 536–547.

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

Zamoum T, Furla P (2012). Symbiodinium isolation by NaOH treatment. *Journal of Experimental Biology* **215**: 3875–3880.

Supplementaries

Figure S1: Proportion of shared SNP alleles among the host individuals of the N140 dataset. The darker the colour, the higher the proportion of shared alleles is between two individuals. The black stars mark the group of individuals with the highest proportions of shared loci in which formed the N85 dataset. They correspond to the individuals also pointed by black stars in the Figure 4.

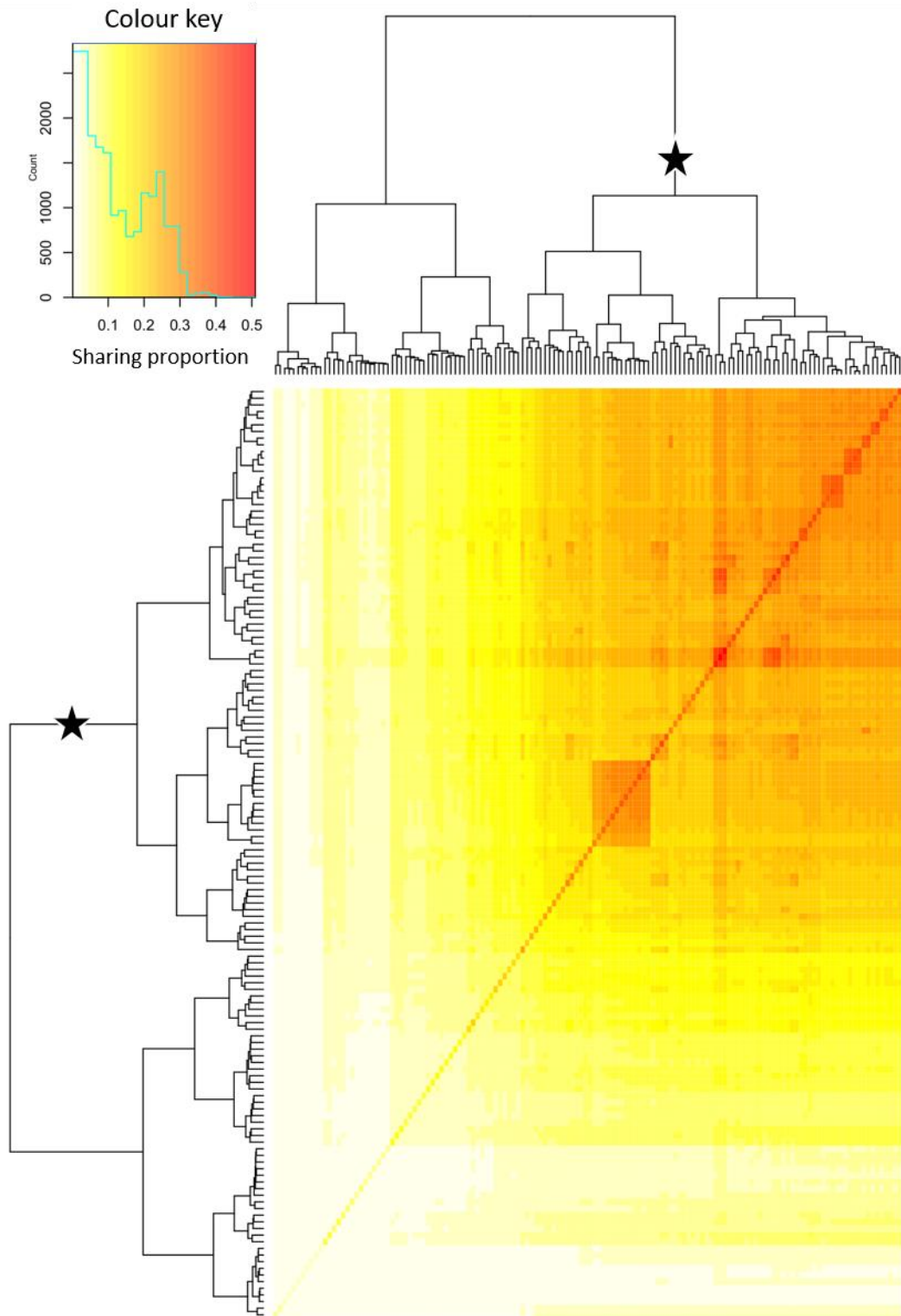


Figure S2: Clonality thresholds determined within SVD clades on the N85 dataset. The comparison between observed and simulated populations were obtained with RClone package, as the definition of the threshold (red line on the graphs). The identification of individuals belonging to the same clonal lineage (MLL) were obtained with poppr package.

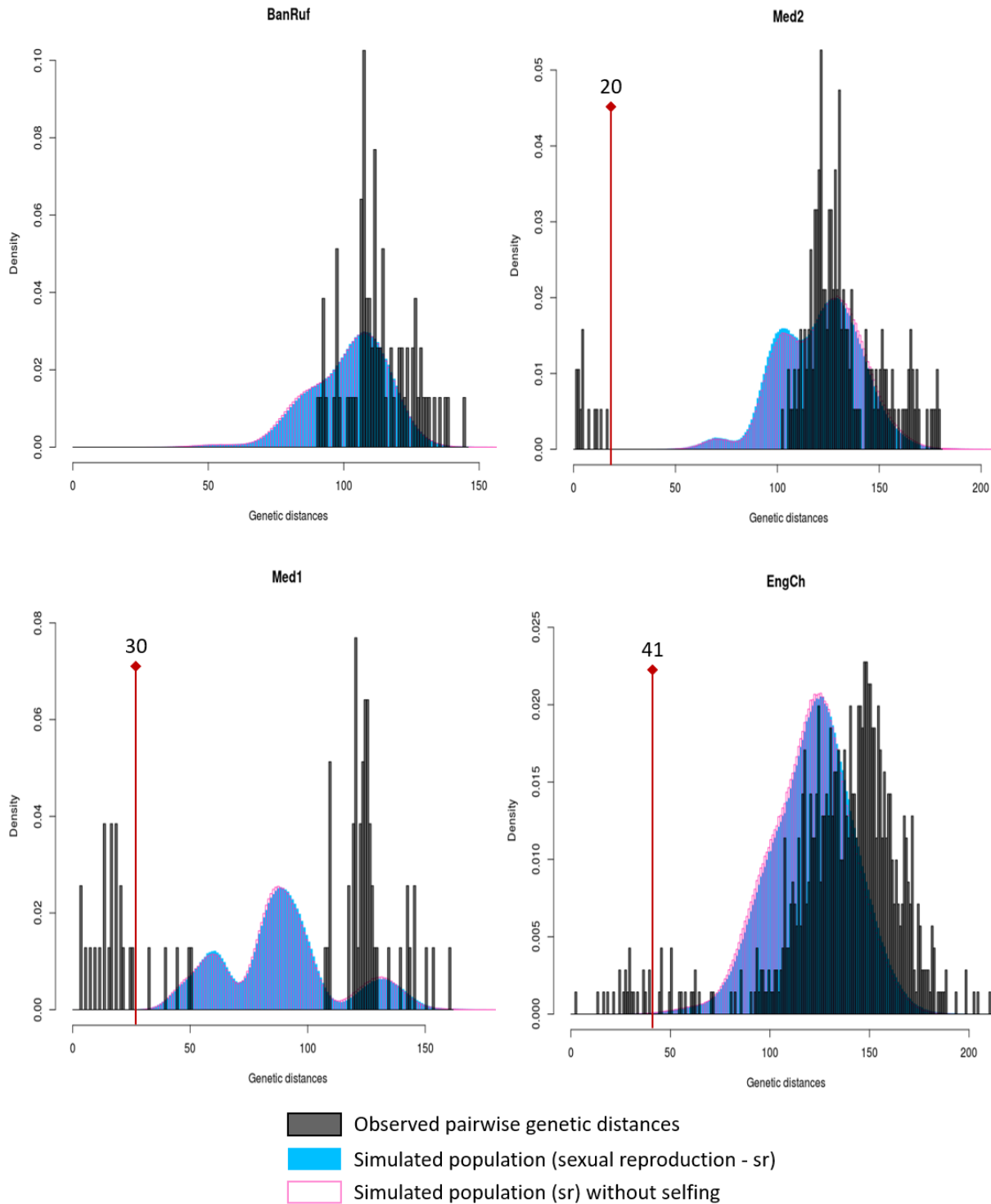


Figure S3: Persistence of the five clades after removing repeated “clonemates” (SVDquartets analysis at the individual level on the N109 dataset). Support values at the nodes are shown only if equal or superior to 70%. The coloured bars correspond to the five identified clades (i) *P. cinerea* (black), (ii) BanRuf (green), (iii) English Channel (EngCh, purple), (iv) Med1 (yellow), (v) Med2 (orange). The black arrow heads point to the sea-anemones from Banyuls attributed to the Med1 lineage and to the Thau sea anemones attributed to the Med2 clade.

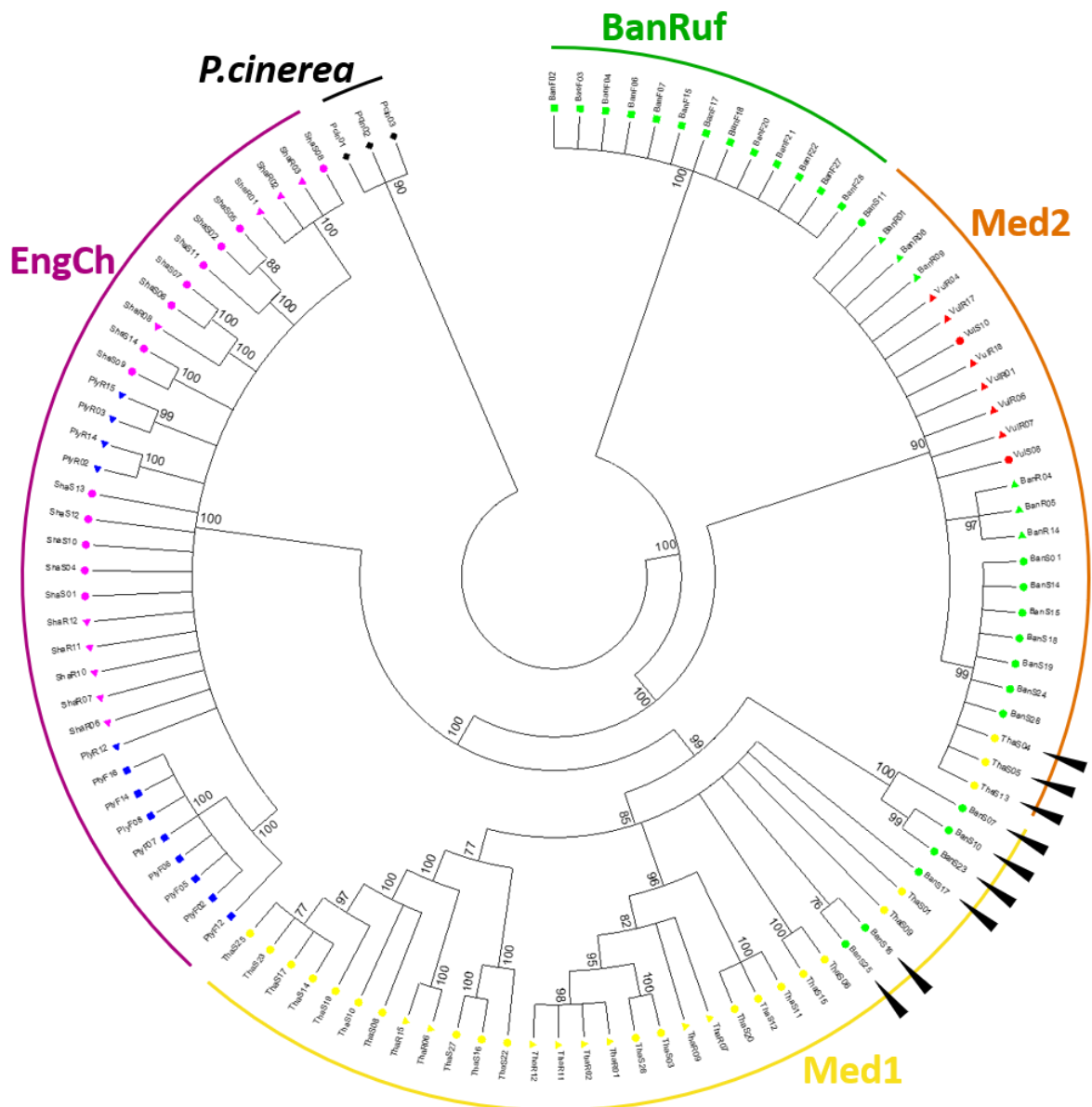


Figure S4: Cross-entropy validation of the optimal number of clusters or ancestral populations (K) for the snmf clustering analysis on the N109 dataset. Graph showing the cross-entropy values for a number of K-clusters varying between 1 and 20. It designates the value K=4 as the best number of genetic clusters the N109 individuals could be originated from.

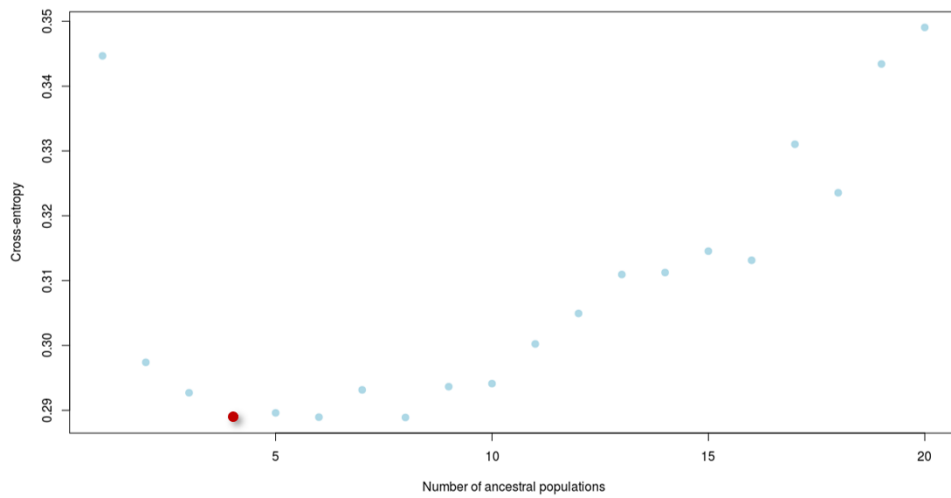


Figure S5: Median joining network of the T50-ITS2 (A) and the SP-ITS2 (B) symbiont sequence variants. Each circle represents an allele (in grey the common alleles between the two datasets) and its size is proportional to the number of host individuals with this allele. The most abundant ITS2 is identified by a black hash, and the ITS2 sequence variants shared with *P. cinerea* are identified by a black asterisk (in A).

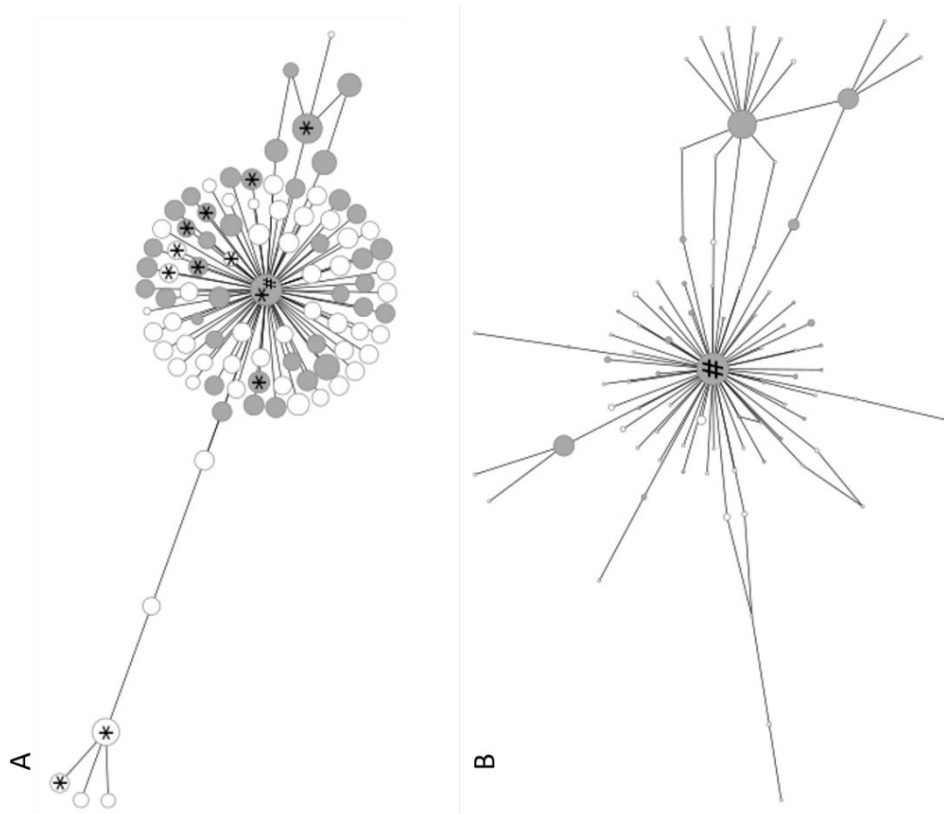


Table S1: Composition of the different datasets

individuals	site	Morph/Species	SVDquartet clades/snmf clusters	MLL	N85	N109	T50 symbiotic populations	SP symbiotic populations
BanF02	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	1	x	x	x	x
BanF03	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	2	x*	x	x	x
BanF04	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	3	x	x	x	x
BanF06	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	5	x	x		
BanF07	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	6	x	x		
BanF15	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	7	x	x		
BanF17	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	8	x	x		
BanF18	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	9	x	x		
BanF20	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	10	x	x	x	
BanF21	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	11	x	x		
BanF22	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	12	x*	x		
BanF27	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	13	x	x		
BanF28	Banyuls	<i>rufescens</i>	BanRuf	14	x	x		
BanR01	Banyuls	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
BanR04	Banyuls	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
BanR05	Banyuls	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
BanR06	Banyuls	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
BanR09	Banyuls	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
BanR14	Banyuls	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
BanS01	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	15	x*	x		
BanS02	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	16	x		x	x
BanS05	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	17	x		x	x
BanS07	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
BanS10	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med1			x		
BanS11	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2			x	x	x
BanS12	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	18	x		x	
BanS13	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	19	x			
BanS14	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	20	x	x	x	x
BanS15	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	18	x*	x	x	
BanS16	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med1	21	x*	x		
BanS17	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med1	22	x	x		
BanS18	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	23	x	x		
BanS19	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	19	x*	x	x	x
BanS20	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	17	x		x	
BanS21	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	24	x			
BanS22	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	17	x		x	x
BanS23	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med1			x		
BanS24	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	17	x*	x	x	x
BanS25	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med1	25	x*	x		
BanS26	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	16	x			
BanS27	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	16	x		x	
BanS28	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	26	x	x		
BanS29	Banyuls	<i>smaragdina</i>	Med2	16	x			
BanS30	Banyuls Leucate	<i>smaragdina</i>	Med2	19	x		x	x
Pcin01	(France)	<i>P. cinerea</i>	Pcin			x		

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

Pcin02	Culatra (Portugal)	<i>P. cinerea</i>	Pein			x		
Pcin03	Nubia (Italy)	<i>P. cinerea</i>	Pein				x	
PlyF02	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	31	x*	x	x	x
PlyF05	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh			x	x	x
PlyF06	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh			x	x	x
PlyF07	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	32	x	x	x	x
PlyF08	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	33	x	x	x	x
PlyF09	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	31	x		x	x
PlyF11	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	31	x		x	x
PlyF12	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	34	x	x	x	x
PlyF13	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	31	x		x	x
PlyF14	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	35	x	x	x	x
PlyF15	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh	31	x		x	x
PlyF16	Plymouth	<i>rufescens</i>	EngCh			x	x	x
PlyR01	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	27	x		x	x
PlyR02	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	28	x	x	x	x
PlyR03	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh			x	x	x
PlyR04	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	29	x		x	x
PlyR05	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	29	x		x	x
PlyR06	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	29	x		x	x
PlyR07	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	29	x		x	x
PlyR09	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	27	x		x	x
PlyR10	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	27	x		x	x
PlyR11	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	30	x		x	x
PlyR12	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	30	x*	x	x	x
PlyR13	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	29	x		x	x
PlyR14	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	27	x*	x	x	x
PlyR15	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	29	x*	x	x	x
PlyR16	Plymouth	<i>rustica</i>	EngCh	29	x		x	x
ShaR01	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	36	x*	x	x	x
ShaR02	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh			x	x	x
ShaR03	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh			x	x	x
ShaR04	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	36	x		x	x
ShaR05	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	36	x		x	x
ShaR06	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh			x	x	x
ShaR07	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	37	x	x	x	x
ShaR08	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	38	x	x	x	x
ShaR09	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	39	x		x	x
ShaR10	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	39	x	x	x	x
ShaR11	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	4	x	x	x	x
ShaR12	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh			x	x	x
ShaR13	Southampton	<i>rustica</i>	EngCh	39	x		x	x
ShaS01	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh			x	x	x
ShaS02	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh			x	x	x
ShaS04	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh	41	x	x	x	x
ShaS05	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh			x	x	x
ShaS06	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh	42	x	x	x	x
ShaS07	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh	43	x	x	x	x

Diversité morphologique : de la plasticité morphologique à la divergence interspécifique

ShaS08	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh			x	x	x
ShaS09	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh			x	x	x
ShaS10	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh			x	x	x
ShaS11	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh	44	x	x	x	x
ShaS12	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh	45	x*	x	x	x
ShaS13	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh	46	x	x	x	x
ShaS14	Southampton	<i>smaragdina</i>	EngCh			x	x	x
ThaR01	Thau	<i>rustica</i>	Med1	54	x*	x	x	x
ThaR02	Thau	<i>rustica</i>	Med1			x	x	x
ThaR06	Thau	<i>rustica</i>	Med1	55	x	x	x	x
ThaR07	Thau	<i>rustica</i>	Med1			x	x	x
ThaR09	Thau	<i>rustica</i>	Med1			x	x	x
ThaR11	Thau	<i>rustica</i>	Med1			x	x	x
ThaR12	Thau	<i>rustica</i>	Med1			x	x	x
ThaR15	Thau	<i>rustica</i>	Med1			x	x	x
ThaS01	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x		
ThaS03	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
ThaS04	Thau	<i>smaragdina</i>	Med2	47	x	x	x	x
ThaS05	Thau	<i>smaragdina</i>	Med2	16	x*	x	x	
ThaS06	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
ThaS07	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1	48	x		x	x
ThaS08	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
ThaS09	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
ThaS10	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
ThaS11	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x		
ThaS12	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1	49	x	x	x	x
ThaS13	Thau	<i>smaragdina</i>	Med2	24	x*	x	x	x
ThaS14	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	
ThaS15	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1	50	x	x	x	x
ThaS16	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x		
ThaS17	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1	51	x	x		
ThaS18	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1	48	x			
ThaS19	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x		
ThaS20	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1	52	x	x	x	x
ThaS22	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
ThaS23	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
ThaS25	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1			x	x	x
ThaS27	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1	53	x	x	x	x
ThaS28	Thau	<i>smaragdina</i>	Med1	48	x*	x		
VulR01	Vulcano	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
VulR04	Vulcano	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
VulR06	Vulcano	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
VulR07	Vulcano	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
VulR17	Vulcano	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
VulR18	Vulcano	<i>rustica</i>	Med2			x	x	x
VulS08	Vulcano	<i>smaragdina</i>	Med2			x	x	x
VulS10	Vulcano	<i>smaragdina</i>	Med2			x	x	x

* in the N85 column mark the individuals used in the BFD* computations (based on 1000 unlinked SNPs)

Table S2: Temperate Clade A T50-ITS2 sequence variants identification

Filters		Number of ITS2 variant	Total number of reads	Number of reads per ITS2 variant (mean ± se)
Raw sequences			175933	
Step 1	Identification of ITS2 sequences	1	172592	
Step 2	Identification of unique ITS2 sequences	95881	172592	1.8
Step 3 (i)	Identification of shared sequence variants	4814	78443	16.29 ± 4.78
Step 3 (ii)	Identification of most abundant shared sequence variants	92	30365	330.05 ± 192.61

Table S3: Test of species hypothesis by BFD*. The three species hypotheses tested were (1) morphs as species irrespective of the geographic origin of the anemones; the very divergent var. *rufescens* anemones from Banyuls, (2) the rest of Mediterranean anemones and English Channel ones as species; (3) the SVD clades as species. The MLE (log likelihoods) for each hypothesis was obtained by BFD*. The Bayes Factor (BF) was computed by considering either species hypothesis (1) as a Primary Species Hypothesis (PSH) and the two others as Secondary Species Hypotheses (SSH) (column 1 vs), or species hypothesis (2) as PSH and species hypothesis (3) as SSH (column 2 vs). All these BF values, here presented as $2 \ln BF$, were all decisively in favour of species hypothesis (3) (following Leache *et al.* 2014).

Species hypothesis	MLE	2 ln BF	
		1 vs	2 vs
1 <i>rufescens/smaragdina/rustica</i>	-18766.49		
2 BanRuf/(Med1 + Med2)/EngCh	-17340.36	2852.26	
3 BanRuf/Med1/Med2/EngCh	-17223.36	3086.26	234

Table S4: Host and symbiont genetic diversities

Genetic lineages	Hosts										Symbionts				
											T50		SP		
	N	Ar	Ho	He	F _{is}	Polymorphic loci (%)	MLL	N	Number of ITS2 variants	Gene diversity	ITS2 variants/host (mean ± sd)	N	Number of ITS2 variants	Gene diversity	ITS2 variants/host (mean ± sd)
BanRuf	13	1.090	0.074	0.091	0.186	32.8	0	4	44	0.252	14.75 ± 10.31	3	7	0.043	3 ± 2
EngCh	35	1.080	0.042	0.081	0.481	34.3	6	53	91	0.439	38.51 ± 12.84	53	45	0.038	4.87 ± 1.39
Med1	30	1.080	0.057	0.081	0.294	34.4	1	23	90	0.434	34.83 ± 15.77	22	27	0.043	3.86 ± 2.19
Med2	28	1.090	0.067	0.091	0.262	32.3	5	30	92	0.375	24.63 ± 20.36	25	32	0.036	3.36 ± 2.2
<i>P.cinerea</i>	3	1.050	0.022	0.107	0.795	3.7	-	3	12	0.072	5.33 ± 1.15	3	4	0.022	2 ± 0

N is the number of analysed sea anemones. Ar corresponds to the mean allelic richness over loci per population.

Ho and He are respectively the observed and expected heterozygosity within each population.

MLL is the number of clonal multilocus lineages found in each genetic lineage on the N85 dataset

Table S5: PERMANOVA analysis of the pairwise differentiation and partitioning of the Temperate Clade A T50-ITS2 diversity among *A. viridis* morphs in the genetic lineages

Pairs		F	R ²	Adjusted p-value
BanRuf (<i>rufescens</i>)	vs EngCh (<i>rufescens</i>)	2.5821139	0.1557168	0.0154
BanRuf (<i>rufescens</i>)	vs EngCh (<i>rustica</i>)	2.2053833	0.0684787	0.01742
BanRuf (<i>rufescens</i>)	vs EngCh (<i>smaragdina</i>)	2.4114999	0.1385004	0.00373
BanRuf (<i>rufescens</i>)	vs Med1 (<i>rustica</i>)	1.4761786	0.1286298	0.0398
BanRuf (<i>rufescens</i>)	vs Med1 (<i>smaragdina</i>)	1.7932263	0.0954205	0.0398
BanRuf (<i>rufescens</i>)	vs Med2 (<i>rustica</i>)	1.6698233	0.1001704	0.02978
BanRuf (<i>rufescens</i>)	vs Med2 (<i>smaragdina</i>)	0.9840473	0.0492416	0.54198
EngCh (<i>rufescens</i>)	vs EngCh (<i>rustica</i>)	0.8600653	0.0221324	0.77678
EngCh (<i>rufescens</i>)	vs EngCh (<i>smaragdina</i>)	0.8052078	0.0338249	0.87132
EngCh (<i>rufescens</i>)	vs Med1 (<i>rustica</i>)	1.5154505	0.0776539	0.0398
EngCh (<i>rufescens</i>)	vs Med1 (<i>smaragdina</i>)	1.4661574	0.0553974	0.05992
EngCh (<i>rufescens</i>)	vs Med2 (<i>rustica</i>)	1.3672864	0.0561116	0.08709
EngCh (<i>rufescens</i>)	vs Med2 (<i>smaragdina</i>)	3.8321928	0.1242919	0.00607
EngCh (<i>rustica</i>)	vs EngCh (<i>smaragdina</i>)	0.7133946	0.0179636	0.9415
EngCh (<i>rustica</i>)	vs Med1 (<i>rustica</i>)	1.3836118	0.0391032	0.07945
EngCh (<i>rustica</i>)	vs Med1 (<i>smaragdina</i>)	1.6998544	0.0398094	0.0136
EngCh (<i>rustica</i>)	vs Med2 (<i>rustica</i>)	1.3462	0.0333662	0.08709
EngCh (<i>rustica</i>)	vs Med2 (<i>smaragdina</i>)	4.8888544	0.1020875	0.0028
EngCh (<i>smaragdina</i>)	vs Med1 (<i>rustica</i>)	1.1648523	0.0577665	0.28784
EngCh (<i>smaragdina</i>)	vs Med1 (<i>smaragdina</i>)	1.3350771	0.0488412	0.08709
EngCh (<i>smaragdina</i>)	vs Med2 (<i>rustica</i>)	0.981414	0.0392858	0.65426
EngCh (<i>smaragdina</i>)	vs Med2 (<i>smaragdina</i>)	3.9051256	0.1223981	0.0028
Med1 (<i>rustica</i>)	vs Med1 (<i>smaragdina</i>)	1.020939	0.0463622	0.51749
Med1 (<i>rustica</i>)	vs Med2 (<i>rustica</i>)	1.0920386	0.0543518	0.404
Med1 (<i>rustica</i>)	vs Med2 (<i>smaragdina</i>)	2.3724641	0.0920386	0.0224
Med1 (<i>smaragdina</i>)	vs Med2 (<i>rustica</i>)	0.9783213	0.0362632	0.56426
Med1 (<i>smaragdina</i>)	vs Med2 (<i>smaragdina</i>)	3.3436111	0.1002774	0.0056
Med2 (<i>rustica</i>)	vs Med2 (<i>smaragdina</i>)	3.0033906	0.096873	0.00607*

The values in bold are statistically significant with p-value < 0.05. The asterisk points the only pairwise comparison indicating a differentiation among morphs within a genetic lineage.

Table S6: PERMANOVA analysis of the differentiation and partitioning of the Temperate Clade A SP-ITS2 diversity in *A. viridis*

	df	Sums of squares	F	R ²	P(>F)
Among Morphs	2	0.93	2.1309	0.04088	0.0055
Residual	100	21.8232		0.95913	
Total	102	22.7532		1	
Among Host genetic lineage	3	4.9655	9.2084	0.21823	0.0001
Among Morphs within Host genetic lineage	5	0.8914	0.9922	0.03919	0.4629
Residual	94	16.896		0.74258	
Total	102	22.7532		1	

The values in bold are statistically significant with p-value < 0.05

Table S7: PERMANOVA analysis of the pairwise differentiation and partitioning of the Temperate Clade A SP-ITS2 diversity among *A. viridis* colour morphs

	<i>F</i>	<i>R</i> ²	Adjusted p-value
<i>rufescens</i> vs <i>rustica</i>	3.145227	0.05601949	0.0129
<i>rufescens</i> vs <i>smaragdina</i>	1.963599	0.03118625	0.0546
<i>rustica</i> vs <i>smaragdina</i>	1.614289	0.01842496	0.0763

The values in bold are statistically significant with p-value < 0.05. The p-value was adjusted with an FDR correction.

Table S8: PERMANOVA analysis of the pairwise differentiation and partitioning of the Temperate Clade A SP-ITS2 diversity among *A. viridis* colour morphs considering independently var. *rufescens* from Banyuls (Ban) and from Plymouth (Ply)

	<i>F</i>	<i>R</i> ²	Adjusted p-value
<i>rufescens</i> (Ban) vs <i>rufescens</i> (Ply)	7.327034	0.36045762	0.005
<i>rufescens</i> (Ban) vs <i>rustica</i>	2.458715	0.04778034	0.012
<i>rufescens</i> (Ban) vs <i>smaragdina</i>	1.636725	0.03838767	0.084
<i>rufescens</i> (Ply) vs <i>rustica</i>	3.514543	0.06713353	0.003
<i>rufescens</i> (Ply) vs <i>smaragdina</i>	5.239221	0.09484604	0.0006
<i>rustica</i> vs <i>smaragdina</i>	1.614289	0.01842496	0.084

The values in bold are statistically significant with p-value < 0.05. The p-value was adjusted with an FDR correction.

Table S9: PERMANOVA analysis of the pairwise differentiation and partitioning of the Temperate Clade A SP-ITS2 diversity among *A. viridis* genetic lineages

	<i>F</i>	<i>R</i> ²	Adjusted p-value
BanRuf vs EngCh	5.512642	0.09262977	0.0022
BanRuf vs Med1	1.430598	0.05215337	0.1369
BanRuf vs Med2	1.984534	0.07943049	0.04524
EngCh vs Med1	14.271417	0.15809453	0.0003
EngCh vs Med2	18.941614	0.20601785	0.0003
Med1 vs Med2	2.374094	0.05011376	0.0093

The values in bold are statistically significant with p-value < 0.05. The p-value was adjusted with an FDR correction.

Dynamique d'association hôte-symbiote

III. Dynamique d'association hôte-symbiote

III.1. Un holobiote, un individu changeant ?

Au sein d'un holobiote, l'association entre l'hôte et ses symbiotes est dynamique. Les symbiotes peuvent être présents dès les premiers stades embryonnaires ou s'associer à l'hôte plus tardivement. De plus, au cours de la vie de l'hôte, la population de symbiotes peut changer, en partie ou en totalité, et la dynamique de cette association fait de l'holobiote un individu certes multiple mais surtout changeant, qualitativement (au regard du type de microorganismes associés) et quantitativement (en fonction du nombre de microorganismes présents et/ou de leur proportions relatives).

L'association entre l'hôte et ses symbiotes mutualistes peut s'établir de multiples manières. L'acquisition peut se faire (i) des parents aux descendants tel un legs d'au moins une partie de la diversité symbiotique, on parle alors de *transmission verticale* ; ou bien (ii) par l'acquisition depuis l'environnement des symbiotes localement présents, ce qui correspond à une *acquisition horizontale*. Dans le cas d'une transmission verticale, on s'attend à trouver dans les populations une forte corrélation entre un génotype hôte et la population de ses symbiotes. En effet, une diversité symbiotique donnée sera transmise aux descendants en même temps qu'une partie des gènes parentaux, et seule la mutation pourra introduire de nouveaux variants dans la population symbiotique transmise (Figure III.1-1). La transmission verticale assure la persistance des symbiotes dans les populations hôte, en garantissant une association avantageuse dès les premiers stades de développement et sur de nombreuses générations (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008). Dans le cas d'une acquisition horizontale, pour les espèces dans lesquelles les descendants n'héritent pas directement des symbiotes parentaux, la capacité à accueillir depuis l'environnement des symbiotes permet aux hôtes d'établir une symbiose avec des symbiotes résidant dans le milieu et donc *a priori* adaptés aux conditions locales. Quoi qu'il en

soit, la diversité symbiotique est donc *a minima* la résultante de l'équilibre mutation/dérive au sein de cette population locale de symbiotes, qui peut de surcroît être influencée par la sélection locale chez ces mêmes symbiotes. Par conséquent, dans le cas d'une acquisition horizontale, on s'attend à avoir au final une absence de corrélation entre le génotype de l'hôte et les populations symbiotiques (Ebert 2013).

A ces deux modes de transmission intergénérationnelle, qui permettent un établissement de la symbiose relativement tôt dans la vie des organismes, peut s'ajouter la capacité à acquérir de nouveaux symbiotes au stade adulte à partir du *pool* local de symbiotes (libres dans le milieu ou présents dans les autres hôtes). On considère que les transmissions intergénérationnelles exclusives ne sont pas les plus répandues dans le monde du vivant, mais que la plupart des holobiotés utilise aussi cette acquisition horizontale (Ebert 2013), ce que l'on nomme le *modèle mixte*. Dans un modèle mixte on peut donc s'attendre à une transmission directe d'une partie de la diversité génétique symbiotique d'une génération à l'autre couplée à une homogénéisation locale des contenus symbiotiques entre hôtes (Figure III.1-1).

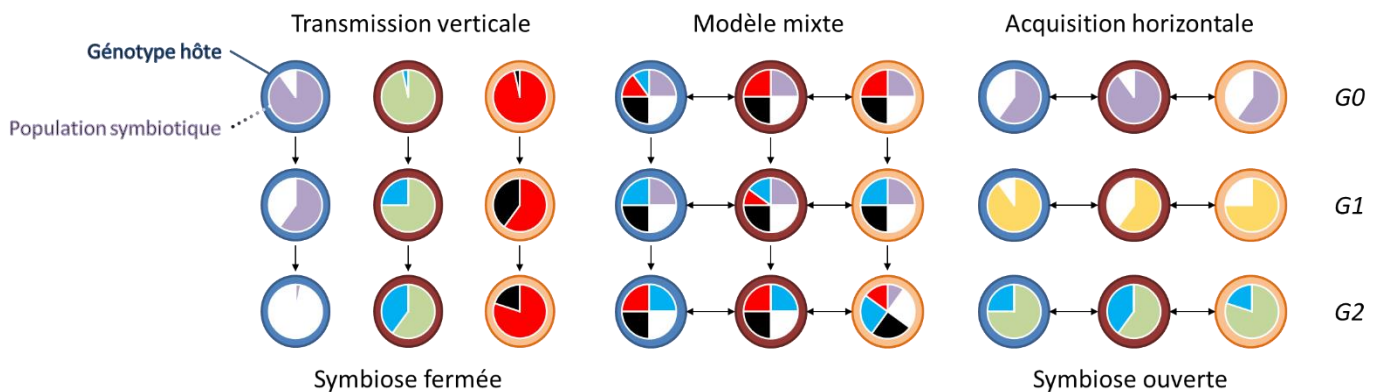


Figure III.1-1 : Influence du mode de transmission des symbiotes sur la diversité génétique symbiotique attendue intra-hôte.

Les flèches verticales illustrent une transmission verticale des symbiotes d'une génération à l'autre, les flèches horizontales illustrent une acquisition horizontale entre individus génétiquement différents sur trois générations (G0, G1 et G2).

(modifiée de Catanéo 2011)

Quel que soit le mode d'acquisition des symbiotes, l'association reste néanmoins dynamique avec une répartition des symbiotes qui peut varier dans le temps et l'espace (Figure III.1-1).

Intra-hôte, la dérive génétique modifiera la composition symbiotique d'une génération symbiotique à l'autre. A ce processus neutre peut s'ajouter l'effet de la sélection. Dans un système vertical strict ou fermé, la sélection intervient au niveau de l'holobiotte puisque hôtes et symbiotes sont en déséquilibre d'association. On aura donc localement une compétition inter-holobiotes : si une combinaison génotype hôte/assemblage symbiotique est nécessaire pour survivre, les holobiotes qui ne l'ont pas disparaîtront (voir par exemple LaJeunesse et al. 2010). En revanche, dans le cadre d'une acquisition horizontale ou d'un modèle mixte, une composition symbiotique sélectivement bonne peut s'échanger entre hôtes ou avec le milieu, ce qui permet une adaptation rapide aux conditions locales.

III.2. Des modes d'acquisition multiples chez *A. viridis* ?

Chez les Cnidaires, les deux modes de transmission intergénérationnelle ont été décrits et ne semblent être reliés ni à la phylogénie des hôtes (Baird et al. 2009) ni à la phylogénie des symbiotes (Swain et al. 2018). Chez les Scléactiniaires (coraux constructeurs de récifs), il a été observé des Symbiodiniacées dans les œufs d'environ un quart des espèces émettant leurs gamètes dans le milieu (appelés *spawners* en anglais), la majorité des coraux acquérant donc leur symbiote au stade larvaire depuis le milieu (Baird et al. 2009). Bien que plus rares, des études montrent que certains coraux semblent également capables d'allier transmission verticale et acquisition horizontale. Par exemple chez le corail à transmission verticale *Stylophora pistillata*, Byler et al. (2013) ont identifié des colonies contenant différents genres de Symbiodiniacées (*Symbiodinium* précédemment clade A et *Cladocopium* précédemment clade C) alors que le symbiote qui leur a été transmis appartenait uniquement à un seul genre, le genre majoritaire dans la colonie mère. Les auteurs ont ainsi suggéré que cette stratégie permettait à ce corail d'acquérir des symbiotes potentiellement mieux adaptés aux conditions environnementales locales en complément du *pool* déjà présent *in hospite*.

Chez *A. viridis*, les Symbiodiniacées sont transmises par la mère et sont déjà présentes dans l'oocyte (avec 300 symbiotes en moyenne et jusqu'à 1000 par oocyte Zamoum *comm. pers.*) au moment de l'émission des gamètes dans le milieu (Schäfer 1984; Utrilla et al. 2019). Ce pool de symbiotes est maintenu tout au long du développement de la larve et augmente au moment de la fixation et de la formation du polype (Zamoum et al. *in prep*) (Figure III.2-1).

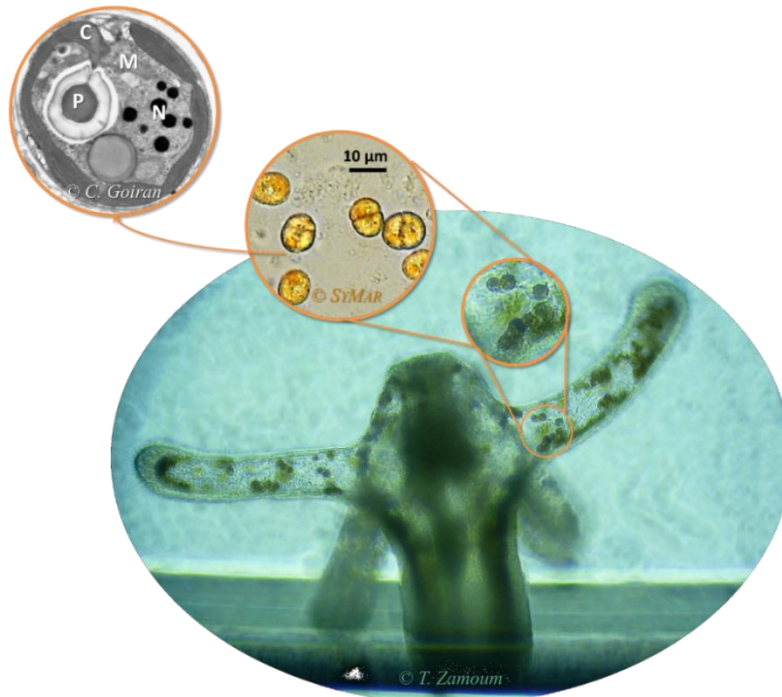


Figure III.2-1 : Photographie d'une larve d'*A. viridis* au stade edwardsia

Les zooms successifs sur les Symbiodiniacées correspondent à des symbiotes en culture observés au microscope optique (© SyMar), et à l'observation d'une coupe en microscopie à transmission (© Goiran) sur laquelle sont identifiés le noyau (N), une mitochondrie (M), un chloroplaste (C) et une organelle d'accumulation/stockage, le pyrénioïde (P).

Ce mode de développement semble donc suggérer l'existence d'une relation fermée entre les deux partenaires avec un transfert vertical strict des symbiotes au stade embryonnaire, qui constituerait ainsi le cheptel de symbiotes à l'état adulte. De précédentes études semblaient également montrer une absence de variation de la population symbiotique au stade adulte chez *A. viridis*. Bythell et al. (1997) ont montré par exemple une absence de variation génétique des symbiotes chez *A. viridis* en réponse aux habitats subtidaux et intertidaux. De plus, Hartle-Mougiou et al. (2012) ont observé que, bien qu'ils soient cultivés pendant une décennie à proximité de Cnidaires contenant principalement des symbiotes de clade C (*Cladocopium*), les individus d'*A. viridis* arboraient toujours uniquement le clade A tempéré. Malgré ces

constatations, aucune étude n'a jusqu'à présent mesuré la dynamique de l'association symbiotique à l'échelle intra-clade, et donc intra-genre des Symbiodiniacées (LaJeunesse et al. 2018). Or, comme démontré dans Porro et al. (2019) (annexe A2), cette diversité n'est pas négligeable et semble même structurée en fonction de la géographie et/ou de la lignée génétique hôte. Nous avons donc mené une étude approfondie de la diversité des symbiotes chez *A. viridis* pour écarter ou non l'existence additionnelle d'une acquisition horizontale des symbiotes chez l'adulte (*i.e.* un modèle mixte de transmission symbiotique) qui pourrait contribuer à la réponse de cet organisme à des environnements contrastés.

Afin de déterminer si la transmission verticale des symbiotes était le seul mode possible d'acquisition des symbiotes, nous avons étudié les corrélations existant ou non entre la diversité génétique des hôtes échantillonnés en Méditerranée et la diversité des assemblages de symbiotes. De plus, nous avons tiré profit des capacités de reproduction asexuée d'*A. viridis* qui produit facilement des populations clonales, pour comparer cette diversité des assemblages de symbiotes entre et au sein des clones. Si la transmission verticale est effectivement stricte, des hôtes génétiquement proches devraient avoir un contenu symbiotique similaire. De façon encore plus marquée, les représentants d'un même clone, aussi distants géographiquement soient-ils, devraient abriter des populations symbiotiques plus proches entre elles que deux anémones prises au hasard.

III.2.1. Echantillonnage de populations méditerranéennes

Cette étude a été menée au sein du morphe *smaragdina* pour lequel nous avons déjà pu nous assurer de sa capacité à produire des clones dans plusieurs sites de la Méditerranée (Mallien et al. 2017; Porro et al. 2019). Nous avons donc échantillonné spécifiquement 237 individus dans cinq sites le long des côtes françaises de Méditerranée nord-occidentale : Banyuls (Ban), Barcarès (Bar), Thau (Tha), Marseille (Mar), et Scandola (Sca) (*cf.* l'article Porro et al. *in prep* annexe A3).

III.2.2. Génotypage

III.2.2.1. Identification des clones chez l'hôte animal

Nous avons utilisé le RAD séquençage (RADseq) afin de générer les SNPs qui ont servi au génotypage des hôtes. L'identification de représentants (*ramets*) d'un même clone (*genet*, selon Harper 1977) est basée sur le partage, à la mutation somatique près, d'un même génotype. Les séquençages de nouvelle génération (NGS), dont fait partie le RADseq, génèrent une telle quantité de marqueurs qu'aucun génotype identique n'a été trouvé de façon répétée dans le jeu de données. Nous avons donc défini par simulation (à l'aide du paquet R RClone, Bailleul et al. 2016) un seuil de distance génétique deux-à-deux en dessous duquel des anémones étaient considérées comme appartenant à la même lignée multilocus (MLL) clonale (Arnaud-Haond et al. 2007). Les MLL ont été définies à partir des SNPs dialléliques partagés par au moins 95% des individus et dont l'allèle le plus rare était présent à une fréquence d'au moins 1% (soit 5299 SNPs). A partir des MLL identifiées nous avons également calculé une richesse clonale (R) en utilisant le nombre de MLL différentes en lieu et place des génotypes :

$$R = \frac{G - 1}{N - 1}$$

où G est le nombre de génotypes différents identifiés dans un échantillon de N individus. Ainsi au plus R est élevé, au moins de ramets d'un même genet ont été échantillonnés.

III.2.2.2. Caractérisation des Symbiodiniacées associées

Chaque anémone contient une population de Symbiodiniacées qui sont tous haploïdes. Mesurer la diversité génétique symbiotique *in hospite* revient donc à génotyper des populations d'organismes haploïdes (Santos & Coffroth 2003). Dans le but de caractériser les Symbiodiniacées au sein d'*A. viridis*, nous avons utilisé une première approche, qui malgré ses défauts, fait référence au sein de la communauté scientifique : l'ITS2. Il permet de mesurer une diversité génétique pertinente au niveau de l'espèce (Coffroth & Santos 2005), dans notre cas

intra-clade A temperé (Figure III.2-2). Les séquences ITS2 obtenues par NGS ont servi à génotyper les Symbiodiniacées à l'aide de la procédure d'analyse SymPortal (Hume 2019; Hume et al. 2019; Porro et al. 2019).

Pour affiner le génotypage des symbiotes et caractériser, non plus les genres/espèces mais les populations de symbiotes, nous avons utilisé des marqueurs microsatellites (Figure III.2-2) car la vitesse d'évolution des microsatellites permet de détecter des évènements évolutifs récents (Cornuet et al. 2010; Posbic Leydet et al. 2018). Les populations de Symbiodiniacées ont été génotypées avec quatre marqueurs microsatellites (table 1 annexe A3): trois obtenus à partir d'une banque d'EST (*Expressed Sequence Tag*) (Sabourault et al. 2009), et un ayant servi au génotypage des populations de symbiotes de la gorgone *Eunicella singularis* (Abdoullaye et al. 2010; Catanéo et al. 2009).

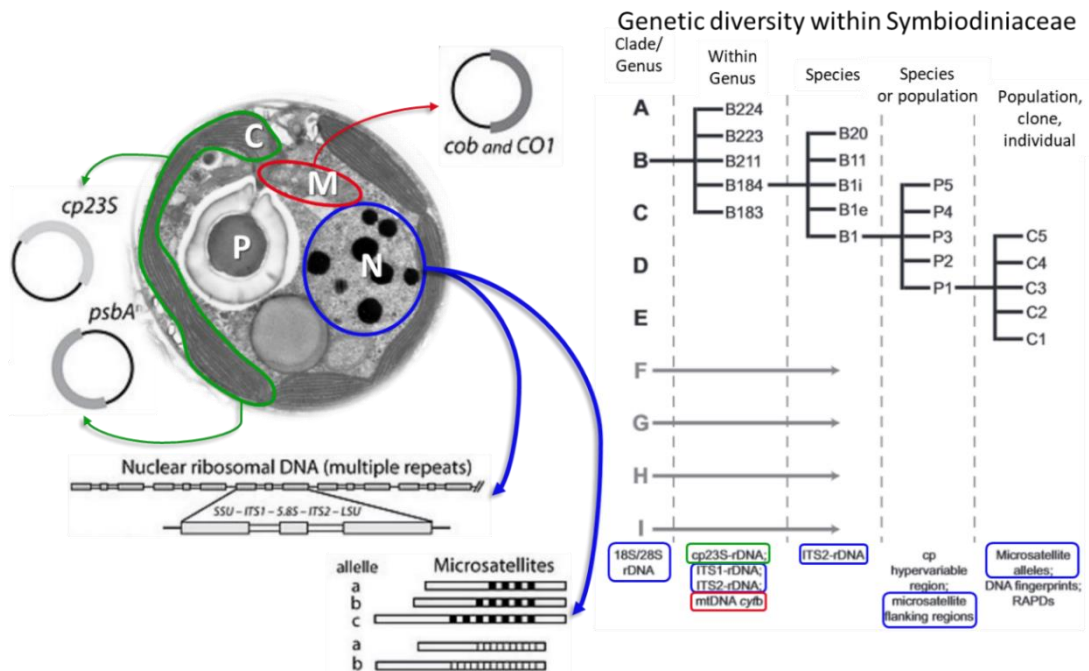


Figure III.2-2 : Récapitulatif des marqueurs utilisés sur les Symbiodiniacées (à droite) et le niveau taxonomique pertinent pour interpréter la diversité génétique mesurée (à gauche). En bleu les marqueurs nucléaires, en rouge les marqueurs mitochondriaux et en vert les marqueurs chloroplastiques.

(schémas modifiés de LaJeunesse et al.; Coffroth & Santos 2005; Thornhill et al. 2017; photo de microscopie de C.Goiran)

Le séquençage de ces marqueurs a été effectué par NGS en Illumina. Cela permet de détecter des allèles rares mais pose le problème du choix des filtres utilisés pour éliminer le bruit de fond et identifier les allèles vrais. Nous n'avons pas d'*a priori* concernant la taille des populations de symbiotes *in hospite*, ni la diversité microsatellite attendue chez *A. viridis*. En effet, chez un autre Cnidaire symbiotique, Pey et al. (2013) et Catanéo (2011) ont pu révéler jusqu'à 7 allèles pour un locus microsatellite au sein d'une même colonie chez un hôte gorgonaire, *Eunicella singularis*. Alors que chez le corail *Acropora palmata*, une unique souche de Symbiodiniacées est détectée dans plus de 80% des colonies (Baums et al. 2014). Nous avons donc choisi de considérer toutes les lectures contenant le motif microsatellite et d'utiliser leur distribution de fréquences relatives pour caractériser les populations de symbiotes dans lesquelles, *de facto*, plus d'un « allèle » intra-hôte pouvait avoir une fréquence supérieure à 25% (Figure III.2-3). Les distances inter-anémone basées sur le contenu symbiotique ont été calculées en utilisant une distance de Manhattan.

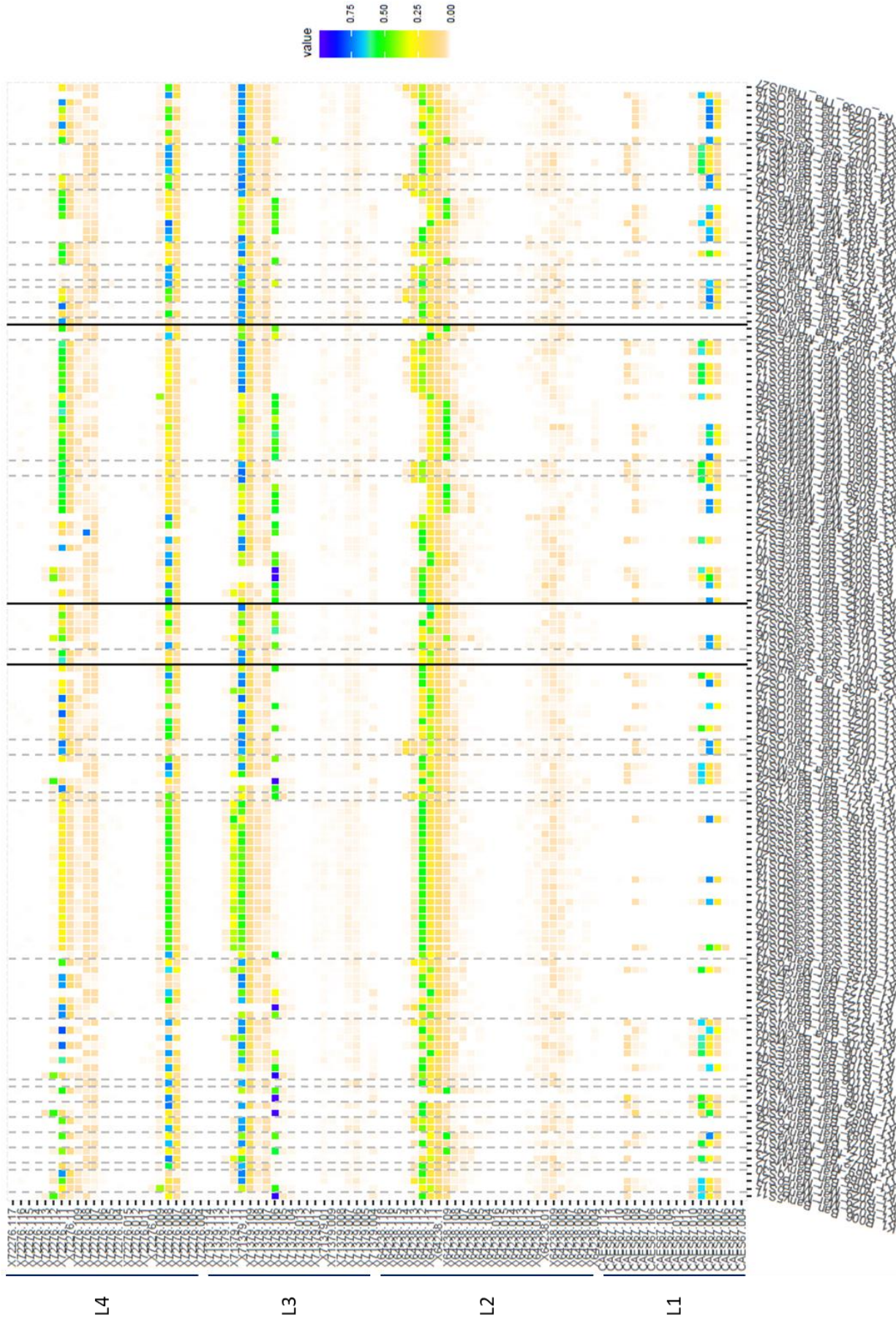


Figure III.2-3 : Distributions des fréquences relatives pour les quatre marqueurs microsattellites de Symbiodiniacées
 Marqueur microsattellite L1 : CAES67, L2 : 64238, L3 : 71379, L4 : 72276. Les lignes continues partitionnent les individus par lignée hôte (Med2(K1), Med4(K2), Med3(K3) et Med1(K4))

III.2.3. Résultats majeurs

III.2.3.1. Des lignées génétiques hôte partageant une même diversité symbiotique

Pour déterminer si des hôtes génétiquement proches se ressemblaient également dans leur contenu symbiotique, nous avons calculé la corrélation entre la distance génétique hôte et la différence de composition symbiotique caractérisée par l'assemblage de séquences ITS2 (Figure 3A, annexe A3) et les distributions microsatellites (Figure 3B, annexe A3). Aucune corrélation statistiquement significative n'a été mesurée sur les 148 individus pour lesquels nous avons pu croiser distances hôte et distances symbiotiques.

Sachant qu'il existait des lignées génétiques hôte différenciées en Méditerranée, nous avons redéfini ces lignées dans ce nouveau jeu de données afin de pouvoir détecter un éventuel effet de ces lignées génétiques sur la composition symbiotique. Nous avons pu identifier quatre lignées génétiques en Méditerranée, les deux lignées précédemment identifiées *Med1* et *Med2*, et *a priori* deux nouvelles lignées (Figure III.2-4) auxquelles nous ferons référence comme *Med3* et *Med4*. Ces lignées sont retrouvées en sympatrie avec un faible niveau d'introgession.

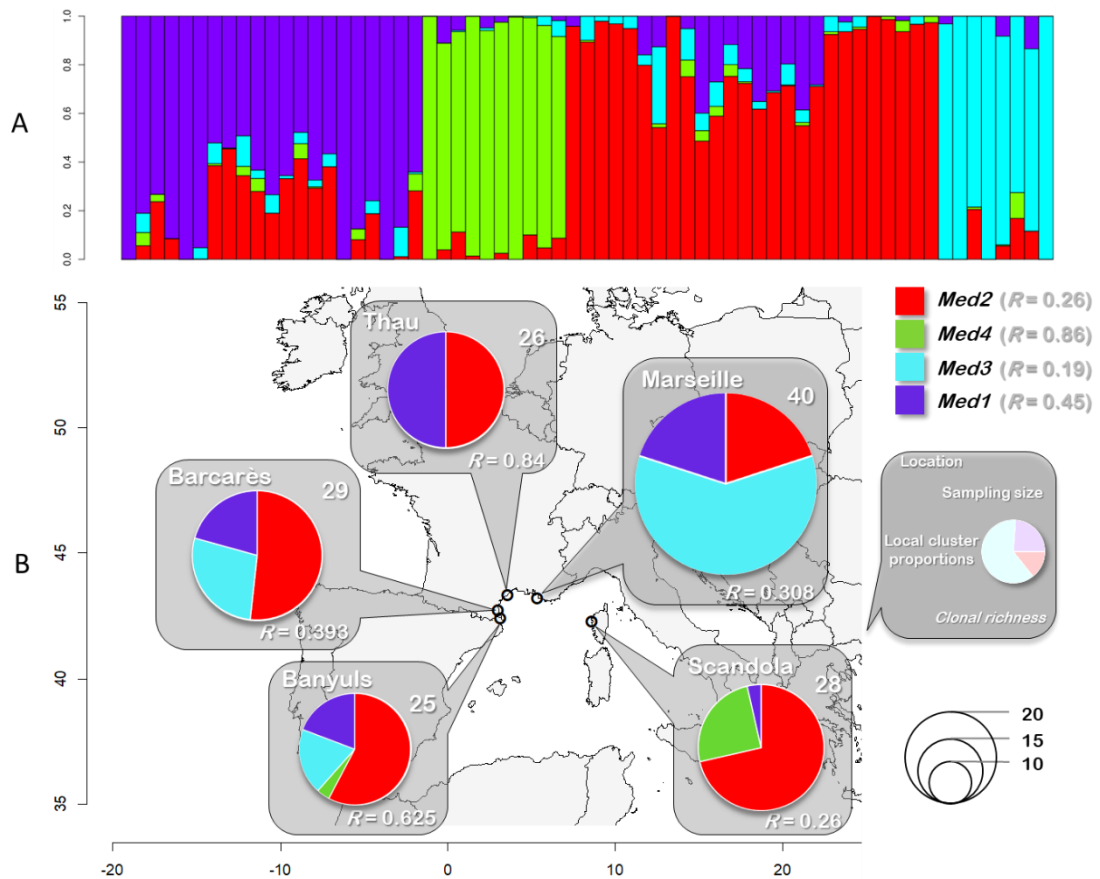


Figure III.2-4 : Identification et répartition des quatre lignées (clusters) méditerranéennes nord-occidentales d'*A. viridis*

A. Probabilité d'attribution des hôtes à chacune des quatre lignées méditerranéennes (sur le jeu de données comptant 1 ramet par genet).

B. Distribution des lignées génétiques par site et estimation de la richesse clonale (R) par site et par lignée

Dans le cadre d'une transmission verticale stricte, on aurait pu s'attendre à une forte corrélation entre les lignées génétiques et leur contenu en symbiotes. Pourtant, les analyses en PERMANOVA sur la composition en symbiotes (caractérisée avec l'ITS2 et les microsatellites, Tableau III.2-1, Table 3 annexe A3), montrent systématiquement que la composition des populations symbiotiques semble plus influencée par l'origine géographique des anémones que par l'appartenance de l'hôte à une des lignées génétiques. Nous n'avons d'ailleurs pas pu mettre en évidence « d'allèles » microsatellites diagnostiques de ces lignées (Figure III.2-3). Ces résultats montrent donc une influence de l'environnement sur le contenu symbiotique des individus d'*A. viridis*, ce qui conforterait une modification possible de l'assemblage des symbiotes chez l'hôte adulte.

Tableau III.2-1 : Différenciation de la composition symbiotique basée sur l'ITS2 (partie supérieure) ou les distributions de microsatellites (partie inférieure)

	Df	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F.Model	R ²	Pr(>F)
Site	4	2.4868	0.6217	2.92662	0.08028	1.00E-05
Lignée	3	0.6705	0.2235	1.05212	0.02165	0.3437
Site x Lignée	7	1.2646	0.18066	0.85043	0.04083	0.857
Résidus	125	26.5536	0.21243		0.85725	
Total	139	30.9755			1	
Site	4	196.64	49.16	15.152	0.2829	1.00E-05
Lignée	3	25.66	8.552	2.636	0.03691	0.00221
Site x Lignée	7	41.29	5.898	1.818	0.0594	0.00566
Résidus	133	431.5	3.244		0.62079	
Total	147	695.09			1	

III.2.3.2. Des « ramets » symbiotiquement différents

L'existence de clones au sein des populations étudiées, nous a permis d'analyser la diversité en symbiotes au sein même des MLL et d'évaluer la dynamique de cette association à cette échelle. De plus, nous nous sommes servis d'une configuration intra-MLL particulière, répétée plusieurs fois dans notre échantillonnage, qui consiste en l'existence de MLL possédant des ramets dispersés dans plusieurs sites, comme par exemple la MLL R106 appartenant à la lignée *Med2* et dont les ramets sont dispersés entre Banyuls, Barcarès et Thau (Figure III.2-5). Ces MLL nous ont permis de comparer les distances symbiotiques obtenues à partir des distributions microsatellites, entre ramets de sites différents (*Inter-Locations*) ou entre ramets d'un même site (*Intra-Locations*), intra-MLL (Figure III.2-5).

MLL	Host lineage	Ban	Bar	Tha	Mar	Sca
R106	Med2	2	5	1		
R123	Med2	3	4		1	
R155	Med2	1				20
R171	Med2	2	2	1		
R042	Med3	5	7		5	
R184	Med1	2	1		4	

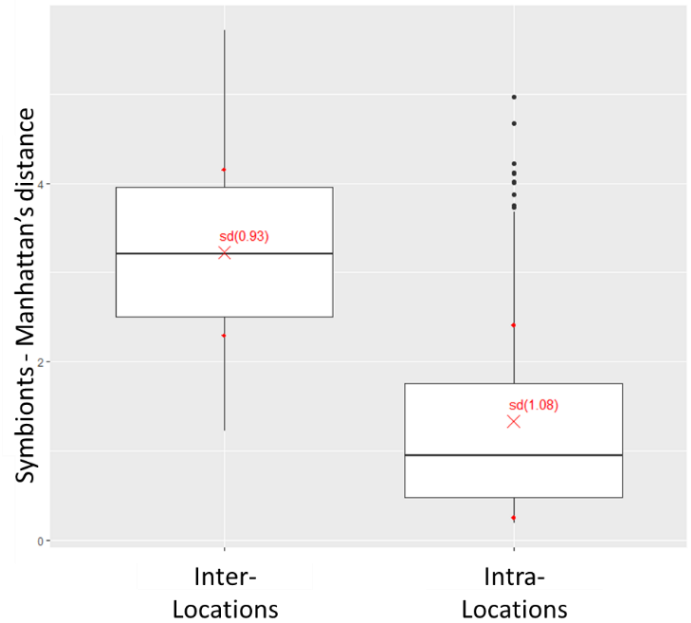


Figure III.2-5 : Analyse du contenu symbiotique au sein de MLL multi-sites.

A gauche : distribution géographique des MLL clonales. Le nombre d'individus appartenant à chaque MLL est donné par site. A droite : Comparaison inter et intra-site des distances symbiotiques intra-MLL. Les croix rouges marquent la moyenne de chaque distribution, l'écart-type est donné entre parenthèse. pvalue du test de Kruskal-Wallis $< 2.2E^{-16}$

Les résultats ont montré qu'à l'échelle même d'un MLL, on observe une différence dans la composition symbiotique en fonction des sites et non en fonction de l'identité génétique de l'hôte. Ces résultats décrivent donc une dynamique possible de l'assemblage symbiotique chez *A. viridis*. De plus, il semble qu'il puisse y avoir plus d'un allèle microsatellite par locus par hôte (cf. Figure III.2-3) ce qui implique une population de différentes souches de Symbiodiniacées et renforce la diversité symbiotique précédemment mesurée avec l'ITS2 (Porro et al. 2019). Dans le cas d'une transmission verticale stricte, cette structuration de la diversité symbiotique pourrait être due à une convergence sélective locale à partir d'un *pool* symbiotique systématiquement divers transmis à chaque larve. Il s'avère que cette même image d'une diversité génétique plus structurée par la géographie que par la lignée génétique hôte, y compris intra-genet, a déjà été observée chez *Acropora palmata*. Or, ce corail, qui est un corail à larve asymbiotique, doit donc acquérir ces symbiotes horizontalement, depuis l'environnement, à chaque génération (Baums et al. 2014). Dans la mesure où l'on considère l'existence d'un modèle mixte d'acquisition chez *A. viridis*, nous pouvons expliquer la structure

Dynamique d'association hôte-symbiote

observée par le partage d'une diversité symbiotique locale entre hôtes génétiquement différenciés. Cette hypothèse est d'autant plus parcimonieuse que l'existence d'un modèle mixte de transmission semble plutôt la règle que l'exception dans les systèmes symbiotiques (Ebert 2013). Un modèle mixte de transmission chez *A. viridis* implique que l'adaptation de l'holobioté à son environnement pourrait se faire à différents niveaux : depuis la population de symbiotes à l'hôte et jusqu'à l'association hôte-symbiote.

Annexes

Dynamique d'association hôte-symbiote

A3. Geography shapes symbiont composition in *Anemonia viridis* lineages from the Mediterranean Sea

GEOGRAPHY SHAPES SYMBIONT COMPOSITION IN *ANEMONIA VIRIDIS* LINEAGES FROM THE MEDITERRANEAN SEA

Porro B., Zamoum T., Mallien C., Hume B.C.C., Voolstra C.R., Furla P.* & Forcioli D.*

*These authors contributed equally: Paola Furla & Didier Forcioli

ABSTRACT

Deciphering the mechanisms of symbiont acquisition in a holobiont is essential to understand its adaptive capacities. In Cnidarian, few species acquire their photosynthetic symbionts directly from their parents but an additional putative acquisition of symbionts at the adult stage is uncertain. In *Anemonia viridis*, a Mediterranean sea anemone with vertical transmission, the capacity for such a horizontal acquisition is still unexplored. To highlight the dynamics of the association between *A. viridis* and its Symbiodiniaceae, we genotyped representatives of animal host clones in five different locations in the Mediterranean Sea. We first identified the existence of multiple *A. viridis* lineages in Mediterranean sea. Then, within lineages and within clones, we measured a differentiation in symbiont composition that depended on the geographical origin of the sea anemones. This result suggests a dynamic relationship between host and symbiont in *A. viridis* with a dose of horizontal acquisition on top of the previously described vertical transmission in *A. viridis*.

KEYWORDS

Symbiodiniaceae, RADsequencing, microsatellite, symbiont acquisition, multilocus lineages

INTRODUCTION

Photosymbionts present in many marine cnidarians (including corals, gorgonians and sea anemones) play key roles on the physiology and ecology of their hosts. Among the anthozoans, the main photosynthetic symbionts are dinoflagellates belonging to the Symbiodiniaceae family. Located intracellularly, the Symbiodiniaceae translocate most of the organic compounds they produce by photosynthesis to their host cells and thus enabled the expansion of

symbiotic cnidarians in oligotrophic waters. The Symbiodiniaceae family comprises different clades, seven of which were described as genera (LaJeunesse et al. 2018) with clear different functional responses to acidification (Brading et al. 2011; Suggett et al. 2012), to temperature (Suggett et al. 2008; Tchernov et al. 2004), and light variation (Reynolds et al. 2008), or to pro-oxidant environment (Roberty et al. 2016). In addition, even within Symbiodiniaceae species, genetic differentiation between symbiont populations was correlated with different thermal sensitivities (Howells et al.

2012).

The cnidarian-dinoflagellate holobiont is deeply diverse with the occurrence of one dominant or multiple symbiont strains within hosts, but also with the presence of different strains among cnidarian individuals in respect to diverse ecological factors (see for review Parkinson & Baums 2014). The photosymbionts can be acquired by the cnidarian hosts in different ways: they can be transmitted from parents to offspring by vertical transmission through asexual or sexual reproduction, allowing for an advantageous association to be maintained through generations (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008), or they can be acquired by an alternative mode of acquisition at larval or adult stage, called horizontal acquisition, which could be hazardous (because of the uncertainty in partner occurrence) but which could represent an efficient way to obtain new or more advantageous symbionts. Why a given coral species picked the vertical or horizontal symbiont acquisition mode is still not understood, but in scleractinian corals, only 25% of spawning species (*i.e.* that emit their gametes directly in the ocean) have photosymbionts in their eggs and belong only to some specific genera (*Montipora*, *Acropora*, *Pocillopora*, and *Porites*; Baird et al. 2009). In contrast, temperate symbiotic sea anemones have mainly vertical “closed acquisition systems” (Muller-Parker & Davy 2001). Although horizontal acquisition in adult cnidarians was poorly studied in the field (excepted after post-bleaching episodes), Byler et al. (2013) demonstrated that some species, as *Stylophora pistillata*, can combine both acquisition modes. However, the capacity to acquire new photosynthetic symbionts at the adult stage in Cnidaria triggered a number of articles, mainly because of the constant improvement of the technique used to estimate symbiotic diversity and to detect cryptic strains (Bonthond et al. 2018; Cunning et al. 2017) but also because it is fundamental to better understanding adaptive capabilities of the association (Lajeunesse et al. 2010).

In *Anemonia viridis*, a species of symbiotic sea anemone widely distributed in Europe, from the Mediterranean Sea to the North Sea, we previously investigated the genetic diversity of the hosted symbionts, using the ITS2 variability gold standard (Porro et al. 2019). In *A. viridis*, a unique Temperate A clade Symbiodiniaceae (LaJeunesse et al. 2018; or A' sensu Savage et al. 2002; and Visram et al. 2006) has been identified, showing nevertheless a clear genetic diversity within the clade (Casado-Amezúa et al. 2014; Porro et al. 2019). In addition, we detected a strong symbiont differentiation in respect to the geographical origin and the host lineage (Porro et al. 2019). Specifically, we revealed the occurrence of different assemblages of Temperate A clade Symbiodiniaceae in at least two lineages of *A. viridis*. The two lineages were however found in two geographical distinct areas, questioning the origin and the geographic or lineage specificity of the host-symbiont association.

A. viridis can reproduce both sexually, emitting gametes in the water column, and asexually. The clonal reproduction occurs by longitudinal fission of the gastrovascular column (from the foot to the mouth) (Shick 1991) and the representatives (ramets) of a same genotype (genet, see Harper 1977) are expected to aggregate in large carpets of clonal individuals (Schmidt 1972). Whatever the reproduction mode, this sea anemone is thought to inherit its photosymbionts by vertical transmission either by (i) maternal transmission through oocytes (Schäfer 1984; Utrilla et al. 2019) with a mean of 300 symbionts per oocytes (personal communication) or (ii) by partitioning of the symbiont population of the “mother” between ramets. The vertical transmission guarantees the continuity of this important trophic association, as the sea anemone holobiont is qualified as almost totally autotrophic (Davy et al. 1996; Muller-Parker & Davy, 2001). However, no study of the dynamic of photobiont populations at the adult stage has been conducted in *A. viridis* so far, although it would fill an important gap in the understanding of the plastic and adaptive capacities of this species. Indeed, many

studies have highlighted its strong capacity for resistance to extreme and perturbed environments (Richier et al. 2005; Suggett et al. 2012; Ventura et al. 2016) but the dynamic and the role of the symbiont genetic diversity has never been questioned in this context. In addition, the eventual occurrence of horizontal symbiont acquisition on top of the vertical transmission may provide a mechanism for adaptation, cumulating the intergenerational stability of the association with the capacity to acquire locally better adapted symbiont strain (Parkinson & Baums 2014). Such flexibility would be beneficial for an organism living in a diverse and changing environment.

To determine whether a closed vertical mode of photosymbiont transmission occur in *Anemonia viridis* or complementary horizontal symbiont acquisition is also possible in this species, we investigated the strength of the link between host genetic diversity and symbiont assemblage. We first delimited reproductively isolated lineages within the *A. viridis* species complex (using RAD sequencing markers), and then compared their photosymbiont contents (based on NGS acquired nuclear ITS2 and microsatellite diversity). We also used the pervasive asexual reproduction occurring within these *A. viridis* lineages to estimate the proximity in photobiont content within and among different sea anemone “clonemates” (as identified with RAD sequencing markers) sampled in distinct geographical locations. We hypothesized that in a strictly closed vertical transmission, ramets from the same genet should be closer from each other for their photobiont content than two sea anemones from different genets, irrespective of their geographical location. In contrast, the occurrence of horizontal symbiont acquisition would be revealed by a strong geographical effect independently of the lineage and/or genet of the host.

MATERIAL AND METHOD

Mediterranean sea anemones

We sampled 237 individuals of *Anemonia viridis* var *smaragdina* from five locations in the Mediterranean eastern basin at Banyuls [Ban, with 50 sea anemones sampled], Barcarès [Bar, 44], Thau [Tha, 48], Marseille [Mar, 49] and Scandola [Sca, 46] (see the legend of the figure 1 for GPS coordinates). For each sea anemone, a dozen tentacles were cut, fixed in 70% ethanol and preserved at 80°C until DNA extraction. Total DNA was extracted as in Mallien et al (2017) following a modified “salting out” protocol (Miller et al. 1988).

Host genotyping

*RAD*sequencing

The libraries were prepared following Porro et al. (2019). Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2000 (100-bp single read format) at MGX (Montpellier, France).

Raw sequence reads were demultiplexed, filtered and clustered with iPyRAD v0.3041 (Eaton 2014) with a clustering threshold set to 90%. We identified the distribution of the missing data by computing the proportion of shared loci between all pairs of individuals in R using the package RADami (Hipp 2014). This led to a selection of a subset of 197 individuals. Over these 197 individuals, the iPyRAD loci were filtered using VCFTools v0.1.15 (Danecek et al. 2011) to keep loci present in at least 95% of individuals (25603 SNPs).

Detection of clonality and MLL identification

To identify the possible multilocus lineages (MLL), we computed between individuals pairwise distances, with the R package RClone (Bailleul et al. 2016), keeping only

SNPs with a minimum allele frequency (maf) of 1% (5299 SNPs over 25603). The observed distributions of pairwise genetic distances thus obtained were compared to simulated distributions of the expected genetic distances under the assumption of purely sexual reproduction (with or without selfing) computed with RClone. This allowed us to define a threshold distance value that we used to affect individuals to MLL using the function `mlg.filter` from the R package `poppr` (Kamvar et al. 2014). We calculated the clonal richness (R) considering the number of MLL as the number of different genotypes over the total number of sampled sea anemones (global, by location and by host genetic cluster).

Structuration of host genetic diversity

To identify putative species in the Western Mediterranean basin, we used only one individual per MLL and a maf of 1% that corresponded to a dataset of 65 individuals with 6498 SNPs, identified as the N65 dataset. We computed the species tree with SVDquartets (Chifman & Kubatko 2014) implemented in PAUP* v4.0A165 (Swofford 1998, 2001) with an exhaustive quartet sampling and a sNMF quantitative hierarchical genetic clustering with the LEA R package (Frichot & François 2015) by computing individual ancestry coefficients. The optimal number of clusters from which the individuals in the dataset could be traced back was determined using the entropy criterion. The result was visualized using a STRUCTURE-like representation showing, for each individual, the relative probability of attribution to each cluster according to its multilocus genotype. The individuals which were not kept into the N65 dataset because they were a repetition of an MLL, were attributed to the same main cluster as their MLL representative in the N65 dataset.

To test whether the snmf clusters and SVD clades were independent species, we compared the likelihood of the species hypothesis they constitute to the likelihood of a primary species hypothesis based on the geographical locations of the individuals. This test was performed using BFD* (Leaché

et al. 2014). In order to manage computing times, these analyses were performed using only a subset of 14 individuals without missing data, with a maf of 0.1 and a LD pruning threshold of 0.2 (SNPRelate package, Zheng 2012) which constituted a dataset of 1197 SNPs. The BFD* analyses were performed in BEAST2 (Bouckaert et al., 2014) with 48 path sampler sets of 100000 MCMC repetitions, to sample in 800000 MCMC iterations of SNAPP (Bryant et al., 2012). The number of SNAPP iterations was chosen to ensure proper convergence of the species tree inference. To ensure the convergence of the computations, the BFD* analyses were run twice, first on the 598 first SNPs and then on the 599 last ones.

The Wright's F-statistic among and within populations were computed using the R packages StAMPP (Pembleton et al. 2013) and hierfstat (Goudet & Jombart 2015).

Photosymbiont genotyping

ITS2 sequences

The symbiont populations were genotyped using the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). We used the primers from Stat et al. (2009): the forward *itsD* (5'-GTGAATTGCAGAACTCCGTG-3') and the reverse *its2rev2* (5'-CCTCCGCTTACTTATATGCTT-3').

Table 1: Detail of the symbiont microsatellite markers sequenced by NGS

	Locus	Symbiodiniaceae ex	Motif	Reference
1	CAES-67	<i>Eunicella singularis</i>	GT	Catanéo et al. 2009 (FJ917549.1)
2	64238		CA	
3	71379	<i>Anemonia viridis</i>	CT	present study
4	72276		AG	

Microsatellite markers

The symbiont populations were also genotyped using four microsatellites: three designed from an Expressed Sequence Tag library of *A. viridis* holobionts (Sabourault et al. 2009) and one from the study of Catanéo et al (2009; and Abdoullaye et al. 2010) about the temperate symbiotic Symbiodiniaceae from the Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis* (with the NCBI accession number FJ917549.1, table 1). These markers are particularly useful to genotype populations instead of species (Coffroth & Santos 2005) as they are more informative on recent evolutive events (Cornuet et al. 2010; Leydet & Hellberg 2016).

Genotyping PCR amplifications of the microsatellite loci were performed by Access Array (FLUIDIGM) PCR and next generation sequencing of the amplicons were obtained by MiSeq Illumina Technology (2x250bp paired-end) at the Brain and Spine Institute (ICM, Paris, France). The symbiont populations were not successfully amplified from all the sampled individual, and only 148 sea anemones could be genotyped for both host and symbiont microsatellite markers. These individuals composed the N148 dataset (table S1).

The ITS2 sequences were validated as variants with the SymPortal pipeline (Hume 2019; Hume et al. 2019) based on a minimum entropy decomposition algorithm, as in Porro et al. (2019).

For the microsatellite markers, the forward and reverse reads were assembled, then trimmed and tagged by microsatellite locus using OBITools scripts (Boyer et al. 2016).

To filter background noise and to identify reads with actual microsatellite repeats, we used the MicNeSs python script (Suez et al. 2016) with a tolerance of one substitution in the microsatellite motif. Because MicNeSs was designed for diploid organisms, and because we did not want to bias the genetic diversity by forcing a maximum of two microsatellite alleles per symbiont population, we choose to consider for each individual, instead of the genotype, the raw observed distribution of the reads containing a given microsatellite. We kept for further analysis only the sea anemones with a distribution (i.e. with genetic information) for at least three out of the 4 photobiont microsatellite markers used.

Symbiont differentiation

We compared the different composition in photosymbionts using the presence/absence of the ITS2 variants among the hosts. For the microsatellite markers we compared the observed relative frequency distributions of the reads. The differentiation among photosymbiont contents of the hosts was expressed as a Jaccard's distance (for ITS2 variants assemblage) and a Manhattan's distance (for microsatellite markers). We measured the correlation between photobiont population distance and host genetic distance by Mantel's tests. We also tested by PERMANOVA with the R package vegan (Oksanen et al. 2016) the difference in composition of photobiont populations among sea anemones depending on (i) the host genetic clusters, or (ii) the sampling location. When these factors had an effect on the distribution of the genetic diversity of the symbionts, we then computed pairwise PERMANOVAs between each level of the

given factor with an FDR correction to avoid false positives. The Manhattan's distances were also used to compare the differentiation within multi-location MLL.

RESULTS

Clonality in *A. viridis* populations

According to RClone analysis, we detected 65 multilocus lineages (MLL) with a genetic distance threshold set to 390 (figure S1) over the 197 sea anemones sampled, with 37 MLL considered as unique and 28 MLL with at least two representatives (table S1). These 28 MLL corresponded to clonal MLL. We hence estimated a global clonal richness of 0.33. The clonal MLLs could be found in different distant sampling locations (table S1).

To identify independent genetic pools, we performed a snmf genetic clustering. Based on minimum cross-entropy value (figure S2), we determined $K=4$ as the optimal number of genetic clusters in the N65 dataset. Among these four different genetic groups, two of them seemed to be more admixed (K1 and K4, figure 1.A): more than a third of the sea anemones in K1 had at least 15% of their loci from K4 and more than half of the sea anemones in K4 admixed with the K1 cluster (figure 1.A and table S1). All these clusters were found in at least two different sampling locations (figure 1.B) with K1 being the most common cluster.

We also used SVDquartets to produce a

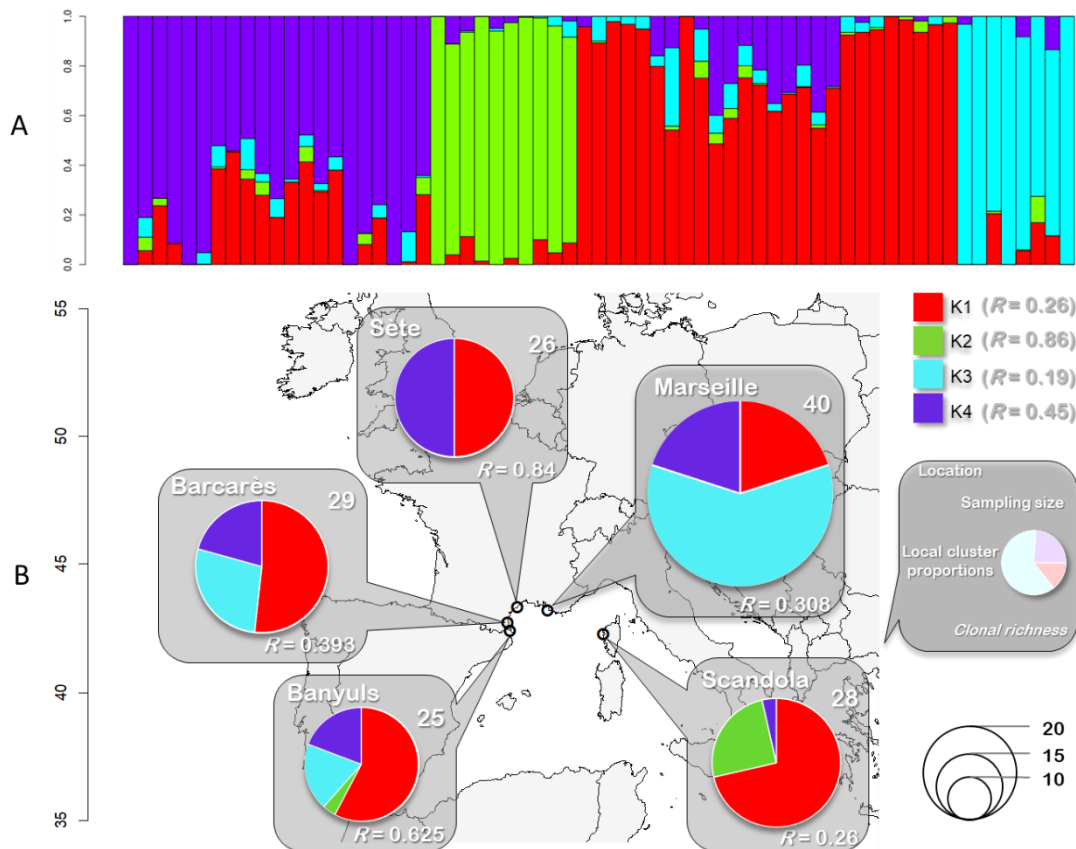


Figure 1: Structuration of the genetic clusters in Mediterranean Sea. A. 4 genetic cluster (snmf) of animal host detected in Mediterranean Sea over the N65 dataset. B. Sampling locations with the proportion of each cluster (N148 dataset) per location (Banyuls: 42°28'50''N 03°07'50''E; Barcarès: 42°47'15.828''N 3°2'11.633''E; Sète: 43°23'32.82''N 3°36'1.43''E; Marseille: 43°17'44.337''N 5°20'34.348''E; Scandola: 42°21'29.571''N 8°33'19.166''E).

Host genetic structure

Table 2: Test of species hypothesis by BFD*. The four species hypothesis tested were (1) a geographic partitioning (the primary species hypothesis), (2) the snmf clustering, (3) the SVDquartets partitioning and (4) an intermediate SVDquartets partitioning considering the K1 and K4 admixture.

	Species hypotheses	MLE	2 ln BF			MLE	2 ln BF		
			1 vs	2 vs	3 vs		1 vs	2 vs	3 vs
1	Ban/Bar/Mar/Sca/Tha	-8844.82				-9010.55			
2	K1/K2/K3/K4	-8478.39	-732.85			-8694.89	-631.32		
3	Clade1/Clade2/Clade3/Clade4	-8506.24	-677.16	55.69		-8713.98	-593.15	38.17	
4	Clade2/(Clade1+Clade4)/Clade3	-8584.71	-520.22	212.63	156.94	-8793.75	-433.60	197.72	159.54

coalescent taxonomic partitioning from the N65 dataset (figure S3). The SVDquartets analyses showed four clades (with three of them clearly split from each other). These clades are at least partially congruent with the clusters identified by the snmf analysis: the clade 2 and 3 corresponded to the clusters K2 and K3 respectively, and the clade 4 corresponded to a part of the cluster K4 (table S1).

To resolve the discrepancies between snmf and SVDquartet genetic partitioning of the sea anemones, we tested the likelihood of the different secondary species hypotheses (SSH) they constitute using BFD*. The snmf clusters revealed the best SSH using Bayes Factor comparisons (table 2). The incongruence between quantitative genetic clustering and coalescent analysis was probably due to the detected admixture among clusters, with seven admixed individuals of the cluster K4 belonging to the clade 1 (tables S1). This admixture explained the lowest F_{ST} value, of 0.119, obtained between K1 and K4, compared with the other pairwise differentiations (table S2). The K2 cluster appeared as the most differentiated genetic cluster in Mediterranean Sea with pairwise F_{ST} values from 0.242 to 0.350.

Symbiont differentiation

The two types of genetic markers (ITS2 and microsatellites) used to genotype the symbiont populations revealed two different pictures of the symbiotic composition over the sampled sea anemones with no clear partitioning of the dataset based on ITS2 variants (figure 2.A) nor microsatellite markers (figure 2.B). Independently of the

host genetic cluster membership, we tested the correlation between host genetic distances and the difference in photosymbiont content. The analysis showed no global correlation in the N148 dataset neither with ITS2 assemblages (Mantel's $r = -0.06$ and a p-value of 0.839, figure 3.A) nor with microsatellite markers (with a Mantel's $r = 0.06$ and a p-value of 0.086, figure 3.B). However, with the both types of markers, we detected a global effect of the location origin on the symbiont composition with PERMANOVA, and a weak effect of the host genetic cluster only with microsatellite markers (table 3), with similar symbiont content among clusters at the same location (table S4).

At a finer genetic scale, we used the MLL found at different locations to evaluate the differentiation of the symbiotic content within a genet. Six of the identified MLL were distributed in at least two locations with at least 2 representatives within a location (table 4). Within these six MLL, the symbiotic distances among individuals from the same location were significantly lower (1.33) than the distances among individuals from different locations (3.22, figure 4).

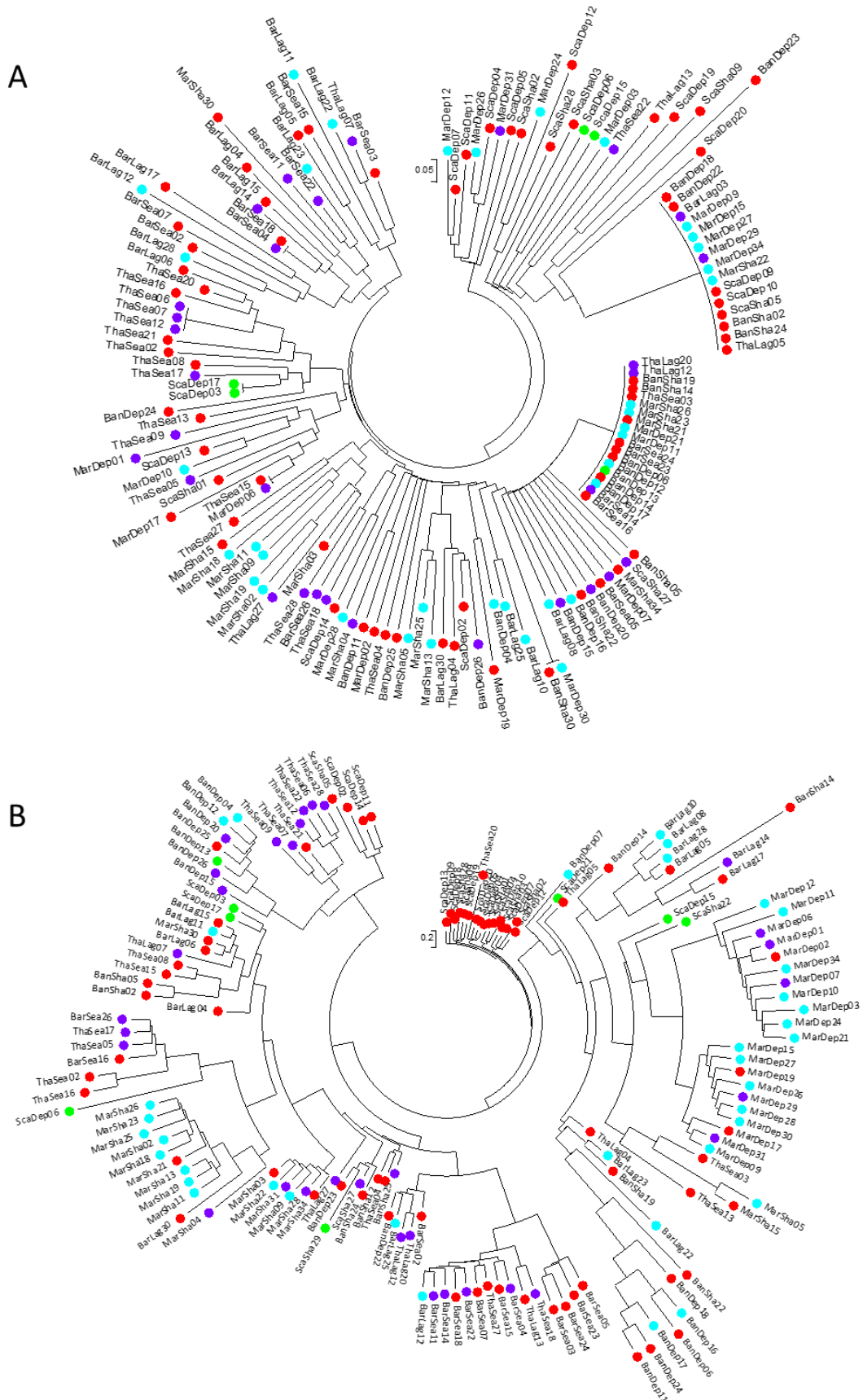


Figure 2: Distances among sea anemones based on photosymbiont composition: A. NJ tree based on Jaccard's distances among sea anemones ITS2 assemblages; B. NJ tree based on Manhattan's distances among sea anemones microsatellite distributions. Colours correspond to host genetic clusters from the figure 1.

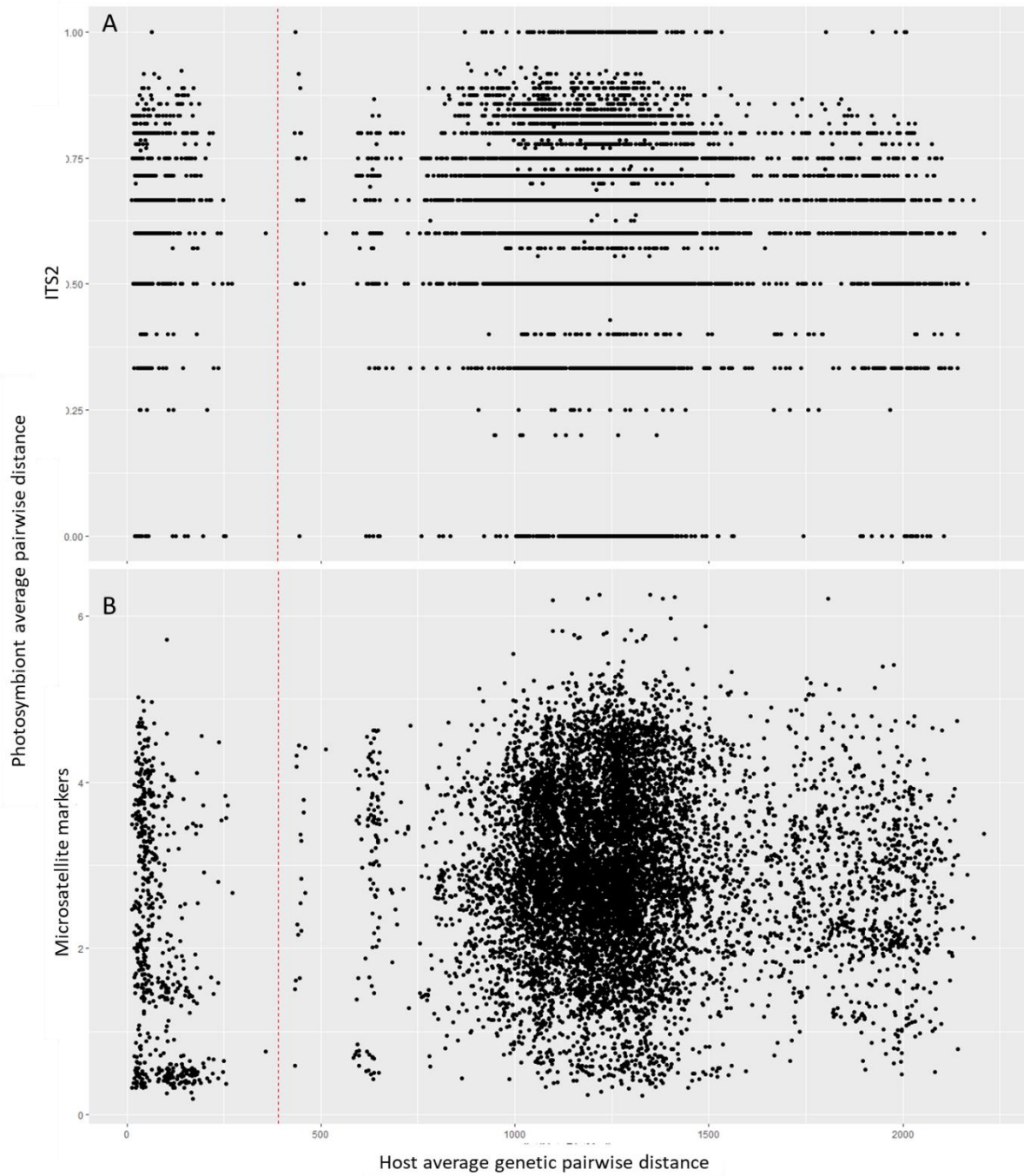


Figure 3: Host genetic distances among sea anemones against symbiont compositions: A, considering the symbiont ITS2 sequences assemblage (Jaccard's distance - with a Mantel's $r = -0.06$ and $p\text{-value} = 0.839$); B, based on symbiont microsatellite distributions (Manhattan's distance - with a Mantel's $r = 0.06$ and $p\text{-value} = 0.086$).

Table 3: Differentiation of symbiont compositions based on ITS2 sequences (upper part) or microsatellite distributions (lower part).

	Df	Sums of squares	Mean Sqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Location	4	2.4868	0.6217	2.92662	0.08028	1.00E-05
Cluster	3	0.6705	0.2235	1.05212	0.02165	0.3437
LocationxCluster	7	1.2646	0.18066	0.85043	0.04083	0.857
Residuals	125	26.5536	0.21243		0.85725	
Total	139	30.9755			1	
Location	4	196.64	49.16	15.152	0.2829	1.00E-05
Cluster	3	25.66	8.552	2.636	0.03691	0.00221
LocationxCluster	7	41.29	5.898	1.818	0.0594	0.00566
Residuals	133	431.5	3.244		0.62079	
Total	147	695.09			1	

PERMANOVAs were realised over 99999 permutations. The bold values indicate factors with statistically significant effect on the symbiont differentiation.

DISCUSSION

Multiple *A. viridis* lineages in the Mediterranean sea and clonality levels

In this article we asked if the symbiont diversity observed in *A. viridis* adult individuals was only the result of a closed vertical transmission or if secondary horizontal acquisition and/or local selection could also occur and modify the symbiont population in respect to the environment. As we previously identified cryptic species in *A. viridis*, it was critical to first identify to which lineage the sampled individuals did belong. After taking clonality into account, we could group the sampled individuals into 4 genetic clusters, recognized by BFD* as four independent lineages. As a subset of samples used in this study had been already analysed in Porro et al. (2019), we could recognize that the K1 and K4 clusters from this study corresponded respectively to the Med2 and Med 1 lineages from Porro et al. (2019). Moreover, having increased the Mediterranean sampling, we were now able to define two new lineages in this zone, Med3 and Med4, that corresponded to the clusters K3 and K2 respectively (figure 1 and Table 2). In all sites, lineages were found in sympatry with different degrees of introgression among them. As previously found (Porro et al. 2019), Banyuls was the most genetically diverse site (with the presence of the four lineages),

supporting the theory of the presence of a strong contact zone between genetic pools in this Mediterranean zone. In addition, we can underlie the ubiquitous presence of the Med2 (K1) lineage at all sites, suggesting a significative capacity of this lineage to occupy different habitats. In all lineages and sites, we detected an important clonal richness, which confirmed that the *A. viridis* can deploy large MLLs (Sauer, 1986; Sauer et al., 1986; Wiedenmann et al., 2000b, Mallien et al. 2017; Porro et al. 2019), even if, within this sampling, the Med4 (K2) lineage exhibited a much lower clonality. It could be interesting to note that the Med2 (K1) lineage did show varying levels of clonality from one site to the other (R varied from 0,05 in Scandola to 0,9 in Thau), in a way similar to what had been observed in another sea anemone *Metridium senile* (Hoffmann 1986). More surprisingly, the ramets of Med1 (K4), Med2 (K1) or Med3 (K3) genets were not always located at the same site and some MLLs were constituted of individuals present in distant sites (tables 4 and S1), suggesting a potentially high capacity of migration/dispersion in this species, as already pointed to in Porro et al. (2019). To disperse, adult sea anemones may detach and move up to several meters away (Ayre 1984; Mackie 1974; Shick 1991), but long-distance

Table 4: Geographical distribution of multi locations clonal MLL. The number of individuals belonging to the MLL is given for each location.

MLL	Cluster	Ban	Bar	Tha	Mar	Sca
R106	K1	2	5	1		
R123	K1	3	4		1	
R155	K1	1				20
R171	K1	2	2	1		
R042	K3	5	7		5	
R184	K4	2	1		4	

migration could likely occur by rafting attached to freely drifting natural (as wood) or artificial (as ships' bottoms) substrates (Jackson 1986). *In fine*, even if established sea anemone clones have been considered as highly locally adapted (Ayre 1985), migration and successful new establishment of ramets are not rare in *A. viridis*.

Strong symbiont differentiation among geographical sites

In a closed vertical symbiont transmission, we expected that closely related hosts would harbour a more similar symbiont diversity. In this context, we performed an analysis of the symbiont diversity within *A. viridis* species complex using ITS2 and microsatellites sequence variants. The analysis of ITS2 variants is a standard method for genotyping Symbiodiniaceae populations despite its multicopy nature, which complicates data interpretation (see Hume et al. 2019), and, as such, had already been used in the precedent work (Porro et al. 2019). In complement, to improve strain delineations within Temperate A clade Symbiodiniaceae, we analysed the raw observed allele size distributions at four microsatellite loci. With both markers (ITS2 and microsatellites), no correlation has been revealed between the genetic distances among symbionts and the genetic distances among their hosts (figure 3) suggesting that the closed vertical transmission is not the only mechanism of symbiont acquisition in the adult hosts. Our results also showed that

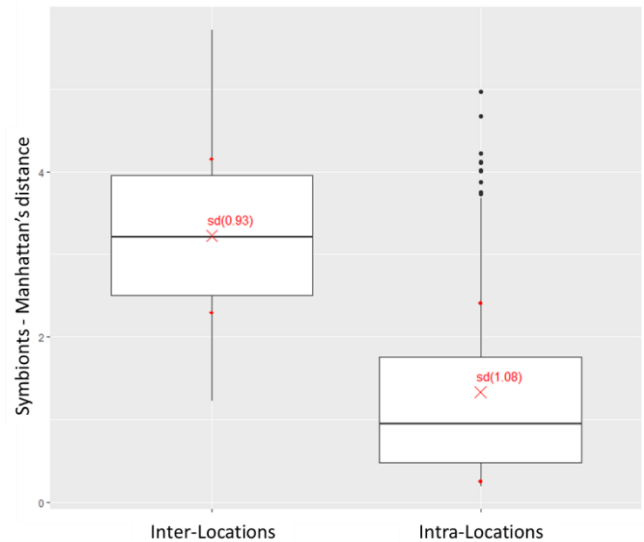


Figure 4: Intra-MLL microsatellite local differentiation of symbiont populations (Kruskal-Wallis test p -value $< 2.2E^{-16}$). The red crosses correspond to the averages of Manhattan's distances of the distributions the standard deviation is given in brackets.

the symbiont ITS2 diversity was only and strongly linked to the geographical site of sampling, a result confirmed by the microsatellite diversity, which was also weakly linked to the host genetic lineage. Indeed, all but one of the within site comparisons of symbiont microsatellite diversity between host lineages were non significant and the correlation between microsatellite size distribution and host lineage was significant only in Scandola, where a strong differentiation between the lineages of Med2(K1) and Med4(K2) occurred (table S4). This was likely due a huge effect of the host clonality on the symbiont differentiation (preponderance of the MLL R155 at this site). The presence of this large MLL is surprising and could reflect a sampling artefact but could also be the consequence of the dominance of a highly aggressive clone, a phenomenon already identified in sea anemones by Ayre and Grosberg (1995).

Following the approach of Baums et al. (2014) in a coral species, we took advantage of the high frequency of asexual reproduction in *A. viridis* to test for the tightness of the closed vertical symbiont transmission in *A. viridis*, by comparing the symbiont diversity between

clone mates. If symbiont diversity is only the result of mother to offspring symbiont transfer, clonal individuals (ramets in a genet or MLL) present or not in the same site, should be dominated by the same symbiotic population. We however observed that individuals from the same MLL displayed a more similar symbiotic population if sampled in the same site than in distant sites (figure 4). Considering the high probability that the revealed microsatellite diversity is neutral, this result is strongly in favour of the occurrence of horizontal acquisition of symbionts at the adult stage in *A. viridis*, and thus against the hypothesis of a closed vertical transmission of symbionts. This result anyway highlights the potential for plastic response of *A. viridis* lineages to the environment, by modifying their symbiont contents. While a previous study stated that no genetic variation of the symbiotic algae occurred in *A. viridis* in response to subtidal and intertidal habitats (Bythell et al. 1997) or after living for a decade in proximity to cnidarians containing mostly clade C symbionts (Hartle-Mougiou et al. 2012), this capacity has never been investigated at this symbiont diversity scale using ITS2 and microsatellite markers and sampling distant *A. viridis* populations.

However, the mechanism involved in this symbiont flexibility cannot be unambiguously resolved yet as it could still be putatively due to i) a renewal of the symbiont content by horizontal acquisition from the environment at the adult stage; ii) convergent changes in symbiont frequency within large inherited symbiont populations. In the coral *Montipora capitata*, comparing ITS2 sequence assemblages in eggs and their parent colonies, Padilla-Gamino et al. (2012) demonstrated that the eggs harboured a large range of ITS2 sequences and that the symbiont assemblages in the eggs were strongly influenced by the symbiont composition of the parent colony, which in turn differed and reflected characteristics of their physical environment. In *M. capitata*, an environmental selection of the inherited symbiont diversity is then more plausible, as was also strongly suggested by Quigley et al.

(2019) in another species of the same genus. However, these *Montipora* species harbour different genus (or species) of Symbiodiniaceae, known to have different ecophysiological profiles. Therefore, the balance in proportion of these different symbiont strains within a host could very likely be influenced by local selection. In our case, considering that *A. viridis* harbours only Temperate A clade Symbiodiniaceae, to explain the observed pattern of local similarity in symbiont composition among host MLL or even lineages by convergent selection without horizontal acquisition, one would have to imagine that each host larva, independently of its mother affiliation to a clone or to a reproductively isolated lineage, should inherit the whole complement of symbiont genetic diversity that would allow for such local differentiation. This would mean that adult anemones that belong to genetically differentiated lineages still manage to transfer to their offspring a wide array of microsatellite diversity, despite generations of local adaptation and successive bottlenecks (at the production of the ovule). A dose of horizontal acquisition from local seawater seems a more parsimonious explanation of the observed distribution of symbiotic diversity. Indeed, a very similar pattern of variability in symbiont population among host ramets had also been observed in *Acropora palmata*, a coral species that acquires its symbiont from the environment at each generation (Baums et al. 2014).

Additional horizontal symbiont acquisition in host with maternal vertical symbiont transmission has already been suggested in some corals as *Pocillopora meandrina*, *Pocillopora damicornis*, *Stylophora pistillata* and *Seriatopora hystrix* (Magalon et al. 2006; Byler et al. 2013; Boulotte et al. 2016; Quigley et al. 2018). In addition, analysing specifically the within colony symbiotic diversity in *Pocillopora* sp., Pettay et al. (2011), also strongly suggested that switching may occur between clonal host lineages and that this species can mix vertical and horizontal symbiont acquisition. Mixed mode of symbiont acquisition seems then to be

possible in symbiotic cnidarians and confirm the conclusions of Ebert (2013) stating that symbionts with mixed-mode of transmission may be the most common type of symbiont on Earth and conversely uniparental vertical transmission would be rare and limited to a few obligate mutualistic prokaryotic symbionts.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the ANR Bioadapt research program “AdaCni” (ANR-12-ADAP-0016) as a PhD grant to CM and by a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche to BP. We thank A.Pey, A.Haguenauer, R.Rodolpho-Metalpa, IMBE and M.Wanguemert for their contribution to the sampling effort. We thank M.Suez and G.Achaz for constructive discussion about MicNeSs algorithm and D.Bailleuil for her kind and wise “after-sales service” for RClone. We thank R. Christen for his scientific discussions and the access to the computing facilities. We also thank P.-A.Gagnaire and L.Sromek for the RADseq individual tags; P.Barbry from IPMC who gave us the authorization to use the CovarisB sonicator and V.Magnone and M.-J.Arguel for their help during its utilization.

REFERENCES

- Abdoullaye D, Acevedo I, Adebayo AA, Behrmann-Godel J, Benjamin RC, et al. 2010. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2009–30 September 2009. *Mol. Ecol. Resour.* 10(1):232–36
- Ayre DJ. 1984. Effects of environment and population density on the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Mar. Freshw. Res.* 35(6):735–46
- Ayre DJ. 1985. Localized Adaptation of Clones of the Sea Anemone *Actinia Tenebrosa*. *Evolution.* 39(6):1250–60
- Ayre DJ, Grosberg RK. 1995. Aggression, Habituation, and Clonal Coexistence in the Sea Anemone *Anthopleura elegantissima*. *Am. Nat.* 146(3):427–53
- Bailleuil D, Stoeckel S, Arnaud-Haond S. 2016. RClone: a package to identify MultiLocus Clonal Lineages and handle clonal data sets in R. *Methods Ecol. Evol.* 7(8):966–70
- Baird AH, Guest JR, Willis BL. 2009. Systematic and Biogeographical Patterns in the Reproductive Biology of Scleractinian Corals. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40(1):551–71
- Baums IB, Devlin-Durante MK, LaJeunesse TC. 2014. New insights into the dynamics between reef corals and their associated dinoflagellate endosymbionts from population genetic studies. *Mol. Ecol.* 23(17):4203–15
- Bonthond G, Merselis DG, Dougan KE, Graff T, Todd W, et al. 2018. Inter-domain microbial diversity within the coral holobiont *Siderastrea siderea* from two depth habitats. *PeerJ.* 6:e4323
- Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2016. OBITOOLS: a UNIX -inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 16(1):176–82
- Brading P, Warner ME, Davey P, Smith DJ, Achterberg EP, Suggett DJ. 2011. Differential effects of ocean acidification on growth and photosynthesis among phylotypes of *Symbiodinium* (Dinophyceae). *Limnol. Oceanogr.* 56(3):927–38
- Byler KA, Carmi-Veal M, Fine M, Goulet TL. 2013. Multiple Symbiont Acquisition Strategies as an Adaptive Mechanism in the Coral *Stylophora pistillata*. *PLoS ONE.* 8(3):e59596

- Bythell JC, Douglas AE, Sharp VA, Searle JB, Brown BE. 1997. Algal genotype and photoacclimatory responses of the symbiotic alga *Symbiodinium* in natural populations of the sea anemone *Anemonia viridis*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 264(1386):1277–82
- Casado-Amezúa P, Machordom A, Bernardo J, González-Wangüemert M. 2014. New insights into the genetic diversity of zooxanthellae in Mediterranean anthozoans. *Symbiosis.* 63(1):41–46
- Catanéo J, Ortu M-F, Furla P, Forcioli D. 2009. Development of microsatellite loci from a Mediterranean symbiotic gorgonian, *Eunicella singularis* (Cnidaria, Anthozoa), and its temperate-A *Symbiodinium*. *Mol. Ecol. Resour.* 10:232–36
- Chifman J, Kubatko L. 2014. Quartet Inference from SNP Data Under the Coalescent Model. *Bioinformatics.* 30(23):3317–24
- Coffroth MA, Santos SR. 2005. Genetic Diversity of Symbiotic Dinoflagellates in the Genus *Symbiodinium*. *Protist.* 156(1):19–34
- Cornuet J-M, Ravigué V, Estoup A. 2010. Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v.1.0). *BMC Bioinformatics.* 11
- Cunning R, Gates RD, Edmunds PJ. 2017. Using high-throughput sequencing of ITS2 to describe *Symbiodinium* metacommunities in St. John, US Virgin Islands. *PeerJ.* 5:e3472
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, et al. 2011. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 27(15):2156–58
- Davy SK, Lucas IAN, Turner JR. 1996. Carbon budgets in temperate anthozoan-dinoflagellate symbioses. *Mar. Biol.* 126(4):773–783
- Eaton DAR. 2014. PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics.* 30(13):1844–49
- Forcioli D, Merle P, Caligara C, Ciosi M, Muti 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
- Frichot E, François O. 2015. LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods Ecol. Evol.* 6(8):925–29
- Goulet J, Jombart T. 2015. Hierfstat: estimation and tests of hierarchical F-statistics. R Package Version 004-22
- Harper JL. 1977. *Population Biology of Plants.* UK, London: Academic Press.
- Hartle-Mougiou K, D'Angelo C, Smith EG, Burt J, West P, Wiedenmann J. 2012. Diversity of zooxanthellae from corals and sea anemones after long-term aquarium culture. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 92(4):687–91
- Hipp AL. 2014. RADami: R package for phylogenetic analysis of RADseq data. R Package Version. 1–0
- Hoffmann RJ. 1986. Variation in contribution of asexual reproduction to the genetic structure of populations of the sea anemone *Metridium senile*. *Evolution.* 40(2):357–65
- Howells EJ, Beltran VH, Larsen NW, Bay LK, Willis BL, van Oppen MJH. 2012. Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nat. Clim. Change.* 2(2):116–20
- Hume BCC. 2019. Didillysquat/SymPortal_framework: V0.2.7. Zenodo
- Hume BCC, Smith EG, Ziegler M, Warrington HJM, Burt JA, et al. 2019. SymPortal: A novel analytical framework and platform for coral algal symbiont next-generation sequencing ITS2 profiling. *Mol. Ecol. Resour.* 19(4):1063–80
- Jackson JBC. 1986. Modes of dispersal of clonal benthic invertebrates: consequences for species' distributions and genetic

- structure of local populations. *Bull. Mar. Sci.* 39:19
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ.* 2:e281
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, et al. 2018. Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Curr. Biol.* 28(16):2570-2580.e6
- LaJeunesse TC, Smith R, Walther M, Pinzón J, Pettay DT, et al. 2010. Host-symbiont recombination versus natural selection in the response of coral-dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 277(1696):2925-34
- Leaché AD, Fujita MK, Minin VN, Bouckaert RR. 2014. Species Delimitation using Genome-Wide SNP Data. *Syst. Biol.* 63(4):534-42
- Leydet KP, Hellberg ME. 2016. Discordant coral-symbiont structuring: factors shaping geographical variation of Symbiodinium communities in a facultative zooxanthellate coral genus, *Oculina*. *Coral Reefs.* 35(2):583-95
- Mackie GO. 1974. Locomotion, Flotation, and Dispersal. In *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*. New York, San Francisco, London: Academic Press
- Mallien C, Porro B, Zamoum T, Olivier C, Wiedenmann J, et al. 2017. Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria). *Syst. Biodivers.* 16(3):271-86
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3):1215
- Muller-Parker G, Davy SK. 2001. Temperate and tropical algal-sea anemone symbioses. *Invertebr. Biol.* 104-123
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, et al. 2016. *Vegan: Community Ecology Package*.
- Padilla-Gamiño JL, Pochon X, Bird C, Concepcion GT, Gates RD. 2012. From Parent to Gamete: Vertical Transmission of Symbiodinium (Dinophyceae) ITS2 Sequence Assemblages in the Reef Building Coral *Montipora capitata*. *PLoS ONE.* 7(6):e38440
- Parkinson JE, Baums IB. 2014. The extended phenotypes of marine symbioses: ecological and evolutionary consequences of intraspecific genetic diversity in coral-algal associations. *Front. Microbiol.* 5:
- Pembleton LW, Cogan NOI, Forster JW. 2013. StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Mol. Ecol. Resour.* 13(5):946-52
- Porro B, Mallien C, Hume BCC, Pey A, Aubin E, et al. 2019. The many faced symbiotic snakelocks anemone (*Anemonia viridis*, Anthozoa): host and symbiont genetic differentiation among colour morphs. *Heredity.* 1-16
- Quigley KM, Willis BL, Kenkel CD. 2019. Transgenerational inheritance of shuffled symbiont communities in the coral *Montipora digitata*. *Sci. Rep.* 9(1):1-11
- Reynolds JM, Bruns BU, Fitt WK, Schmidt GW. 2008. Enhanced photoprotection pathways in symbiotic dinoflagellates of shallow-water corals and other cnidarians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(36):13674-78
- Richier S, Furla P, Plantivaux A, Merle P-L, Allemand D. 2005. Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *J. Exp. Biol.* 208(2):277-85
- Roberty S, Furla P, Plumier J-C. 2016. Differential antioxidant response between two Symbiodinium species from contrasting environments. *Plant Cell Environ.* 39(12):2713-24

- Sabourault C, Ganot P, Deleury E, Allemand D, Furla P. 2009. Comprehensive EST analysis of the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *BMC Genomics*. 10(1):333
- Savage AM, Goodson MS, Visram S, Trapido-Rosenthal H, Wiedenmann J, Douglas AE. 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
- Schäfer W. 1984. Fortpflanzung und Entwicklung von *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actiniaria). I: Fortpflanzungszyklus und Struktur der Oocyten vor und nach der Besamung. *Helgoländer Meeresunters.* 38(2):135–148
- Schmidt H. 1972. Prodrömus zu einer Monographie der mediterranen Aktinien
- Shick JM. 1991. *A Functional Biology of Sea Anemones*. Springer Netherlands
- 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
- Suez M, Behdenna A, Brouillet S, Graça P, Higuët D, Achaz G. 2016. MicNeSs: genotyping microsatellite loci from a collection of (NGS) reads. *Mol. Ecol. Resour.* 16(2):524–33
- Suggett DJ, Hall-Spencer JM, Rodolfo-Metalpa R, Boatman TG, Payton R, et al. 2012. Sea anemones may thrive in a high CO₂ world. *Glob. Change Biol.* 18(10):3015–25
- Suggett DJ, Warner ME, Smith DJ, Davey P, Hennige S, Baker NR. 2008. Photosynthesis and Production of Hydrogen Peroxide by *Symbiodinium* (pyrrhophyta) Phylotypes with Different Thermal Tolerances1. *J. Phycol.* 44(4):948–56
- Swofford DL. 1998. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (Paup)*. Sunderland, MA: Sinauer Associates
- Swofford DL. 2001. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)* 4.0.B5
- Tchernov D, Gorbunov MY, de Vargas C, Yadav SN, Milligan AJ, et al. 2004. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(37):13531–13535
- Utrilla O, Castro-Claros JD, Urra J, Navas FD, Salas C. 2019. Reproduction of the anthozoan *Anemonia sulcata* (Pennant, 1777) in southern Spain: from asexual reproduction to putative maternal care. *Mar. Biol.* 166(8):111
- Ventura P, Jarrold MD, Merle P-L, Barnay-Verdier S, Zamoum T, et al. 2016. Resilience to ocean acidification: decreased carbonic anhydrase activity in sea anemones under high pCO₂ conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 559:257–63
- 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(06):1281–83
- Zheng X. 2012. *SNPRelate: Parallel Computing Toolset for Genome-Wide Association Studies*
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(5):723–35

SUPPLEMENTARIES

Figure S1: Definition of the threshold distance value for MLL identification over 197 sea anemones.

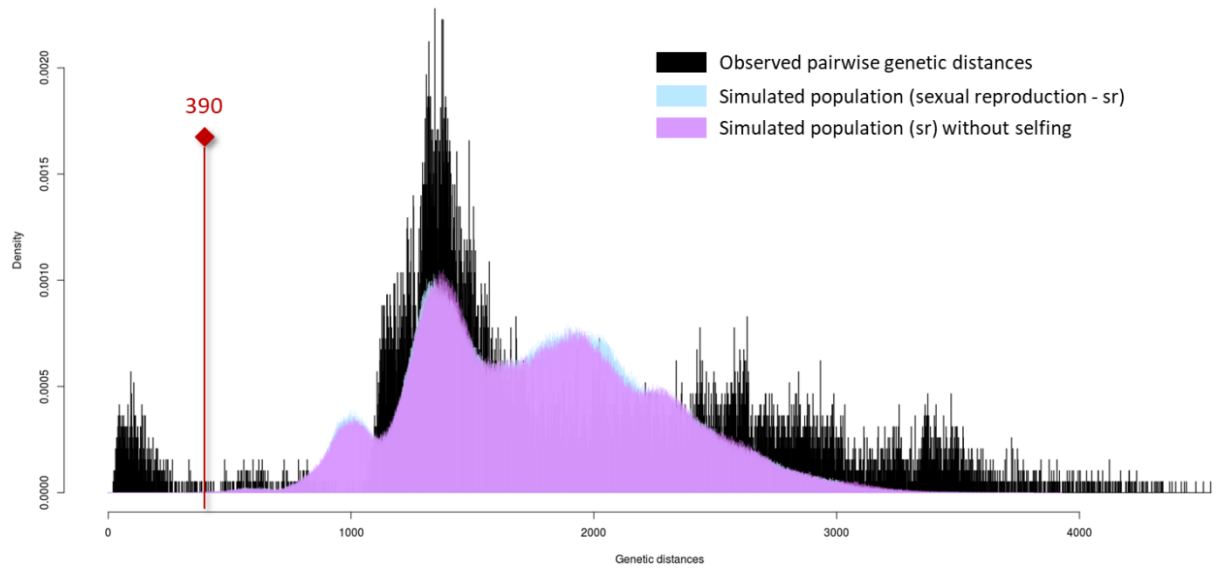


Figure S2: Cross-entropy validation of the optimal number of clusters or ancestral populations (K) for the snmf clustering analysis on the N65 dataset. The value K=4 designates the best number of genetic clusters the N65 individuals could be originated from.

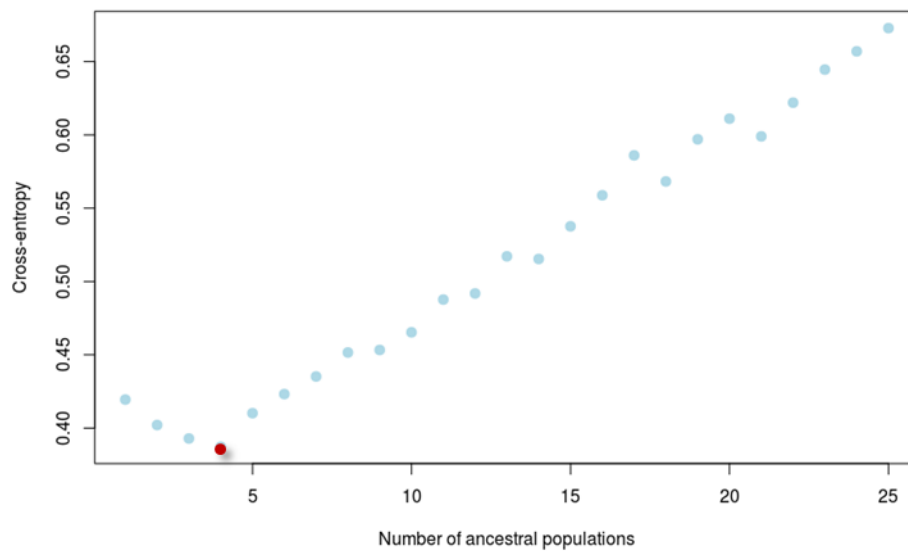


Table S1: Sampled sea anemones in Mediterranean locations

The main snmf cluster is indicated, along with the second cluster higher than 15% exclusively for the N65 dataset (if the two values are the same the individual is considered as pure, if not as admixed). For individuals out of N65 dataset the main cluster was extrapolated depending on the MLL of the individuals. The individuals in the N65 dataset selected for BFD* analysis are tagged with a B in the “Cluster 15%” column. The MLL starting with a “R” correspond to repeated MLL whereas MLL started with a “U” correspond to unique MLL. The sea anemones with an asterisk following the individual name are common with the Porro et al. (2019) study.

Sea anemone	location	mll	Main Cluster	Cluster 15%	Clade	Symbiont ITS2 genotype	Symbiont microsatellite genotype
BanDep11	Banyuls	R006	K1	K1	Clade1	x	x
BanSha18*	Banyuls	R006	K1				
MarSha15	Marseille	R029	K1	K3	Clade3	x	x
MarSha21	Marseille	R029	K1			x	x
MarSha30	Marseille	R029	K1			x	x
BanSha12*	Banyuls	R065	K1	K1	Clade1		x
BanSha15*	Banyuls	R065	K1				
BarSea23	Barcarès	R069	K1	K4	Clade1	x	x
MarDep17	Marseille	R069	K1			x	x
BarSea15	Barcarès	R072	K1	K1 ^B	Clade1	x	x
MarDep02	Marseille	R072	K1			x	x
MarSha34	Marseille	R074	K1	K1 ^B	Clade1	x	x
BanDep22	Banyuls	R074	K1			x	x
BarSea07	Barcarès	R084	K1	K1	Clade1	x	x
BanDep06	Banyuls	R084	K1			x	x
BanSha14*	Banyuls	R092	K1	K1	Clade1	x	x
MarDep19	Marseille	R092	K1			x	x
BarSea02	Barcarès	R099	K1	K1	Clade1	x	x
BanSha01*	Banyuls	R099	K1				
ThaLag13*	Thau	R106	K1	K1 ^B	Clade1	x	x
BanDep03	Banyuls	R106	K1				
BanDep18	Banyuls	R106	K1			x	x
BanDep25	Banyuls	R106	K1			x	x
BanSha21*	Banyuls	R106	K1				
BarLag04	Barcarès	R106	K1			x	x
BarLag17	Barcarès	R106	K1			x	x
BarLag30	Barcarès	R106	K1			x	x
BarSea03	Barcarès	R106	K1			x	x
BarSea16	Barcarès	R106	K1			x	x
BanSha24*	Banyuls	R123	K1	K1 ^B	Clade1	x	x
BanDep02	Banyuls	R123	K1				
BanSha05*	Banyuls	R123	K1			x	x
BanSha20*	Banyuls	R123	K1				
BanSha22*	Banyuls	R123	K1			x	x
BarLag05	Barcarès	R123	K1			x	x
BarLag06	Barcarès	R123	K1			x	x

Dynamique d'association hôte-symbiote

BarLag15	Barcarès	R123	K1			x	x
BarLag27	Barcarès	R123	K1				
BarSea24	Barcarès	R123	K1			x	x
MarSha03	Marseille	R123	K1			x	x
ScaSha28	Scandola	R155	K1	K1 ^B	Clade1	x	x
BanDep14	Banyuls	R155	K1			x	x
ScaDep02	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep04	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep05	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep07	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep09	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep10	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep11	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep12	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep13	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep14	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep18	Scandola	R155	K1				x
ScaDep19	Scandola	R155	K1			x	x
ScaDep20	Scandola	R155	K1			x	x
ScaSha01	Scandola	R155	K1			x	x
ScaSha02	Scandola	R155	K1			x	x
ScaSha03	Scandola	R155	K1			x	x
ScaSha04	Scandola	R155	K1				x
ScaSha05	Scandola	R155	K1			x	x
ScaSha06	Scandola	R155	K1				
ScaSha07	Scandola	R155	K1				
ScaSha08	Scandola	R155	K1				
ScaSha09	Scandola	R155	K1			x	x
ScaSha10	Scandola	R155	K1				
ScaSha11	Scandola	R155	K1				
ScaSha12	Scandola	R155	K1				
ScaSha13	Scandola	R155	K1				
ScaSha15	Scandola	R155	K1				
ScaSha16	Scandola	R155	K1				
ScaSha17	Scandola	R155	K1				
ScaSha19	Scandola	R155	K1				
ScaSha21	Scandola	R155	K1				
ScaSha30	Scandola	R155	K1				
BanSha19*	Banyuls	R160	K1	K1	Clade1	x	X
BanSha13*	Banyuls	R160	K1				
BanSha30*	Banyuls	R160	K1			x	
ThaLag05*	Thau	R171	K1	K1	Clade1	x	x
BanDep24	Banyuls	R171	K1			x	x
BanSha02*	Banyuls	R171	K1			x	x
BanSha26*	Banyuls	R171	K1				
BanSha27*	Banyuls	R171	K1				
BanSha29*	Banyuls	R171	K1				
BarSea05	Barcarès	R171	K1			x	x

Dynamique d'association hôte-symbiote

BarSea18	Barcarès	R171	K1			x	x
ThaSea16	Thau	R197	K1	K4	Clade1	x	x
ThaSea02	Thau	R197	K1			x	x
BanDep23	Banyuls	U002	K1	K1	Clade1	x	x
ThaSea03	Thau	U019	K1	K4	Clade1	x	x
ThaSea04	Thau	U020	K1	K4	Clade1	x	x
ThaSea08	Thau	U023	K1	K1	Clade1	x	x
ThaSea13	Thau	U025	K1	K4	Clade1	x	x
ThaSea15	Thau	U027	K1	K4	Clade1	x	x
ThaSea20	Thau	U030	K1	K4	Clade1	x	x
ThaSea21	Thau	U031	K1	K4	Clade1	x	x
ThaSea27	Thau	U032	K1	K4	Clade1	x	x
BanSha28*	Banyuls	U034	K1	K1	Clade1		
ThaLag04*	Thau	U035	K1	K1	Clade1	x	x
ScaDep17	Scandola	R081	K2	K2	Clade2	x	x
ScaDep03	Scandola	R081	K2			x	x
BanDep13	Banyuls	U001	K2	K2 ^B	Clade2	x	x
ScaDep06	Scandola	U010	K2	K2	Clade2	x	x
ScaDep08	Scandola	U011	K2	K2	Clade2		
ScaDep15	Scandola	U012	K2	K2	Clade2	x	x
ScaDep16	Scandola	U013	K2	K2	Clade2		
ScaDep21	Scandola	U014	K2	K2 ^B	Clade2		x
ScaSha14	Scandola	U015	K2	K2	Clade2		
ScaSha22	Scandola	U016	K2	K2	Clade2		x
ScaSha29	Scandola	U018	K2	K2	Clade2		x
BarLag11	Barcarès	R042	K3	K2 ^B	Clade3	x	x
BanDep04	Banyuls	R042	K3			x	x
BanDep07	Banyuls	R042	K3				x
BanDep08	Banyuls	R042	K3				
BanDep12	Banyuls	R042	K3			x	x
BanDep16	Banyuls	R042	K3			x	x
BanDep17	Banyuls	R042	K3			x	x
BarLag08	Barcarès	R042	K3			x	x
BarLag10	Barcarès	R042	K3			x	x
BarLag12	Barcarès	R042	K3			x	x
BarLag22	Barcarès	R042	K3			x	x
BarLag23	Barcarès	R042	K3			x	x
BarLag24	Barcarès	R042	K3				
BarLag25	Barcarès	R042	K3			x	x
BarLag26	Barcarès	R042	K3				
MarDep21	Marseille	R042	K3			x	x
MarDep24	Marseille	R042	K3			x	x
MarDep30	Marseille	R042	K3			x	x
MarDep34	Marseille	R042	K3			x	x
MarSha02	Marseille	R042	K3			x	x
MarSha26	Marseille	R059	K3	K3	Clade3	x	x
MarSha18	Marseille	R059	K3			x	x
MarSha23	Marseille	R060	K3	K3 ^B	Clade3	x	x

Dynamique d'association hôte-symbiote

MarDep03	Marseille	R060	K3			x	x
MarDep09	Marseille	R060	K3			x	x
MarDep10	Marseille	R060	K3			x	x
MarDep11	Marseille	R060	K3			x	x
MarDep12	Marseille	R060	K3			x	x
MarDep15	Marseille	R060	K3			x	x
MarDep26	Marseille	R060	K3			x	x
MarDep28	Marseille	R060	K3			x	x
MarSha05	Marseille	R060	K3			x	x
MarSha09	Marseille	R060	K3			x	x
MarSha11	Marseille	R060	K3			x	x
MarSha13	Marseille	R060	K3			x	x
MarSha14	Marseille	R060	K3				
MarSha19	Marseille	R060	K3			x	x
MarSha22	Marseille	R060	K3			x	x
MarSha25	Marseille	R060	K3			x	x
BarLag07	Barcarès	U003	K3	K3	Clade3		
BarLag09	Barcarès	U004	K3	K3	Clade3		
BarLag28	Barcarès	U005	K3	K3	Clade3	x	x
BarSea13	Barcarès	U006	K3	K3	Clade3		
MarDep27	Marseille	U009	K3	K1	Clade3	x	x
ThaLag07*	Thau	R028	K4	K4	Clade4	x	x
ThaLag18*	Thau	R028	K4				
ThaLag28*	Thau	R028	K4				
BarSea26	Barcarès	R057	K4	K1 ^B	Clade4	x	x
BanSha25*	Banyuls	R057	K4				x
ThaSea22	Thau	R062	K4	K1 ^B	Clade1	x	x
ThaSea28	Thau	R062	K4			x	x
ThaSea29	Thau	R062	K4				
BanDep26	Banyuls	R096	K4	K4 ^B	Clade4	x	x
BarLag16	Barcarès	R096	K4				
ThaLag12*	Thau	R125	K4	K1	Clade4	x	x
ThaLag20*	Thau	R125	K4			x	x
MarDep31	Marseille	R175	K4	K4 ^B	Clade4	x	x
MarSha04	Marseille	R175	K4			x	x
MarSha28	Marseille	R175	K4				x
MarDep01	Marseille	R184	K4	K4	Clade4	x	x
BanDep15	Banyuls	R184	K4			x	x
BanDep20	Banyuls	R184	K4			x	x
BanSha16*	Banyuls	R184	K4				
BarLag03	Barcarès	R184	K4			x	
BarLag14	Barcarès	R184	K4			x	x
BarLag18	Barcarès	R184	K4				
MarDep07	Marseille	R184	K4			x	x
MarDep29	Marseille	R184	K4			x	x
MarSha31	Marseille	R184	K4				x
ThaSea06	Thau	R185	K4	K1	Clade1	x	x
ThaSea12	Thau	R185	K4			x	x

Dynamique d'association hôte-symbiote

BarSea11	Barcarès	R194	K4	K4	Clade4	x	x
BarLag21	Barcarès	R194	K4				
BarSea04	Barcarès	R194	K4			x	x
BarSea14	Barcarès	R194	K4			x	x
BarSea22	Barcarès	R194	K4			x	x
MarDep06	Marseille	U008	K4	K4	Clade4	x	x
ScaSha27	Scandola	U017	K4	K1 ^B	Clade1	x	x
ThaSea05	Thau	U021	K4	K1	Clade1	x	x
ThaSea07	Thau	U022	K4	K1	Clade4	x	x
ThaSea09	Thau	U024	K4	K1	Clade4	x	x
ThaSea14	Thau	U026	K4	K1	Clade1		
ThaSea17	Thau	U028	K4	K1	Clade1	x	x
ThaSea18	Thau	U029	K4	K1	Clade4	x	x
BanSha17*	Banyuls	U033	K4	K4	Clade4		
ThaLag15*	Thau	U036	K4	K4	Clade4		
ThaLag17*	Thau	U037	K4	K4	Clade4		
ThaLag27*	Thau	U038	K4	K1	Clade1	x	x

Table S2 : Host genetic diversity among and within snmf clusters (N148 dataset)

	Ho	He	F _{IS}	F _{ST}			
				K1	K2	K3	K4
K1	0.117	0.125	0.061				
K2	0.182	0.202	0.098	0.244			
K3	0.107	0.088	-0.216	0.155	0.350		
K4	0.116	0.131	0.116	0.119	0.242	0.204	

Table S3: Site pairwise differentiation of symbiont compositions based on ITS2 sequences.

Pairs	F.Model	R2	p.value	p.adjusted
Ban vs Bar	3.597626	0.065893	0.00013	0.00021667
Ban vs Mar	1.473707	0.024369	0.11273	0.12525556
Ban vs Sca	1.870677	0.040782	0.03091	0.0386375
Ban vs Tha	3.904767	0.076707	0.00006	0.00012
Bar vs Mar	3.873325	0.055434	0.00001	0.000075
Bar vs Sca	3.249609	0.059901	0.00003	0.000075
Bar vs Tha	3.860182	0.066716	0.00003	0.000075
Mar vs Sca	1.237664	0.020546	0.19864	0.19864
Mar vs Tha	3.821153	0.058054	0.00003	0.000075
Sca vs Tha	2.873706	0.05762	0.00017	0.00024286

The bold values indicate factors with statistically significant effect on the symbiont differentiation after an FDR correction.

Table S4: Site/Cluster pairwise differentiation of symbiont compositions based on microsatellite distributions.

Pairs	F.Model	R2	p.value	p.adjusted
Ban_K1 vs Mar_K1	3.64464123	0.1478878	0.01218	0.02585143
Ban_K1 vs Bar_K1	6.90136495	0.1977391	0.00025	0.00122909
Ban_K1 vs Tha_K1	4.55440447	0.1490589	0.00596	0.01398222
Ban_K1 vs Sca_K1	15.9448687	0.325772	0.00001	0.000104
Ban_K1 vs Sca_K2	3.51167552	0.1493588	0.01955	0.03836226
Ban_K1 vs Ban_K2	0.87545003	0.058852	0.68969	0.73191592
Ban_K1 vs Ban_K3	1.30414749	0.0675579	0.25681	0.32178602
Ban_K1 vs Bar_K3	2.05497736	0.0891338	0.11009	0.16219606
Ban_K1 vs Mar_K3	8.82383911	0.19256	0.00002	0.00016
Ban_K1 vs Tha_K4	11.2642106	0.3022796	0.00002	0.00016
Ban_K1 vs Ban_K4	3.21802601	0.1591662	0.02838	0.053664
Ban_K1 vs Bar_K4	4.89155224	0.2047398	0.00335	0.00871
Ban_K1 vs Mar_K4	5.78380849	0.2159442	0.00084	0.00285161
Ban_K1 vs Sca_K4	0.8409497	0.0566641	0.68771	0.73191592
Mar_K1 vs Bar_K1	5.4449868	0.2058986	0.005	0.01209302
Mar_K1 vs Tha_K1	1.88163675	0.0901096	0.13325	0.18727027
Mar_K1 vs Sca_K1	18.8286276	0.4200135	0.00001	0.000104
Mar_K1 vs Sca_K2	0.55423179	0.0408899	0.74625	0.7814352
Mar_K1 vs Ban_K2	2.18127051	0.2375783	0.11073	0.16219606
Mar_K1 vs Ban_K3	6.37899189	0.3670519	0.00085	0.00285161
Mar_K1 vs Bar_K3	3.46406789	0.198354	0.01942	0.03836226
Mar_K1 vs Mar_K3	0.50695294	0.0166176	0.60687	0.67143064
Mar_K1 vs Tha_K4	7.15922694	0.2736788	0.00001	0.000104
Mar_K1 vs Ban_K4	5.95016815	0.3730474	0.00371	0.00941073
Mar_K1 vs Bar_K4	5.85652669	0.3279768	0.00605	0.01398222
Mar_K1 vs Mar_K4	0.94481666	0.0632204	0.40076	0.48464
Mar_K1 vs Sca_K4	0.55126792	0.0730034	0.77802	0.80112951
Bar_K1 vs Tha_K1	2.13696438	0.0759486	0.10564	0.15922551
Bar_K1 vs Sca_K1	12.1975758	0.2698723	0.00001	0.000104
Bar_K1 vs Sca_K2	4.30487426	0.1771198	0.01362	0.0283296
Bar_K1 vs Ban_K2	1.41756012	0.0919445	0.2508	0.3180878
Bar_K1 vs Ban_K3	6.77051824	0.2733297	0.0004	0.00157926
Bar_K1 vs Bar_K3	3.09319982	0.1283848	0.04825	0.08093548
Bar_K1 vs Mar_K3	11.6637354	0.2396802	0.00005	0.00030588
Bar_K1 vs Tha_K4	6.6546374	0.2037884	0.00289	0.00770667
Bar_K1 vs Ban_K4	2.65452958	0.1350594	0.06479	0.10695492
Bar_K1 vs Bar_K4	0.41027397	0.0211369	0.68038	0.73191592
Bar_K1 vs Mar_K4	9.61187054	0.3139916	0.00026	0.00122909
Bar_K1 vs Sca_K4	0.40315429	0.0279907	0.75138	0.7814352
Tha_K1 vs Sca_K1	10.0257691	0.2443774	0.00001	0.000104
Tha_K1 vs Sca_K2	1.22391483	0.0636663	0.30843	0.37737318
Tha_K1 vs Ban_K2	1.14872198	0.0873638	0.28726	0.35565524
Tha_K1 vs Ban_K3	5.70588554	0.2628727	0.00146	0.00460121

Dynamique d'association hôte-symbiote

Tha_K1 vs Bar_K3	2.34396453	0.1098186	0.07161	0.11636625
Tha_K1 vs Mar_K3	4.88075358	0.1223837	0.0069	0.0156
Tha_K1 vs Tha_K4	2.21285071	0.0844185	0.08865	0.13760597
Tha_K1 vs Ban_K4	2.25869058	0.1308727	0.07726	0.123616
Tha_K1 vs Bar_K4	3.03558232	0.1515096	0.04791	0.08093548
Tha_K1 vs Mar_K4	3.72985461	0.164095	0.01445	0.02946667
Tha_K1 vs Sca_K4	0.05340232	0.0044305	1	1
Sca_K1 vs Sca_K2	12.2840263	0.3294716	0.00002	0.00016
Sca_K1 vs Ban_K2	12.1952902	0.3909337	0.04645	0.08051333
Sca_K1 vs Ban_K3	24.7777833	0.5186047	0.00003	0.000195
Sca_K1 vs Bar_K3	12.9465552	0.3324185	0.00001	0.000104
Sca_K1 vs Mar_K3	29.7057893	0.4142732	0.00001	0.000104
Sca_K1 vs Tha_K4	22.236549	0.4176933	0.00001	0.000104
Sca_K1 vs Ban_K4	17.6574163	0.4452488	0.00031	0.00140174
Sca_K1 vs Bar_K4	22.4868984	0.4837255	0.00001	0.000104
Sca_K1 vs Mar_K4	31.2058198	0.5455008	0.00001	0.000104
Sca_K1 vs Sca_K4	4.1204156	0.1782155	0.09513	0.14549294
Sca_K2 vs Ban_K2	2.31959689	0.2788112	0.25	0.3180878
Sca_K2 vs Ban_K3	6.90989332	0.4086302	0.00134	0.004355
Sca_K2 vs Bar_K3	2.44085627	0.1580778	0.04617	0.08051333
Sca_K2 vs Mar_K3	2.05971719	0.0663147	0.11591	0.16513205
Sca_K2 vs Tha_K4	6.06047356	0.251885	0.00039	0.00157926
Sca_K2 vs Ban_K4	5.63457903	0.3850182	0.00879	0.019045
Sca_K2 vs Bar_K4	6.56487539	0.3737502	0.00234	0.00640421
Sca_K2 vs Mar_K4	1.43997094	0.0997212	0.23711	0.308243
Sca_K2 vs Sca_K4	0.24203636	0.0387752	1	1
Ban_K2 vs Ban_K3	0.61999545	0.1341983	0.6666667	0.72982456
Ban_K2 vs Bar_K3	0.99959304	0.1249555	0.4435	0.51824719
Ban_K2 vs Mar_K3	2.16925706	0.0861868	0.04	0.07202897
Ban_K2 vs Tha_K4	2.14684292	0.1517542	0.14346	0.1989312
Ban_K2 vs Ban_K4	0.51232537	0.145865	0.6	0.67096774
Ban_K2 vs Bar_K4	1.1257784	0.1837772	0.4285714	0.50649351
Ban_K2 vs Mar_K4	2.30360858	0.2476038	0.11246	0.16244222
Ban_K2 vs Sca_K4	NaN	1	NA	NA
Ban_K3 vs Bar_K3	4.33256485	0.2825727	0.00181	0.00537829
Ban_K3 vs Mar_K3	8.17116582	0.2323257	0.00003	0.000195
Ban_K3 vs Tha_K4	11.5498514	0.4192346	0.0001	0.00054737
Ban_K3 vs Ban_K4	3.19438752	0.3133477	0.04017	0.07202897
Ban_K3 vs Bar_K4	4.90879287	0.3529273	0.00427	0.01057333
Ban_K3 vs Mar_K4	7.65921098	0.4104788	0.00076	0.00272552
Ban_K3 vs Sca_K4	2.19874184	0.3547078	0.1666667	0.22510823
Bar_K3 vs Mar_K3	7.82111364	0.2067923	0.00044	0.00163429
Bar_K3 vs Tha_K4	8.37567327	0.3059531	0.00033	0.00143
Bar_K3 vs Ban_K4	2.3469286	0.190082	0.07891	0.12434303
Bar_K3 vs Bar_K4	3.64772266	0.2331152	0.02896	0.05378286
Bar_K3 vs Mar_K4	6.0474021	0.3016552	0.00168	0.00513882

Bar_K3 vs Sca_K4	0.33937877	0.0462408	0.89038	0.90783843
Mar_K3 vs Tha_K4	12.0320949	0.2558273	0.00003	0.000195
Mar_K3 vs Ban_K4	6.98389	0.2117364	0.00006	0.00034667
Mar_K3 vs Bar_K4	8.54742225	0.2338721	0.00041	0.00157926
Mar_K3 vs Mar_K4	0.62087492	0.0202762	0.51666	0.59046857
Mar_K3 vs Sca_K4	1.10882626	0.0459925	0.48117	0.55601867
Tha_K4 vs Ban_K4	3.13167675	0.1727185	0.02796	0.053664
Tha_K4 vs Bar_K4	5.73786364	0.2523484	0.00711	0.01573277
Tha_K4 vs Mar_K4	9.79196573	0.3400937	0.00021	0.001092
Tha_K4 vs Sca_K4	0.65923773	0.0520756	0.5719	0.64649565
Ban_K4 vs Bar_K4	1.99046844	0.1992367	0.16253	0.22240947
Ban_K4 vs Mar_K4	7.02205068	0.4125267	0.00218	0.00612757
Ban_K4 vs Sca_K4	2.37515778	0.4418768	0.2	0.26666667
Bar_K4 vs Mar_K4	10.1165185	0.4574191	0.00191	0.00551778
Bar_K4 vs Sca_K4	0.96630568	0.1619605	0.4285714	0.50649351
Mar_K4 vs Sca_K4	1.37904894	0.164583	0.21973	0.28926481

The bold values indicate factors with statistically significant effect on the symbiont differentiation after an FDR correction

Discussion, Conclusions & Perspectives

IV. Discussion, Conclusions & Perspectives

IV.1. La nature des morphes d'*Anemonia viridis*

IV.1.1. Un polymorphisme et pas une divergence

Avant de débiter ces études, *Anemonia viridis* était définie comme une anémone de mer symbiotique présentant différents morphes identifiables principalement par la couleur des tentacules, par les différents profils d'expression de protéines fluorescentes et par divers traits d'histoire de vie (*cf.* la partie I.4 page 24). Ces constatations nous avaient ainsi conduits à nous interroger sur la nature taxonomique de ces morphes et la spécificité d'interaction qu'entretient *A. viridis* avec ses symbiotes. A la suite de mon travail de thèse, la définition taxonomique même d'*A. viridis* a été bousculée sans pour autant que le mystère de la différenciation morphologique soit résolu (Mallien et al. 2017; Porro et al. 2019).

Ainsi, lors de mes travaux de thèse, j'ai pu mettre en évidence l'existence de lignées génétiques différenciées et peu ou pas introgressées chez *A. viridis*. Ces lignées regroupent différents morphes dont *rustica* que l'on considère majoritairement clonal et *smaragdina* considéré comme se reproduisant principalement de façon sexuée (Figure I.4-4). J'ai pu mettre en évidence que la clonalité chez *A. viridis* est particulièrement répandue au sein de ces différentes lignées (Mallien et al. 2017; Porro et al. 2019; Porro et al. *in prep*) y compris chez *smaragdina* avec 28 MLL considérés comme clonales sur les 65 détectées chez le morphe *smaragdina* (annexe A3, Porro et al. *in prep*). Le seul signal fort de divergence entre morphes est localisé à Banyuls/Collioure et correspond à la lignée *BanRuf* formée uniquement d'individus de morphe *rufescens* (Mallien et al. 2017; Porro et al. 2019). Cependant d'autres individus de morphe *rufescens* ont été identifiés dans une autre lignée (*EngCh*) écartant ainsi l'hypothèse des morphes comme un signal de spéciation. **Les morphes ne sont donc pas des espèces**

différentes.

IV.1.2. Une plasticité phénotypique ou une origine génétique des morphes ?

La question de la nature des morphes reste ouverte et plusieurs hypothèses sont envisageables (Tableau IV.1-1).

Tableau IV.1-1 : Récapitulatif des hypothèses expliquant la nature des morphes

Nature des morphes		
Signal de spéciation	(Bulnheim & Sauer 1984)	Non
Différenciation symbiotique	(Frade et al. 2008)	Non
Stades de développement	(Roth et al. 2013)	A tester
Canalisation développementale	(Kawecki & Ebert 2004; Zamer & Mangum 1979)	A tester
Polymorphisme allélique	(Creed et al. 1980; Kess et al. 2018)	A tester (en cours)

Dans nos études nous avons essentiellement utilisé des individus de taille petite à moyenne. Il existe chez *A. viridis* des individus du morphe *smaragdina* beaucoup plus imposants (Figure I.4-2). Chez ces individus, il a été possible d'induire la ponte de gamètes et de suivre le développement des larves puis des juvéniles (Zamoum et al. *in prep*), alors qu'il fut impossible de l'induire chez des anémones de morphe *rustica* (présentant néanmoins des gonades développées). Bien qu'un seul essai de ponte ait été réalisé, cet échec pourrait suggérer que le morphe *rustica* représente un stade juvénile. Cependant, *in aquaria*, nous n'avons jamais observé de variation de phénotype chez des individus cultivés plusieurs années, ni de changement de morphe lors du développement larvaire-juvénile-adulte d'individus *smaragdina* dont on a induit ponte et fécondation (les G1 partageant le même phénotype que leurs parents). A ma connaissance, le seul suivi temporel sur le terrain de populations d'*A. viridis* s'est fait au Dramont (Massif de l'Esterel), et les auteurs mettaient en avant un remplacement local d'un morphe (*rustica*) par un autre (*smaragdina*) plutôt qu'un changement de phénotype

(Wiedenmann et al. 2007). L'hypothèse d'un changement phénotypique lié à l'âge semble donc peu probable.

Les morphes d'*A. viridis* pourraient néanmoins être le résultat d'une *canalisation développementale* qui correspond à une modification irréversible du phénotype due aux conditions environnementales lors du développement. Il a été montré chez l'anémone de mer *Haliplanella luciae* une modification physiologique irréversible (consommation d'O₂) dépendant de la température à laquelle des clones s'étaient développés (Zamer & Mangum 1979). Cet exemple de canalisation développementale chez un Anthozoaire pourrait expliquer la variation morphologique d'*A. viridis* dont les juvéniles ne présenteraient qu'un seul morphe *in aquaria* car se développant en conditions contrôlées. Tester différentes conditions de températures, ou d'éclairage sur le développement des larves d'*A. viridis* pourrait nous permettre de suivre une éventuelle variation phénotypique en fonction ces conditions au cours du développement et donc de tester l'hypothèse d'une canalisation développementale.

La différenciation morphologique des morphes pourrait également être le résultat d'un polymorphisme génétique. Par exemple, chez l'escargot *Cepeae nemoralis*, il a été montré par plusieurs croisements que la couleur de la coquille et la présence de bandes sur celle-ci étaient codées génétiquement (Cain et al. 1960; Richards et al. 2013). De plus, il a été montré que l'aspect de la coquille était soumis à sélection, les escargots clairs étant avantagés dans des prairies et jardins et les escargots plus sombres étant plus avantagés dans les sous-bois (Currey et al. 1964). Pour tester le déterminisme génétique des morphes d'*A. viridis*, nous pourrions, en étant patients, vérifier le maintien des différents phénotypes sur plusieurs générations issues de croisements *in aquaria*. Nous pourrions également utiliser le jeu de données de SNP utilisé pour déterminer le statut taxonomique des morphes, et tester l'existence d'une association phénotype-génotype afin de détecter lesquels de nos SNP auraient des allèles différents entre morphes par une *étude d'association pangénomique* (*Genome-Wide Association Study* en anglais) (Korte & Farlow 2013). Cela dit, comme nos loci RADseq ne représentent qu'une très

faible proportion du génome total, il sera peut-être nécessaire de générer des marqueurs de variabilité génétique à l'échelle du génome entier pour détecter de tels liens avec le phénotype. Le séquençage du génome d'*A. viridis* permettrait de localiser les lectures générées par les séquençages RAD et les SNP d'intérêt. Nous n'aurions ainsi plus de marqueurs anonymes et nous pourrions croiser facilement l'information génétique obtenue de différents échantillonnages. Une ébauche de génome d'*A. viridis* a récemment été mise à disposition (numéro d'accès : PRJEB23133, Chi et al. 2018), elle pourrait permettre de préciser la nature et le rôle de certains SNPs d'intérêt. Une étude fonctionnelle serait néanmoins nécessaire pour mettre en évidence un éventuel effet de la diversité génétique détectée.

IV.2. *A. viridis*, un complexe d'espèces

IV.2.1. Ménage à six

Mes travaux ont pu mettre en évidence l'existence de plusieurs lignées au sein d'*A. viridis* définissables comme des espèces cryptiques. L'existence de ces espèces cryptiques a été confirmée par deux jeux de données exploités dans les deux publications Porro et al. (2019) et Porro et al. (*in prep*). Dans ces deux études, les lignées méditerranéennes ont été trouvées en sympatrie dans les sites échantillonnés (Tableau IV.2-1) et peu d'introgessions ont été observées entre ces lignées, exceptions faites de *Med1* et *Med2* pour lesquels plusieurs individus des côtes sétoises (Thau) ont des profils génétiques introgressés (Porro et al. *in prep*). Il n'en demeure pas moins que les différentes lignées sont clairement différenciées les unes des autres dans chacun des jeux de données utilisés (annexe A2 table S3, annexe A3 table S2) avec donc une forte probabilité que leur existence ne soit pas artéfactuelle à l'échelle globale de notre échantillonnage.

Tableau IV.2-1 : Distribution géographique des espèces cryptiques chez *Anemonia viridis* en Méditerranée et en Manche.

	Morphes	Vulcano	Scandola	Marseille	Thau	Barcarès	Banyuls	Plymouth	Southampton
BanRuf	<i>rufescens</i>								
Med4	<i>smaragdina</i>								
Med1	<i>rustica</i> <i>smaragdina</i>								
Med2	<i>rustica</i> <i>smaragdina</i>								
Med3	<i>smaragdina</i>								
EngCh	<i>rufescens</i> <i>rustica</i> <i>smaragdina</i>								

Afin d'avoir une vision globale de la diversité génétique d'*A. viridis* à l'échelle de la Méditerranée nord-occidentale et des côtes de la Manche et confirmer ainsi l'existence d'espèces cryptiques chez *A. viridis*, j'ai par la suite regroupé les données provenant des deux études et redéfini des marqueurs SNP à partir de toutes des données obtenues par séquençage RAD, *i.e.* sur 372 anémones de mer.

A l'aide du logiciel iPyRAD, j'ai obtenu 392431 sites *de novo* en imposant un seuil de clustering intra-individuel de 90% et inter-individuel de 80% obtenu par optimisation de ces valeurs comme préconisé par Sromek (2017; Sromek et al. 2019) pour un échantillonnage couvrant une large répartition géographique. Afin de limiter l'influence des données manquantes, je n'ai considéré que les individus avec plus de 5000 sites et uniquement les sites dialléliques avec une fréquence allélique minimum de 5%, générant ainsi un jeu de données de 257 individus avec 233500 sites polymorphes. Pour visualiser la différenciation interindividuelle, j'ai calculé un arbre en maximum de vraisemblance (avec un modèle GTR+ Γ) et 400 *bootstraps* avec le logiciel RAxML (Stamatakis 2014). A partir du fichier de sortie, un arbre consensus à 70% a été calculé avec Mesquite (Maddison & Maddison 2018) et édité sous Mega6 (Tamura et al. 2013).

Cette nouvelle analyse semble confirmer que *A. viridis* telle que décrite actuellement est un

complexe d'espèces comptant à ce jour **six lignées génétiques différenciées** (Figure IV.2-1). De plus il permet de préciser leur niveau de différenciation relatif. *BanRuf* est toujours un clade génétiquement très différencié des autres *A. viridis* au même titre que l'espèce *Paranemonia cinerea* utilisée comme groupe externe. On distingue ensuite une différenciation progressive des lignées : *Med4*, *Med2*, *Med3*, *Med1* puis *EngCh*.

Pour l'heure, chaque nouvel échantillonnage nous a permis de détecter des lignées identifiées comme de possibles espèces par nos analyses BFD* (annexe A2 table S3, annexe A3 table 2). Toutes de ces lignées, bien que trouvées en sympatrie, semblent reproductivement isolées les unes des autres (exception faite peut-être de *Med1* et *Med2*). Notre échantillonnage en Manche et en Méditerranée du Nord-Ouest, ne couvre cependant qu'une petite proportion de l'aire de distribution d'*A. viridis*, qui est présente également en Atlantique Nord-Est et dans le reste de la Méditerranée (Figure I.4-3). Par conséquent, l'étendue de ces lignées nous échappe encore. De plus, l'absence d'introgession en sympatrie suggère une évolution isolée des différentes lignées suivie d'une colonisation des mêmes sites, donc potentiellement l'existence de populations refuges. Il serait intéressant d'entreprendre une approche de phylogéographie qui nous permettrait de préciser l'origine et les limites géographiques des lignées. Pour mener à bien ce type d'étude, il faudrait cependant non seulement augmenter les régions échantillonnées (notamment dans le Sud de la Méditerranée et les côtes Atlantiques) mais aussi y choisir un maillage d'échantillonnage plus fin, afin d'être en mesure d'identifier clairement les zones de contact et de possible hybridation entre ces lignées.

Ce nouvel échantillonnage permettrait alors de mieux définir les zones géographiques où l'hybridation entre les lignées a lieu et de tester formellement l'introgession avec un test complémentaire à l'approche de clustering génétique, comme à l'aide d'un test ABBA/BABA (Durand et al. 2011; Green et al. 2010). L'absence d'introgession pourrait être également testée expérimentalement, par croisements *in aquaria* des différentes lignées (si tant est que l'on puisse induire cette reproduction pour toutes les lignées en laboratoire).

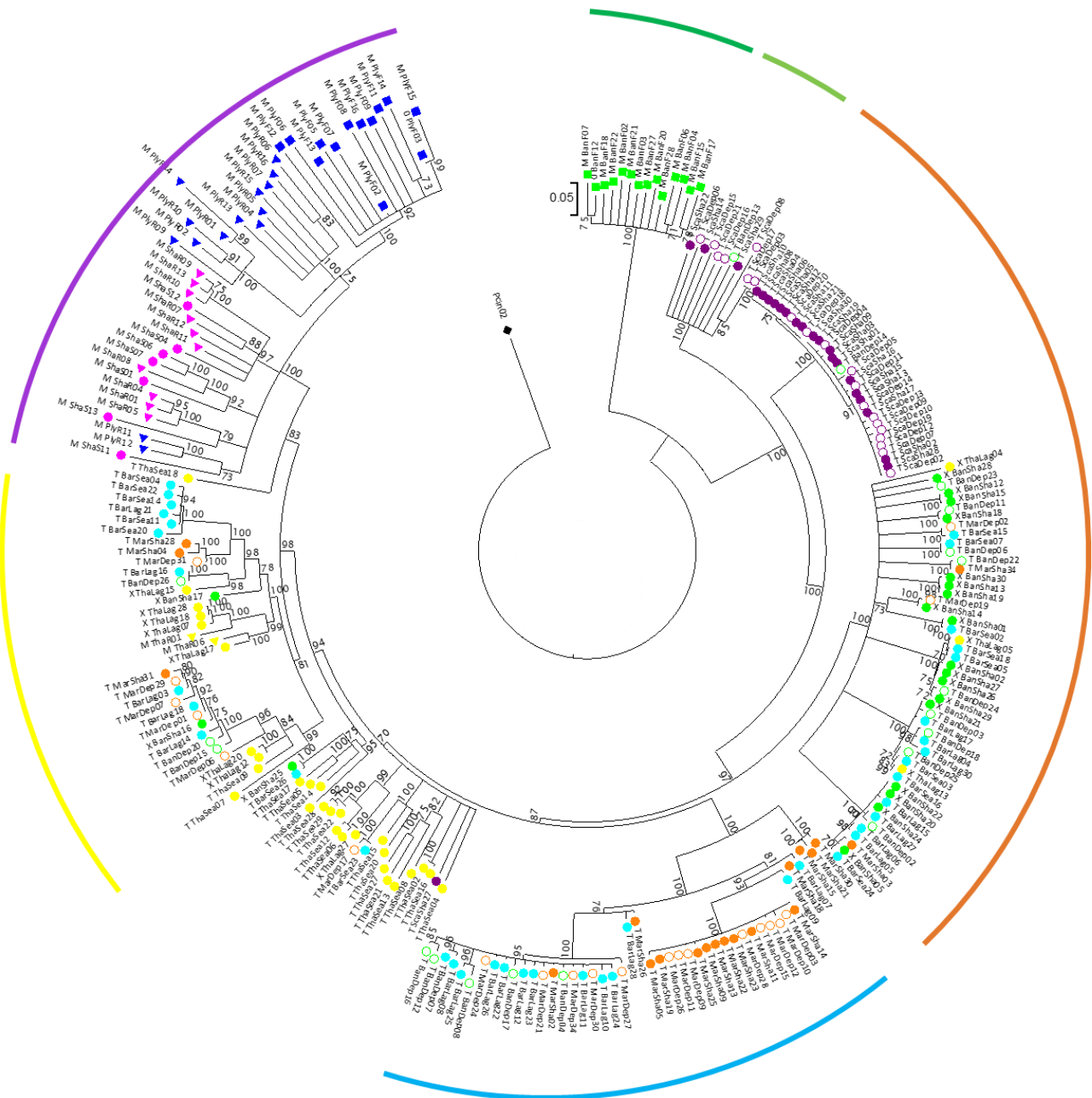


Figure IV.2-1 : Phylogénie de l'ensemble des individus de Manche et de Méditerranée échantillonnés pour la thèse (N = 257 individus)

Chaque feuille de l'arbre (en maximum de vraisemblance) est un anémone de mer identifiée par son utilisation dans une des études présentées dans le manuscrit (M : pour la définition taxonomique des morphes, annexe A2 ; T : le mode de transmission des Symbiodiniacées, annexe A3 ; X : les deux études), puis le site d'échantillonnage (Sha : Southampton en figuré rose, Ply : Plymouth en bleu, Ban : Banyuls en vert, Bar : Barcarès en turquoise, Tha : Thau en jaune, Mar : Marseille en orange, Sca : Scandola en violet). Le morphe des individus est indiqué par le figuré (Δ : *rustica*, \circ : *smaragdina*, \square : *rufescens*). Les lignes externes indiquent l'appartenance aux différentes lignées extrapolée à partir de nos précédentes études (*BanRuf* : vert foncé, *Med4* : vert clair, *Med2* : orange, *Med3* : bleu, *Med1* : jaune, *EngCh* : violet). L'arbre a été raciné avec le dernier représentant de *P. cinerea* du jeu de données.

IV.2.2. Une diversité génétique fonctionnelle ?

Bien que limités par la structure de notre échantillonnage concernant l'estimation des limites de distribution de ces lignées, nous avons néanmoins pu observer que la répartition des lignées n'est pas homogène à l'échelle des sites prospectés (Tableau IV.2-1). En Méditerranée, ces sites sont localisés dans des régions soumises à différents régimes hydrodynamiques et à différents régimes de températures (Ayata et al. 2018), avec également une variabilité au sein de ces régions à différentes profondeurs (Bensoussan et al. 2010; Tanhua et al. 2013). Il serait donc intéressant de creuser l'existence d'une association génotype-environnement chez les lignées d'*A. viridis*. Cette association devrait s'effectuer en croisant les données de génotypage des populations d'anémones avec des données environnementales des sites échantillonnés, et nécessite donc, en plus du génotypage fin des populations, un suivi des conditions environnementales locales mesurées à long terme.

Dans le cadre du projet ANR « AdaCni » (ANR-12-ADAP-0016), qui s'est achevé en 2017, le consortium du projet, auquel appartenait mon laboratoire d'accueil, avait comme ambition d'identifier une « boîte à outils » adaptative commune à différents Cnidaires (Hexacoralliaires et Octocoralliaires, symbiotiques et asymbiotiques). Dans cette perspective, lors de ses études doctorales, Cédric Mallien (2017) s'était attelé à la détection d'un signal génétique d'adaptation des populations d'*A. viridis*, opposant surface (1 à 3m) à profondeur (7 à 30m) et lagunes côtières à mer. En utilisant des SNP avec des allèles différenciellement distribués en fonction des conditions environnementales (approche des F_{ST} outliers), C. Mallien a révélé, à Sète dans le Golfe du Lion, deux groupes distincts mais non corrélés aux conditions environnementales (lagune de Thau *versus* mer). A la lumière de nos nouveaux résultats, il s'avère qu'il existe à Sète deux lignées génétiques, ce qui pourrait expliquer la partition précédemment observée. L'attribution des individus aux différentes lignées nous permettrait d'aller plus loin dans l'interprétation de nos données, et d'utiliser la même approche F_{ST} outliers mais cette fois-ci au sein des lignées génétiques détectées. De plus, dans le cadre du projet AdaCni, la présence

de différentes lignées génétiques chez *A. viridis* pourrait même être une plus-value : les lignées génétiques d'*A. viridis* pouvant alors servir de réplicats proches génétiquement, pour tester si les mêmes adaptations y auraient été sélectionnées indépendamment en réponse aux mêmes variations environnementales. Il resterait cependant à vérifier que ces différentes lignées aient des réponses potentiellement différenciées à ces variations (au travers, par exemple, de tests d'efforts pour mesurer la résistance des lignées à une augmentation de la température).

IV.3. Des populations dynamiques de symbiotes mutualistes structurées par la géographie

La diversité génétique des Symbiodiniacées mesurée chez *A. viridis* est une première à cette échelle géographique et avec cette densité d'échantillonnage en Europe. Notre première étude, considérant l'assemblage de Symbiodiniacées, suggérait une forte corrélation entre lignées hôtes et les populations de symbiotes (annexe A2, Porro et al. 2019). L'échantillonnage de nouveaux sites méditerranéens tend à montrer une corrélation plus forte avec la géographie qu'avec les lignées, pour le moment sans profil de répartition claire. La seule autre étude ayant mesuré la diversité génétique de Symbiodiniacées en Europe, et qui pourrait donc servir de point de comparaison, est celle de Grajales et al. (2016) qui ont échantillonné quelques *Aiptasia couchii* en Méditerranée, en Atlantique et en Manche. Il semble qu'il y ait chez ces deux espèces d'anémones symbiotiques une différenciation du contenu en Symbiodiniacées entre la Manche et la Méditerranée, ce qui correspond également à une différenciation génétique hôte chez *A. viridis*. En revanche au sein du bassin nord-ouest méditerranéen, la diversité symbiotique d'*A. viridis* apparaît plus structurée géographiquement. De plus, même au sein d'un MLL considéré comme clonal, le site d'échantillonnage a un effet statistiquement significatif sur la composition symbiotique (annexe A3, Porro et al. *in prep*).

Chez *A. viridis*, une espèce à transmission verticale des symbiotes (Shick 1991; Utrilla et al.

2019), ces résultats suggèrent soit une convergence sélective récurrente d'un pool de symbiotes transmis verticalement, soit une acquisition horizontale d'un *pool* local (adapté ou non) impliquant **un modèle mixte de transmission chez *A. viridis***. Cette dernière hypothèse, nous paraît plus parcimonieuse sachant que cette structuration géographique des symbiotes, indépendante de la structuration de la diversité génétique hôte, est cohérente avec ce qui a été observé chez une espèce de corail à transmission horizontale (Baums et al. 2014). La part de cette diversité symbiotique sélectionnée ou neutre n'est pour l'heure pas connue. Il faudrait pour l'estimer pouvoir mesurer la richesse allélique intra-hôte (qu'on attend très réduite en cas de convergence sélective) et donc de pouvoir identifier clairement les allèles microsatellites présents dans les populations symbiotiques. Or ceci n'est pour l'instant pas possible à partir des données du type de celles obtenues, à savoir un *pool* de lecture NGS (sans validation des allèles réellement détectés) obtenu à partir d'une population de symbiotes de taille inconnue.

Dans le cas des Symbiodiniacées, l'utilisation d'une approche OTU ne permet pas de mesurer toute la diversité intra-clade/genre qui semble pourtant ne pas être nulle au vu de nos premiers résultats de génotypage microsatellite (Figure III.2-3). Mais pour pouvoir en être sûr, il faudrait pouvoir valider la présence réelle des différents allèles au sein de chaque population symbiotique intra-hôte, ce qui nécessite de différencier le vrai signal génétique des bruits de fonds générés par l'amplification par PCR et le séquençage de masse. Pour améliorer la résolution de ce génotypage, nous envisageons une refonte du logiciel MicNeSs (Suez et al. 2016). Ce logiciel automatise le génotypage microsatellite d'organismes diploïdes en modélisant l'imprécision des lectures obtenues par NGS sur le nombre de copies du marqueur microsatellite. Le principe du nouveau logiciel serait de considérer non plus des génotypes à deux allèles, mais à n allèles et d'obtenir ainsi le génotype poolé d'une population de symbiotes haploïdes. A partir des distributions de fréquences des séquences obtenues par séquençage, un algorithme progressif estimerait la taille (en nombre de répétitions du motif microsatellite) de l'allèle le plus fréquent. Ensuite, il ajouterait successivement des allèles et estimerait leur

fréquence jusqu'à ce que l'amélioration de la corrélation entre distribution observée et estimée ne soit plus significative. Le développement de cet outil informatique clarifierait le niveau de diversité génétique chez *A. viridis* et plus généralement permettrait de traiter toutes les données de type métagénomique sur un grand nombre d'individus haploïdes séquencés.

IV.4. L'holobiotte comme unité de sélection ?

Anemonia viridis est un système symbiotique dynamique dans lequel nous avons pu mettre en évidence des diversités génétiques hôte et symbiotiques qui ne sont pas strictement corrélées. Chez cette anémone les Symbiodiniacées sont transmises verticalement, ce qui assure la présence de symbiotes dès les premiers stades de développement de l'hôte. Cependant nos résultats pourraient suggérer une acquisition horizontale possible de Symbiodiniacées du *pool* local, à un stade de développement plus tardif. Chez les Symbiodiniacées associées à des Cnidaires, différentes réponses ont été observées entre clades/genres, à différents facteurs comme l'intensité lumineuse, la température ou encore le pH (*cf.* chapitre I.3.3 et pour exemple Suggett et al. 2008; Iglesias-Prieto & Trench 1994; Brading et al. 2011) ; mais également au sein d'une espèce entre deux populations symbiotiques différentes (Howells et al. 2012). L'existence d'un modèle mixte de transmission permettrait une adaptation rapide de l'holobiotte aux variations environnementales simplement par une modification du contenu symbiotique. Dans ce cas la sélection peut agir indépendamment sur l'hôte et la population de symbiotes. Pour tester cela, nous pourrions mesurer la résistance à un test d'effort mais cette fois avec des anémones partageant les mêmes populations de Symbiodiniacées et d'autres habitant des populations symbiotiques différentes.

Comme évoqué en introduction, les holobiotes que sont les Cnidaires symbiotiques ne sont toutefois pas uniquement formés d'un hôte animal et de symbiotes photosynthétiques, mais également d'autres micro-organismes impliqués dans le bon fonctionnement de l'holobiotte

dans son ensemble, en servant par exemple de source d'azote (Rohwer et al. 2002; Suggett et al. 2017). Chez *A. viridis*, une approche OTU a permis de mettre en évidence une augmentation de la diversité de la communauté bactérienne dans un site à pH 7 par rapport à site à pH plus basique (8,1), sans modification de la densité de Symbiodiniacées (Meron et al. 2013). Cette augmentation de la diversité a été proposée comme facteur améliorant la probabilité de survie et d'acclimatation aux variations environnementales.

Si les modulations de réponse à l'environnement peuvent se faire à différents niveaux (hôtes, Symbiodiniacées, autres microbiotes), l'effet de leur association doit être prise en compte pour comprendre le fonctionnement et les capacités évolutives de l'holobiotte. Quel(s) partenaire(s) est (sont) susceptible(s) de répondre à quelle(s) variation(s) environnementale(s) ? Comment ces partenaires pourraient interagir ? Pourquoi ces associations sont maintenues ou non ? Ces différentes questions font d'*Anemonia viridis* un modèle de système symbiotique, certes complexe mais dont l'étude promet d'apporter encore de nombreuses informations sur le fonctionnement des holobiotes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdoullaye D, Acevedo I, Adebayo AA, Behrmann-Godel J, Benjamin RC, et al. 2010. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2009–30 September 2009. *Mol. Ecol. Resour.* 10(1):232–36
- Agence française pour la biodiversité. *Cartomer*. <http://cartographie.aires-marines.fr>
- Andres A. 1882. Interno alla scissiparità delle attinie. . 3:124–48
- Andres A. 1884. *Le Attinie: Monografia Del d'Angelo Andres. Volume Primo, Contente Bibliografia, Introduzione e Specigrafia*, Vol. 9. Leipzig, Germany: W. Engelmann. Fauna und Flora des Golfes von Neapel ed.
- Aranda M, Li Y, Liew YJ, Baumgarten S, Simakov O, et al. 2016. Genomes of coral dinoflagellate symbionts highlight evolutionary adaptations conducive to a symbiotic lifestyle. *Sci. Rep.* 6:39734
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F, Serrão EA. 2007. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Mol. Ecol.* 16(24):5115–5139
- Ayata S-D, Irisson J-O, Aubert A, Berline L, Dutay J-C, et al. 2018. Regionalisation of the Mediterranean basin, a MERMEX synthesis. *Prog. Oceanogr.* 163:7–20
- Bahri-Sfar L, Lemaire C, Hassine OKB, Bonhomme F. 2000. Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 267(1446):929–935
- Bailleul D, Stoeckel S, Arnaud-Haond S. 2016. RClone: a package to identify MultiLocus Clonal Lineages and handle clonal data sets in R. *Methods Ecol. Evol.* 7(8):966–70
- Baird AH, Guest JR, Willis BL. 2009. Systematic and Biogeographical Patterns in the Reproductive Biology of Scleractinian Corals. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40(1):551–71
- Baker A. 2001. Reef corals bleach to survive change. *Nature.* 411:765–66
- Baker AC. 2003. Flexibility and Specificity in Coral-Algal Symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of Symbiodinium. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34(1):661–89
- Baker DM, Freeman CJ, Wong JCY, Fogel ML, Knowlton N. 2018. Climate change promotes parasitism in a coral symbiosis. *ISME J.* 12(3):921
- Baumann P, Baumann L, Lai C-Y, Rouhbakhsh D, Moran NA, Clark MA. 1995. GENETICS, PHYSIOLOGY, AND EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS OF THE GENUS BUCHNERA: Intracellular Symbionts of Aphids. *Annu. Rev. Microbiol.* 49(1):55–94
- Baums IB, Devlin-Durante MK, LaJeunesse TC. 2014. New insights into the dynamics between reef corals and their associated dinoflagellate endosymbionts from population genetic

Références bibliographiques

- studies. *Mol. Ecol.* 23(17):4203–15
- 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(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. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 87(3):431–41
- Bianchi CN, Morri C, Navone A. 2010. I popolamenti delle scogliere rocciose sommerse dell'Area Marina Protetta di Tavolara Punta Coda Cavallo (Sardegna nord-orientale). *Trav. Sci. Parc Natl. Port-Cros.* 24:39–85
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, et al. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22(3):148–55
- Brading P, Warner ME, Davey P, Smith DJ, Achterberg EP, Suggett DJ. 2011. Differential effects of ocean acidification on growth and photosynthesis among phylotypes of *Symbiodinium* (Dinophyceae). *Limnol. Oceanogr.* 56(3):927–38
- Bronstein JL. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends Ecol. Evol.* 9(6):214–17
- Buckling A, Wei Y, Massey RC, Brockhurst MA, Hochberg ME. 2006. Antagonistic coevolution with parasites increases the cost of host deleterious mutations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273(1582):45–49
- Bulnheim HP, Sauer KP. 1984. *Anemonia sulcata*-two species? Genetical and ecological evidence. *Verhandlungen Dtsch. Zool. Ges.* 77:264
- Byler KA, Carmi-Veal M, Fine M, Goulet TL. 2013. Multiple Symbiont Acquisition Strategies as an Adaptive Mechanism in the Coral *Stylophora pistillata*. *PLoS ONE.* 8(3):e59596
- Bythell JC, Douglas AE, Sharp VA, Searle JB, Brown BE. 1997. Algal genotype and photoacclimatory responses of the symbiotic alga *Symbiodinium* in natural populations of the sea anemone *Anemonia viridis*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 264(1386):1277–82
- Cain AJ, King JMB, Sheppard PM. 1960. New Data on the Genetics of Polymorphism in the Snail *Cepaea Nemoralis* L. *Genetics.* 45(4):393–411
- Calado R, Dionísio G, Dinis MT. 2007. Decapod crustaceans associated with the snakelock anemone *Anemonia sulcata*. Living there or just passing by? *Sci. Mar.* 71(2):287–92
- Casado-Amezúa P, Machordom A, Bernardo J, González-Wangüemert M. 2014. New insights into the genetic diversity of zooxanthellae in Mediterranean anthozoans. *Symbiosis.* 63(1):41–46

- Catanéo J. 2011. *Adaptation d'Eunicella singularis en milieu perturbé: symbiose et structuration génétique*. Nice Sophia Antipolis
- Catanéo J, Ortu M-F, Furla P, Forcioli D. 2009. Development of microsatellite loci from a Mediterranean symbiotic gorgonian, *Eunicella singularis* (Cnidaria, Anthozoa), and its temperate-A Symbiodinium. *Mol. Ecol. Resour.* 10:232–36
- Centro di Educazione Ambientale “Casa Archilei” di Fano. *La Valle del Metauro :: Anemonia viridis*. www.lavalledelmetauro.it
- Chi SI, Urbarova I, Johansen SD. 2018. Expression of homing endonuclease gene and insertion-like element in sea anemone mitochondrial genomes: Lesson learned from *Anemonia viridis*. *Gene.* 652:78–86
- Chifman J, Kubatko L. 2014. Quartet Inference from SNP Data Under the Coalescent Model. *Bioinformatics.* 30(23):3317–24
- Chintiroglou C, Koukouras A. 1992a. A Population of the Sea Anemone *Anemonia viridis* (FÖRSKAL, 1775) and its Associated Flora and Fauna, in the North Aegean Sea. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol. Hydrogr.* 77(3):483–495
- Chintiroglou CC, Karalis P. 2000. Biometric investigations on the cnidae of the Aegean colour morphs of *Anemonia viridis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 80(3):543–44
- Chintiroglou Ch, Koukouras A. 1992b. The feeding habits of three Mediterranean sea anemone species, *Anemonia viridis* (Forskål), *Actinia equina* (Linnaeus) and *Cereus pedunculatus* (Pennant). *Helgoländer Meeresunters.* 46(1):53–68
- Coffroth MA, Santos SR. 2005. Genetic Diversity of Symbiotic Dinoflagellates in the Genus *Symbiodinium*. *Protist.* 156(1):19–34
- Coppa S, De Lucia GA, Massaro G, Camedda A, Marra S, et al. 2016. Is the establishment of MPAs enough to preserve endangered intertidal species? The case of *Patella ferruginea* in Mal di Ventre Island (W Sardinia, Italy): EXTINCTION RISK OF *PATELLA FERRUGINEA* IN THE SINIS MPA. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 26(4):623–38
- Cornuet J-M, Ravigné V, Estoup A. 2010. Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v.1.0). *BMC Bioinformatics.* 11
- Creed ER, Lees DR, Bulmer MG. 1980. Pre-adult viability differences of melanic *Biston betularia* (L.) (Lepidoptera). *Biol. J. Linn. Soc.* 13(4):251–62
- Cryan JF, Dinan TG. 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13(10):701–12
- Currey JD, Arnold RW, Carter MA. 1964. Further Examples of Variation of Populations of *Cepaea nemoralis* with Habitat. *Evolution.* 18(1):111–17

Références bibliographiques

- Daskin JH, Alford RA. 2012. Context-dependent symbioses and their potential roles in wildlife diseases. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279(1733):1457–65
- Davy SK, Allemand D, Weis VM. 2012. Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76(2):229–261
- Davy SK, Lucas IAN, Turner JR. 1996. Carbon budgets in temperate anthozoan-dinoflagellate symbioses. *Mar. Biol.* 126(4):773–783
- Dawkins R, Krebs JR. 1979. Arms races between and within species. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 205(1161):489–511
- De Bary A. 1879. De la symbiose. *Rev. Int. Sci.* 3:301–9
- De Queiroz K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol.* 56(6):879–86
- DORIS. *Anemonia viridis* | DORIS. DORIS. <http://doris.ffessm.fr>
- Douek J, Barki Y, Gateño D, Rinkevich B. 2002. Possible cryptic speciation within the sea anemone *Actinia equina* complex detected by AFLP markers. *Zool. J. Linn. Soc.* 136(3):315–20
- Duperron S. 2017. *Les Symbioses Microbiennes, Associations Au Coeur Du Vivant*. ISTE editions ed.
- Duperron S, Quiles A, Szafranski KM, Léger N, Shillito B. 2016. Estimating Symbiont Abundances and Gill Surface Areas in Specimens of the Hydrothermal Vent Mussel *Bathymodiolus puteoserpentis* Maintained in Pressure Vessels. *Front. Mar. Sci.* 3:
- Durand EY, Patterson N, Reich D, Slatkin M. 2011. Testing for Ancient Admixture between Closely Related Populations. *Mol. Biol. Evol.* 28(8):2239–52
- Ebert D. 2013. The Epidemiology and Evolution of Symbionts with Mixed-Mode Transmission. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 44(1):623–43
- Emerson KJ, Merz CR, Catchen JM, Hohenlohe PA, Cresko WA, et al. 2010. Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(37):16196–200
- Ence DD, Carstens BC. 2011. SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. *Mol. Ecol. Resour.* 11(3):473–80
- Eren AM, Morrison HG, Lescault PJ, Reveillaud J, Vineis JH, Sogin ML. 2015. Minimum entropy decomposition: Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *ISME J.* 9(4):968–79
- Farineau J, Morot-Gaudry J-F. 2006. *La Photosynthèse, Processus Physiques, Moléculaires et Physiologiques*. Paris: INRA

- Ferrara G, Murgia B, Parodi A, Valisano L, Cerrano C, et al. 2006. The assessment of DNA from marine organisms via a modified salting-out protocol. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11(2):
- Flot J-F, Blanchot J, Charpy L, Cruaud C, Licuanan WY, 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(1):22
- Forcioli D, Merle P, Caligara C, Ciosi M, Muti 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
- Forskål P. 1775. *Descriptiones Animalium, Avium, Amphibiorum, Piscium, Insectorum, Vermium; Quae in Itinere Orientali Observavit*. Copenhagen: Mölleri, Havniae
- Frade PR, Englebert N, Faria J, Visser PM, Bak RPM. 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(4):913–25
- Fraïsse C, Belkhir K, Welch JJ, Bierne N. 2016. Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Mol. Ecol.* 25(1):269–86
- Frichot E, François O. 2015. LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods Ecol. Evol.* 6(8):925–29
- Fruciano C, Tigano C, Ferrito V. 2011. Geographical and morphological variation within and between colour phases in *Coris julis* (L. 1758), a protogynous marine fish. *Biol. J. Linn. Soc.* 104(1):148–162
- 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. *PLoS Genet.* 7(7):e1002187
- 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(6):915–34
- Gattuso J-P. 1987. *Ecomorphologie, métabolisme, croissance et calcification du scléactiniaire à zooxanthelles Stylophora pistillata (Golfe d'Aqaba, Mer Rouge): influence de l'éclairement*. PhD Thesis thesis. Aix-Marseille 2
- GBIF. *Anemonia viridis* (Forskål, 1775). GBIF. www.gbif.org
- Gilbert SF, Sapp J, Tauber AI. 2012. A Symbiotic View of Life: We Have Never Been Individuals. *Q. Rev. Biol.* 87(4):325–41
- González-Muñoz R, Simões N, Mascaró M, Tello-Musi JL, Brugler MR, Rodríguez E. 2015.

Références bibliographiques

- Morphological and molecular variability of the sea anemone *Phymanthus crucifer* (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria, Actinoidea). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 95(1):69–79
- Grajales A, Rodríguez E, Thornhill DJ. 2016. Patterns of *Symbiodinium* spp. associations within the family Aiptasiidae, a monophyletic lineage of symbiotic of sea anemones (Cnidaria, Actiniaria). *Coral Reefs.* 35(1):345–55
- Green RE, Krause J, Briggs AW. 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. *science* 328
- Gruber DF, Kao H-T, Janoschka S, Tsai J, Pieribone VA. 2008. Patterns of fluorescent protein expression in scleractinian corals. *Biol. Bull.* 215(2):143–154
- Hanna C, Schönberg L, De Beer D, Lawton A. 2005. OXYGEN MICROSENSOR STUDIES ON ZOOXANTHELLATE CLIONAID SPONGES FROM THE COSTA BRAVA, MEDITERRANEAN SEA1. *J. Phycol.* 41(4):774–779
- Harland AD, Bryan GW, Brown BE. 1990. Zinc and cadmium absorption in the symbiotic anemone *Anemonia viridis* and the non-symbiotic anemone *Actinia equina*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 70(4):789–802
- Harland AD, Nganro NR. 1990. Copper uptake by the sea anemone *Anemonia viridis* and the role of zooxanthellae in metal regulation. *Mar. Biol.* 104(2):297–301
- Harper JL. 1977. *Population Biology of Plants*. UK, London: Academic Press.
- Hartle-Mougiou K, D'Angelo C, Smith EG, Burt J, West P, Wiedenmann J. 2012. Diversity of zooxanthellae from corals and sea anemones after long-term aquarium culture. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 92(4):687–91
- Hill DJ. 2009. Asymmetric Co-evolution in the Lichen Symbiosis Caused by a Limited Capacity for Adaptation in the Photobiont. *Bot. Rev.* 75(3):326–38
- Hou Y, Lin S. 2009. Distinct Gene Number-Genome Size Relationships for Eukaryotes and Non-Eukaryotes: Gene Content Estimation for Dinoflagellate Genomes. *PLoS ONE.* 4(9):e6978
- Howells EJ, Beltran VH, Larsen NW, Bay LK, Willis BL, van Oppen MJH. 2012. Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nat. Clim. Change.* 2(2):116–20
- Hume BCC. 2019. *Didillysquat/SymPortal_framework: V0.2.7*. Zenodo
- Hume BCC, Smith EG, Ziegler M, Warrington HJM, Burt JA, et al. 2019. SymPortal: A novel analytical framework and platform for coral algal symbiont next-generation sequencing ITS2 profiling. *Mol. Ecol. Resour.* 19(4):1063–80
- Iglesias-Prieto R, Trench R. 1994. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 113:163–75

- INPN. *Anemonia viridis* (Forsskål, 1775). Inventaire National du Patrimoine Naturel. <https://inpn.mnhn.fr>
- IOBIS. *Anemonia viridis* (Forsskål, 1775). IOBIS. www.iobis.org
- Isnard E, Tournois J, McKenzie DJ, Ferraton F, Bodin N, et al. 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 Coasts*. 38(6):1937–50
- Johnson VR, Brownlee C, Rickaby REM, Graziano M, Milazzo M, Hall-Spencer JM. 2013. Responses of marine benthic microalgae to elevated CO₂. *Mar. Biol.* 160(8):1813–24
- Kao H-T, Sturgis S, DeSalle R, Tsai J, Davis D, et al. 2007. Dynamic regulation of fluorescent proteins from a single species of coral. *Mar. Biotechnol.* 9(6):733–746
- Kawecki TJ, Ebert D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7(12):1225–41
- Kenkel CD, Traylor MR, Wiedenmann J, Salih A, Matz MV. 2011. Fluorescence of coral larvae predicts their settlement response to crustose coralline algae and reflects stress. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278(1718):2691–97
- Kerney R, Kim E, Hangarter RP, Heiss AA, Bishop CD, Hall BK. 2011. Intracellular invasion of green algae in a salamander host. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(16):6497–6502
- Kess T, Galindo J, Boulding EG. 2018. Genomic divergence between Spanish *Littorina saxatilis* ecotypes unravels limited admixture and extensive parallelism associated with population history. *Ecol. Evol.* 8(16):8311–27
- Kettlewell HBD. 1955. Selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. *Heredity*. 9(3):323–42
- Korte A, Farlow A. 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*. 9(1):29
- LaJeunesse TC, Lambert G, Andersen RA, Coffroth MA, Galbraith DW. 2005. *Symbiodinium* (pyrrhophyta) Genome Sizes (dna Content) Are Smallest Among Dinoflagellates1. *J. Phycol.* 41(4):880–86
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, et al. 2018. Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Curr. Biol.* 28(16):2570-2580.e6
- LaJeunesse TC, Smith R, Walther M, Pinzón J, Pettay DT, et al. 2010. Host–symbiont recombination versus natural selection in the response of coral–dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 277(1696):2925–34
- LaJeunesse TC, Thornhill DJ. 2011. Improved Resolution of Reef-Coral Endosymbiont

Références bibliographiques

- (*Symbiodinium*) Species Diversity, Ecology, and Evolution through psbA Non-Coding Region Genotyping. *PLoS ONE*. 6(12):e29013
- Lampert KP, Bürger P, Striewski S, Tollrian R. 2012. Lack of association between color morphs of the Jellyfish *Cassiopea andromeda* and zooxanthella clade: *Cassiopea*: color morphs and zooxanthella clade. *Mar. Ecol.* 33(3):364–69
- Larousse É. *Définitions : individu - Dictionnaire de français Larousse*. www.larousse.fr
- Leaché A, Ogilvie HA. 2016. Bayes Factor Delimitation of Species (*with genomic data; BFD*): A Tutorial and Worked Example. . 16
- Leutenegger A, D'Angelo C, Matz MV, Denzel A, Oswald F, et al. 2007. It's cheap to be colorful: Anthozoans show a slow turnover of GFP-like proteins. *FEBS J.* 274(10):2496–2505
- Leutenegger S. 1977. Ultrastructure and motility of dinophyceans symbiotic with larger, imperforated foraminifera. *Mar. Biol.* 44(2):157–164
- Leydet KP, Hellberg ME. 2016. Discordant coral–symbiont structuring: factors shaping geographical variation of *Symbiodinium* communities in a facultative zooxanthellate coral genus, *Oculina*. *Coral Reefs*. 35(2):583–95
- López-García P, Eme L, Moreira D. 2017. Symbiosis in eukaryotic evolution. *J. Theor. Biol.*
- Loram JE, Trapido-Rosenthal HG, Douglas AE. 2007. Functional significance of genetically different symbiotic algae *Symbiodinium* in a coral reef symbiosis. *Mol. Ecol.* 16(22):4849–57
- Lukyanov KA, Fradkov AF, Gurskaya NG, Matz MV, Labas YA, et al. 2000. Natural Animal Coloration Can Be Determined by a Nonfluorescent Green Fluorescent Protein Homolog. *J. Biol. Chem.* 275(34):25879–82
- Maddison WP, Maddison DR. 2018. *Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis*
- Mallien C. 2017. *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*. Université Nice Sophia Antipolis
- Mallien C, Porro B, Zamoum T, Olivier C, Wiedenmann J, et al. 2017. Conspicuous morphological differentiation without speciation in *Anemonia viridis* (Cnidaria, Actiniaria). *Syst. Biodivers.* 16(3):271–86
- Margulis L, Fester R, eds. 1991. *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*. MIT Press
- Merezhkowsky C. 1909. The theory of two plasms as foundation of symbiogenesis. A new doctrine on the origins of organisms. *Proc. Stud. Imp. Kazan Univ.* 12:1–102

- Meron D, Buia M-C, Fine M, Banin E. 2013. Changes in Microbial Communities Associated with the Sea Anemone *Anemonia viridis* in a Natural pH Gradient. *Microb. Ecol.* 65(2):269–76
- Moran NA, Bennett GM. 2014. The Tiniest Tiny Genomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 68(1):195–215
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. 2008. Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annu. Rev. Genet.* 42(1):165–90
- 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*. *Mol. Ecol.* 21(5):1158–74
- Muscatine L, Ferrier-Pagès C, Blackburn A, Gates RD, Baghdasarian G, Allemand D. 1998. Cell-specific density of symbiotic dinoflagellates in tropical anthozoans. *Coral Reefs.* 17(4):329–37
- Nardon P, Grenier A-M. 1993. Symbiose et Evolution. *Ann. Société Entomol. Fr.* 29(2):113–40
- NBN. *Anemonia viridis: Snakelocks anemone | NBN Atlas | NBN Atlas*. NBN. <https://species.nbnatlas.org>
- Oulhen N, Schulz BJ, Carrier TJ. 2016. English translation of Heinrich Anton de Bary’s 1878 speech, ‘Die Erscheinung der Symbiose’ (‘De la symbiose’). *Symbiosis.* 69(3):131–39
- Pais A, Serra S, Saba S, Meloni G, Dimauro C, et al. 2008. Sopravvivenza e crescita di esemplari di *Anemonia viridis* (Forskål, 1775) alimentati con diete diverse in ambiente controllato. *Biol. Mar. Mediterr.* 15(1):236–37
- Pante E, Abdelkrim J, Viricel A, Gey D, France S, et al. 2015a. Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity.* (114):450–59
- Pante E, Puillandre N, Viricel A, Arnaud-Haond S, Aurelle D, et al. 2015b. Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Mol. Ecol.*
- Patzner RA. 2004. Associations with sea anemones in the Mediterranean Sea: A review. *Ophelia.* 58(1):1–11
- Pennant T. 1777. *A British Zoology*. London: Benj. White
- Pereira AM, Brito C, Sanches J, Sousa-Santos C, Robalo JI. 2014. Absence of consistent genetic differentiation among several morphs of *Actinia* (Actiniaria: Actiniidae) occurring in the Portuguese coast. *Zootaxa.* 3893(4):595–600
- Perlman DP. 2007. Views of a conservation biologist. *Lasting Landsc. Reflect. Role Conserv. Sci. Land Use Plan.* Ed RK Wilkinson. 41–51
- Pey A, Catanéo J, Forcioli D, Merle P-L, Furla P. 2013. Thermal threshold and sensitivity of

Références bibliographiques

- the only symbiotic Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis* by morphometric and genotypic analyses. *C. R. Biol.* 336(7):331–41
- Pochon X, Montoya-Burgos JI, Stadelmann B, Pawlowski J. 2006. Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38(1):20–30
- Porro B, Mallien C, Hume BCC, Pey A, Aubin E, et al. 2019. The many faced symbiotic snakelocks anemone (*Anemonia viridis*, Anthozoa): host and symbiont genetic differentiation among colour morphs. *Heredity.* 1–16
- Posbic Leydet K, Grupstra CGB, Coma R, Ribes M, Hellberg ME. 2018. Host-targeted RAD-Seq reveals genetic changes in the coral *Oculina patagonica* associated with range expansion along the Spanish Mediterranean coast. *Mol. Ecol.* 27(11):2529–43
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 464(7285):59–65
- Rand DM, Haney RA, Fry AJ. 2004. Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends Ecol. Evol.* 19(12):645–53
- Ree RH, Hipp AL. 2015. Inferring phylogenetic history from restriction site associated DNA (RADseq). -*Gener. Seq. Plant Syst. E Hörandl MS Appelhans.* 181–204
- Richards PM, Liu MM, Lowe N, Davey JW, Blaxter ML, Davison A. 2013. RAD-Seq derived markers flank the shell colour and banding loci of the *Cepaea nemoralis* supergene. *Mol. Ecol.* 22(11):3077–89
- Richardson DHS. 1999. War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. *Mycol. Res.* 103(6):641–50
- Robison JD, Warner ME. 2006. Differential Impacts of Photoacclimation and Thermal Stress on the Photobiology of Four Different Phylotypes of *Symbiodinium* (pyrrhophyta)1. *J. Phycol.* 42(3):568–79
- Rodríguez E, Barbeitos MS, Brugler MR, Crowley LM, Grajales A, et al. 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(5):e96998
- Rohwer F, Seguritan V, Azam F, Knowlton N. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243:1–10
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(5):355–62
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. 2011. The Hologenome Concept. In *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms*, eds. E Rosenberg, U Gophna, pp. 323–40.

Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

- Roth MS, Fan T-Y, Deheyn DD. 2013. Life History Changes in Coral Fluorescence and the Effects of Light Intensity on Larval Physiology and Settlement in *Seriatopora hystrix*. *PLoS ONE*. 8(3):e59476
- Sabourault C, Ganot P, Deleury E, Allemand D, Furla P. 2009. Comprehensive EST analysis of the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *BMC Genomics*. 10(1):333
- Salih A, Larkum A, Cox G, Kühl M, Hoegh-Guldberg O. 2000. Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature*. 408(6814):850–53
- Santos SR, Coffroth MA. 2003. Molecular genetic evidence that dinoflagellates belonging to the genus *Symbiodinium* Freudenthal are haploid. *Biol. Bull.* 204(1):10–20
- Sauer KP, Müller M, Weber M. 1986. Alloimmune memory for glycoprotein recognition molecules in sea anemones competing for space. *Mar. Biol.* 92(1):73–79
- Savage AM, Goodson MS, Visram S, Trapido-Rosenthal H, Wiedenmann J, Douglas AE. 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
- Schäfer W. 1984. Fortpflanzung und Entwicklung von *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actiniaria). I: Fortpflanzungszyklus und Struktur der Oocyten vor und nach der Besamung. *Helgoländer Meeresunters.* 38(2):135–148
- Schlesinger A, Goldshmid R, Hadfield MG, Kramarsky-Winter E, Loya Y. 2009. Laboratory culture of the aeolid nudibranch *Spurilla neapolitana* (Mollusca, Opisthobranchia): life history aspects. *Mar. Biol.* 156(4):753–61
- Schmidt H. 1972. Prodrömus zu einer Monographie der mediterranen Aktinien
- Schmidt-Roach S, Lundgren P, Miller KJ, Gerlach G, Noreen AME, Andreakis N. 2013. Assessing hidden species diversity in the coral *Pocillopora damicornis* from Eastern Australia. *Coral Reefs*. 32(1):161–72
- Scott GD. 1973. Chapter 19 - EVOLUTIONARY ASPECTS OF SYMBIOSIS. In *The Lichens*, eds. V Ahmadjian, ME Hale, pp. 581–98. Academic Press
- SeaLifeBase. *Anemonia sulcata*, *snakelocks anemone*. SeaLifeBase. www.sealifebase.org
- Shick JM. 1991. *A Functional Biology of Sea Anemones*. Springer Netherlands
- Simonini R, Maletti I, Righi S, Fai S, Prevedelli D. 2018. Laboratory observations on predator–prey interactions between the bearded fireworm (*Hermodice carunculata*) and Mediterranean benthic invertebrates. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 51(3):145–58
- Simpson C, Kiessling W, Mewis H, Baron-Szabo RC, Müller J. 2011. Evolutionary

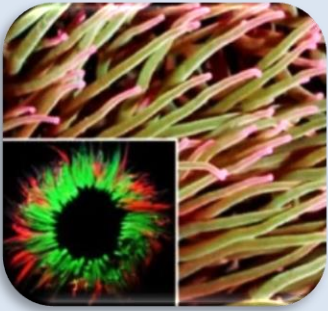
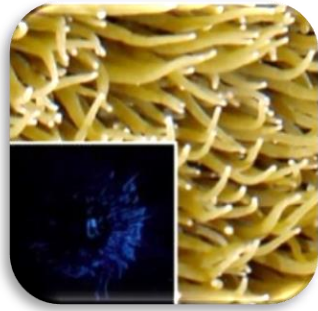
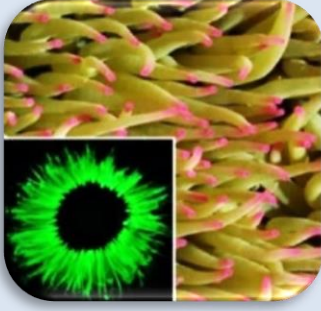

Références bibliographiques

- Diversification of Reef Corals: A Comparison of the Molecular and Fossil Records. *Evolution*. 65(11):3274–84
- Singh Y, Ahmad J, Musarrat J, Ehtesham NZ, Hasnain SE. 2013. Emerging importance of holobionts in evolution and in probiotics. *Gut Pathog*. 5:12
- Smith LW, Barshis D, Birkeland C. 2007. Phenotypic plasticity for skeletal growth, density and calcification of *Porites lobata* in response to habitat type. *Coral Reefs*. 26(3):559–67
- Spano CA, Häussermann V, Acuña FH, Griffiths C, Seeb LW, Gomez-Uchida D. 2018. Hierarchical biogeographical processes largely explain the genomic divergence pattern in a species complex of sea anemones (Metridioidea: Sagartiidae: Anthothoe). *Mol. Phylogenet. Evol.* 127:217–28
- Sromek L. 2017. *Phylogeography and population genomics of the lagoon cockle Cerastoderma glaucum*. Université Nice Sophia Antipolis, University of Gdansk
- Sromek L, Forcioli D, Lasota R, Furla P, Wolowicz M. 2019. Next-generation phylogeography of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Highly heterogeneous genetic differentiation in a lagoon species. *Ecol. Evol.* 9(8):4667–82
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30(9):1312–13
- Stambler N, Dubinsky Z. 1987. Energy relationships between *Anemonia sulcata* and its endosymbiotic zooxanthellae. *Symbiosis*. 3:233–248
- Stewart FM, Levin BR. 1984. The population biology of bacterial viruses: Why be temperate. *Theor. Popul. Biol.* 26(1):93–117
- Suez M, Behdenna A, Brouillet S, Graça P, Higuët D, Achaz G. 2016. MicNeSs: genotyping microsatellite loci from a collection of (NGS) reads. *Mol. Ecol. Resour.* 16(2):524–33
- Suggett DJ, Hall-Spencer JM, Rodolfo-Metalpa R, Boatman TG, Payton R, et al. 2012. Sea anemones may thrive in a high CO₂ world. *Glob. Change Biol.* 18(10):3015–25
- Suggett DJ, Warner ME, Leggat W. 2017. Symbiotic Dinoflagellate Functional Diversity Mediates Coral Survival under Ecological Crisis. *Trends Ecol. Evol.* 32(10):735–45
- Suggett DJ, Warner ME, Smith DJ, Davey P, Hennige S, Baker NR. 2008. Photosynthesis and Production of Hydrogen Peroxide by Symbiodinium (pyrrhophyta) Phylotypes with Different Thermal Tolerances1. *J. Phycol.* 44(4):948–56
- Swain TD, Westneat MW, Backman V, Marcelino LA. 2018. Phylogenetic analysis of symbiont transmission mechanisms reveal evolutionary patterns in thermotolerance and host specificity that enhance bleaching resistance among vertically transmitted *Symbiodinium*. *Eur. J. Phycol.* 53(4):443–59
- Tambutté E, Venn AA, Holcomb M, Segonds N, Techer N, et al. 2015. Morphological plasticity

- of the coral skeleton under CO₂-driven seawater acidification. *Nat. Commun.* 6(1):7368
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725–29
- Tanhua T, Hainbucher D, Schroeder K, Cardin V, Álvarez M, Civitarese G. 2013. The Mediterranean Sea system: a review and an introduction to the special issue. *Ocean Sci.* 9(5):789–803
- Tchernov D, Gorbunov MY, de Vargas C, Yadav SN, Milligan AJ, et al. 2004. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(37):13531–13535
- Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, Brucker RM, Baines JF, et al. 2016. Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems.* 1(2):e00028-16
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W. 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 5(2):123–35
- Todd PA. 2008. Morphological plasticity in scleractinian corals. *Biol. Rev.* 83(3):315–37
- Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T, et al. 2010. Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color. *Science.* 330(6007):1102–4
- Utrilla O, Castro-Claros JD, Urra J, Navas FD, Salas C. 2019. Reproduction of the anthozoan *Anemonia sulcata* (Pennant, 1777) in southern Spain: from asexual reproduction to putative maternal care. *Mar. Biol.* 166(8):111
- van Baalen M, Jansen VAA. 2001. Dangerous liaisons: the ecology of private interest and common good - Van Baalen - 2001 - Oikos - Wiley Online Library. *Oikos.* 95:211–24
- Van Valen L. 1973. A new evolutionary law. *Evol Theory.* 1:1–30
- Ventura P, Jarrold MD, Merle P-L, Barnay-Verdier S, Zamoum T, et al. 2016. Resilience to ocean acidification: decreased carbonic anhydrase activity in sea anemones under high pCO₂ conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 559:257–63
- 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(06):1281–83
- Weis VM. 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* 211(19):3059–66

Références bibliographiques

- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(10):741–51
- Wicksten MK. 1989. Why are there Bright Colors in Sessile Marine Invertebrates? *Bull. Mar. Sci.* 45:12
- 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(26):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(1):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. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 87(04):851
- Wiedenmann J, Röcker C, Funke W. 1999. The morphs of *Anemonia* aff. *sulcata* (Cnidaria, Anthozoa) in particular consideration of the ectodermal pigments. In *Verhandlungen Der Gesellschaft Für Ökologie*, Vol. 29, ed. J Pfadenhauer, pp. 497–503. Spektrum Akademischer Verlag
- Williams RB. 1991. Acrorhagi, catch tentacles and sweeper tentacles: a synopsis of 'aggression' of actinarian and scleractinian Cnidaria. *Hydrobiologia.* 216(1):539–545
- Zamer WE, Mangum CP. 1979. Irreversible nongenetic temperature adaptation of oxygen uptake in clones of the sea anemone *Haliplanella luciae* (verrill). *Biol. Bull.* 157(3):536–47
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(5):723–35

<i>Anemonia viridis</i> morfes & photosymbiote	Chapitres & Annexes	
 <p data-bbox="379 591 624 629"> <i>rufescens</i> </p>	I.L'holobiote, une unité évolutive composite	3
 <p data-bbox="379 1005 608 1043"> <i>rustica</i> </p>	A1.Conspicuous morphological differentiation without speciation in <i>Anemonia viridis</i> (Cnidaria, Actiniaria)	59
 <p data-bbox="379 1420 639 1458"> <i>smaragdina</i> </p>	III.Dynamique d'association hôte-symbiote	127
 <p data-bbox="408 1823 730 1861"> Symbiodiniacée "A tempéré" </p>	IV.Discussion, Conclusions & Perspectives	173
A2.The many faced symbiotic snakelocks anemone (<i>Anemonia viridis</i> , Anthozoa): host and symbiont genetic differentiation among colour morphs.	89	
A3.Geography shapes symbiont composition in <i>Anemonia viridis</i> lineages from the Mediterranean Sea	143	