

Université catholique de Louvain

Ecole de biologie



Université de Namur

Département de biologie



Identification morphologique et génétique d'hybrides chez les corbicules androgénétiques invasives *Corbicula* sp. dans la Waal

Arauxo Nicolas

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Promoteur : Karine Van Doninck (UNamur)

Année académique 2020-2021

Identification morphologique et génétique d'hybrides chez les corbicules androgénétiques invasives *Corbicula* sp. dans la Waal

Les corbicules *Corbicula* sp. sont des mollusques originaires d'Asie et d'Afrique du Sud dont certaines lignées ont colonisé toutes les régions du monde. En Europe, on retrouve les formes A/R, C/S et Rlc. En Amérique, les formes A/R, C/S et B. Ces lignées invasives ont la particularité de se reproduire par androgenèse, un mode de reproduction dans lequel seul le génome nucléaire du père est transmis à la descendance, bien que le génome mitochondrial reste celui de la mère. Chez *Corbicula*, les spermatozoïdes d'une lignée peuvent féconder les œufs d'autres lignées, ce qui conduit à des contradictions entre le génome mitochondrial et nucléaire (mismatch cytonucléaires). Cela permet également l'hybridation entre lignées en cas de rétention d'une copie du génome nucléaire maternel dans un œuf parasité. Dans ce mémoire, nous avons caractérisé une population de corbicules de la Waal (Pays-Bas) du point de vue morphologique et génétique (marqueurs mitochondrial COI, marqueurs nucléaires ATPS, 28S et alpha-amylase, microsatellites).

Nous avons découvert que la lignée B est présente dans cette population (quatre individus), en plus des lignées A/R et C/S. Nous n'avons pu observer qu'un individu de génotype A/R sur tous les marqueurs et un individu de génotype C/S sur tous les marqueurs. Tous les autres individus montrent des génotypes hybrides si l'on considère l'ensemble des marqueurs, bien qu'il y ait fréquemment des génotypes différents d'un marqueur à l'autre. L'haplotype majoritaire au locus COI est FW5, associé à la lignée A/R. Au contraire, les allèles C/S sont prépondérants dans les marqueurs nucléaires. Cela suggère un parasitisme des œufs de la forme A/R par des spermatozoïdes de la forme C/S.

Bien que les populations de *Corbicula* aient été décrites comme clonales, cela ne semble pas être le cas de la population étudiée dans la Waal car peu d'individus présentent le même génotype sur l'ensemble des marqueurs. Cela conduit à l'hypothèse que le mécanisme d'hybridation pourrait avoir lieu successivement entre lignées différentes ou reposer sur une capture partielle du génome maternel, et pose la question de la possibilité de recombinaison chez *Corbicula*.

Morphologiquement, la lignée B se distingue des autres par analyse en composante principale. Par contre, il n'est pas possible de distinguer les formes A/R et C/S des hybrides.

Morphological and genetic identification of hybrids in the invasive androgenetic clam *Corbicula* sp. in the Waal

Corbicula sp. are molluscs native to Asia and South Africa, with certain lineages having colonized all regions of the world. In Europe, the forms A/R, C/S and Rlc are found. In America, the A/R, C/S and B forms. These invasive lineages have the particularity of reproducing by androgenesis, a mode of reproduction in which only the nuclear genome of the father is transmitted to the offspring, although the mitochondrial genome remains that of the mother. In *Corbicula*, sperm from one lineage can fertilize the eggs of other lineages, which leads to contradictions between the mitochondrial and nuclear genomes (cytonuclear mismatch). This also allows hybridization between lines if a copy of the maternal nuclear genome is retained in a parasitized egg. In this thesis, we characterized a population of *Corbicula* from the Waal (the Netherlands) from a morphological and genetic point of view (mitochondrial COI markers, nuclear ATPS, 28S and alpha-amylase markers, microsatellites).

We found that lineage B is present in this population (four individuals), in addition to lineages A/R and C/S. We could only observe one individual with A/R genotype on all markers and one individual with C/S genotype on all markers. All other individuals show hybrid genotypes when considering all markers, although there are frequently different genotypes from one marker to another. The majority haplotype at the COI locus is FW5, associated with the A/R lineage. In contrast, the C/S alleles are prevalent in the nuclear markers. This suggests an invasion of A/R eggs by C/S sperm.

Although *Corbicula* populations have been described as clonal, this does not seem to be the case for the population studied in the Waal as few individuals show the same genotype on all markers. This leads to the hypothesis that the hybridization mechanism could be successive or based on partial capture of the maternal genome, and raises the question of the possibility of recombination in *Corbicula*.

Morphologically, lineage B is distinguished from the others by principal component analysis. However, it is not possible in our data to distinguish the A/R and C/S forms from the hybrids.

Remerciements

Avant toute chose, il me faut remercier l'équipe qui a encadré la réalisation de ce mémoire, le professeur K. Van Doninck (promotrice) et M. Vastrade (encadrant), pour m'avoir donné la possibilité de travailler sur ce sujet riche et passionnant, ainsi que pour leurs conseils. Je remercie en particulier M. Vastrade pour sa disponibilité et son implication.

D'autres personnes ont contribué à la réalisation de ce mémoire. Je remercie A. bij de Vaate pour son expertise de terrain et la réalisation d'une partie de la collecte. Mes remerciements vont aussi à J. Marescaux (e-biom) pour ses conseils à propos de l'analyse microsatellites et à L. Grumiau (ULB) pour son soutien technique dans l'utilisation du séquenceur capillaire. Enfin, je tiens à remercier N. Debortoli (e-biom) qui s'est chargé du traitement bio-informatique des séquences Illumina.

Table des matières

Introduction	7
1. Les espèces invasives	7
1.1. Définition des espèces exotiques envahissantes	7
1.2. Impact des espèces exotiques envahissantes.....	9
1.3. Caractéristiques des espèces exotiques envahissantes	12
1.4. Les espèces exotiques envahissantes en milieu dulcicole.....	13
2. Ecologie du genre <i>Corbicula</i>	15
3. L'androgenèse	16
3.1. Définition	16
3.2. Avantages et inconvénients de l'androgenèse	16
3.3. L'androgenèse chez <i>Corbicula</i>	19
3.4. Parasitisme de l'œuf chez <i>Corbicula</i>	20
3.5. Formation d'hybrides chez <i>Corbicula</i>	21
4. Diversité du genre <i>Corbicula</i>	23
5. Lien entre lignées et populations chez <i>Corbicula</i>	26
5.1. Origine de l'androgenèse chez <i>Corbicula</i>	26
5.2. Origine des lignées invasives.....	27
5.3. Liens entre lignées invasives.....	28
6. Objectifs du mémoire	29
Matériel et méthode.....	30
1. Collecte des individus	30
2. Dissection et prise de mesures morphologiques	32
2.1. Choix des individus.....	32
2.2. Mesure des paramètres morphologiques.....	32
2.3. Analyse des résultats.....	33
3. Extraction d'ADN	33

4. Marqueur mitochondrial COI.....	34
4.1. Amplification PCR et séquençage	34
4.2. Analyse des résultats.....	35
5. Marqueurs microsatellites	35
5.1. Choix des marqueurs.....	35
5.2. Amplification PCR et préparation du génotypage	36
5.3. Analyse des résultats.....	36
6. Clonage du marqueur nucléaire ATPS	37
6.1. Amplification PCR et purification	37
6.2. Clonage	38
6.3. Analyse des résultats.....	39
7. Séquençage Illumina des marqueurs nucléaires ATPS, 28S, alpha-amylase.....	40
7.1. Design des amorces.....	40
7.2. Amplification PCR.....	40
7.3. Purification et multiplexage	41
7.4. Analyse des résultats.....	42
Résultats	44
1. Morphologie	44
2. ADN mitochondrial.....	45
3. ADN nucléaire.....	47
3.1. Microsatellites.....	47
3.2. ATPS.....	50
3.3. 28S	53
3.4. Alpha-amylase	56
4. Synthèse des différents marqueurs	61
5. Lien génétique-morphologie	64
Discussion	66

1. Microsatellites	66
2. Autres marqueurs nucléaires	66
3. Lignées présentes dans la Waal.....	67
4. Mismatches cytonucléaires et hybridation.....	68
5. Morphologie	71
Conclusion et perspectives	73
Références	74
Annexes	80
Annexe 1	80
Annexe 2	80

Introduction

1. Les espèces invasives

1.1. Définition des espèces exotiques envahissantes

Depuis toujours, les êtres vivants ont la capacité de se disperser, et de coloniser de nouveaux territoires. Ces phénomènes de colonisation peuvent être plus ou moins rapides. Les cas de colonisation particulièrement rapides de nouveaux milieux, parfois au détriment des populations déjà présentes, peuvent faire penser à de véritables invasions. Le phénomène d'invasion biologique n'est donc pas une nouveauté. Pourtant, les espèces invasives font encore régulièrement l'objet de débats, tant au niveau des gestionnaires de l'environnement qu'au niveau des scientifiques (Lodge, 1993).

Avant toute chose, il convient de définir les invasives, ce qui n'est pas facile car le terme est ambigu et on lui préférera des termes plus précis (SPN, 2013).

On parle d'espèce envahissante pour décrire « une espèce autochtone ou allochtone sur un territoire donné, qui prolifère et qui étend son aire de distribution liée à une augmentation de la densité des populations. Une espèce autochtone ou allochtone devient souvent envahissante lorsque le milieu est perturbé. » (SPN, 2013).

Cette notion d'espèce envahissante est donc applicable à des taxons autochtones (c'est-à-dire des taxons qui sont présents et forment « *des populations pérennes* » dans la zone géographique considérée dès le début d'une période de temps considérée) ou allochtones (des taxons qui sont absents de la zone géographique considérée au début d'une période de temps donnée, mais qui la colonisent et finissent par y former des populations pérennes) (Pascal *et al.*, 2006; SPN, 2013). Dans le langage courant, le terme espèce invasive s'applique plutôt à des taxons allochtones, et porte une connotation négative absente de la définition ci-dessus. C'est pourquoi le terme utilisé par les législations européennes par exemple, est « espèce exotique envahissantes (E.E.E.) » (UE, 2014). Cette dénomination réfère à une espèce allochtone par rapport au terrain envahi, et insiste sur le fait que ces espèces ont un impact écologique et/ou économique et/ou sanitaire (il ne s'agit donc pas d'une définition strictement scientifique, puisque l'impact sociétal de l'espèce est pris en compte).

Pour être considérée comme une E.E.E., il y a plusieurs étapes à franchir. D'abord, il faut que les individus puissent être transportés hors de leur région native (ou donneuse), puis parviennent à s'implanter dans la région d'arrivée (ou receveuse). Une fois implantée, rien ne dit que l'espèce deviendra envahissante. Ce processus d'invasion est synthétisé en figure 1 :

- D'abord, certains individus de l'espèce sont transportés. Des exemples de moyens de transport courant sont l'avion et les eaux de ballaste. Ces eaux permettent de « lester » les bateaux, et peuvent être transportée d'un bout à l'autre d'un océan. C'est donc un moyen de transport privilégié d'espèces aquatiques potentiellement envahissantes. Certaines espèces ne survivent pas à ce transport, ou ne s'acclimatent pas et disparaissent dès leur arrivée ;
- Les espèces qui ont survécu au transport et qui se sont acclimatées doivent arriver à s'établir, c'est-à-dire à fonder une population autonome. Celles qui n'y arrivent pas disparaissent au bout d'un certain temps, sauf si de nouveaux individus arrivent en permanence ;
- Les espèces qui se sont établies peuvent devenir envahissante ou non selon leurs capacités de reproduction et de dispersion. Cela dépend de caractéristiques biologiques de l'espèce, mais également de son écologie, de paramètres du milieu receveur,... (Kolar and Lodge, 2001).

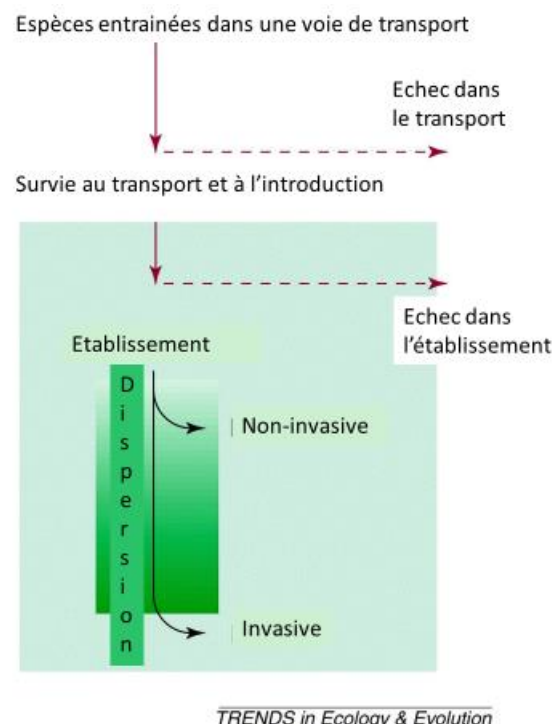


Figure 1 : succession de conditions pour qu'une espèce devienne considérée comme une espèce exotique envahissante (Kolar and Lodge, 2001).

1.2. Impact des espèces exotiques envahissantes

1.2.1. Impact écologique

La question de l'impact écologique des E.E.E. est sujette à de nombreux débats.

D'un côté, les E.E.E. sont souvent décrites comme étant une menace pour la biodiversité (Sala *et al.*, 2000). D'un autre côté, le phénomène d'invasion biologique est favorisée par les perturbations de l'écosystème, par exemple par une perte de diversité (Kolar and Lodge, 2001; Sala *et al.*, 2000). Il semble donc que les E.E.E. puissent à la fois être une cause et/ou une conséquence de la perte de biodiversité.

Par ailleurs, certains scientifiques relativisent l'impact des invasives en soulignant le fait que des changements majeurs dans les communautés sont arrivés fréquemment dans l'histoire de la vie sur Terre, mais reconnaissent néanmoins le risque d'une « homogénéisation mondiale de la biodiversité » due à l'activité humaine (Lodge, 1993). En effet, la vitesse d'introduction et de déplacement des espèces est actuellement bien supérieure à tout ce qui a existé précédemment (Lodge, 1993). De plus, ce sont régulièrement les mêmes espèces qui sont introduites partout.

L'impact écologique des E.E.E. est donc parfois perçu comme minime, surtout au regard des bénéfices sociaux que peuvent engendrer leur introduction dans certaines circonstances. Par exemple, une méta-analyse sur l'introduction de différentes familles de poissons exotiques dans les aquacultures a décrit cette pratique comme étant généralement sans danger pour les populations de poissons locaux (Gozlan, 2008). Cependant, une réponse à cet article parue l'année suivante a montré des diminutions significatives des stocks de poissons locaux, car les poissons importés pour la pêche sont des prédateurs (Vitule *et al.*, 2009). Les cas de diminution de l'abondance d'une espèce à cause de la prédation par une espèce invasive existent et conduisent parfois à un risque d'extinction, comme dans le cas de la prédation des œufs d'oiseaux marin par des souris *Mus musculus* invasives sur l'île de Gough (Caravaggi *et al.*, 2019).

Les effets au niveau des écosystèmes peuvent en effet être très variables selon les caractéristiques de l'espèce envahissante, la niche écologique qu'elle peut occuper mais aussi selon les caractéristiques du milieu envahi (Pyšek *et al.*, 2012; Simberloff *et al.*, 2013). Par exemple, une invasion biologique d'un milieu terrestre par des plantes aura beaucoup plus de risques d'aboutir à une perte de biodiversité sur une île que sur un continent, puisque ce milieu ne permet pas l'immigration constante d'individus « natifs » (Pyšek *et al.*, 2012). De plus, les

espèces insulaires ont souvent eu moins de contact avec d'autres espèces que des espèces continentales et sont donc moins adaptées à coexister avec de nouvelles espèces.

La perte de biodiversité peut être due à une compétition de l'E.E.E. avec les espèces locales, aboutissant parfois à un remplacement complet de l'espèce locale par l'invasive. Ce remplacement d'espèce locale par une E.E.E. écologiquement proche peut-être influencé par la migration, la sélection, mais aussi, si les deux espèces sont phylogénétiquement proches, par les possibilités d'hybridation entre l'espèce locale et sa cousine invasive. Ces hybridations peuvent accélérer le remplacement puisque les hybrides rentrent aussi en compétition avec l'espèce locale non-hybride (Huxel, 1999). Cependant, ce modèle est à nuancer car les effets de l'hybridation sont complexes. Par exemple, une étude chez des truites du genre *Oncorhynchus* a montré que les individus hybrides étaient favorisés pour la dispersion (donc augmentation du potentiel invasif), mais que les génotypes hybrides semblaient contre-sélectionnés dans la majorité des cours d'eau. En effet, les adultes présents montraient en moyenne une proportion de génome venant de la truite invasive beaucoup plus faible que les jeunes, indiquant une faible survie de ceux qui contenaient plus de ce génome hybride (Kovach *et al.*, 2015).

1.2.2. Impact économique

Les espèces invasives peuvent avoir un impact économique direct et important, par exemple si elles se nourrissent d'un produit de consommation humaine (Pyšek and Richardson, 2010). Cependant, l'impact économique des espèces invasives est aussi lié aux mesures de gestion et de prévention (Olson, 2006).

Ces mesures vont varier en fonction du temps écoulé entre le début de l'invasion et la première intervention (figure 2). Dans un premier temps on privilégiera des mesures de prévention (Simberloff *et al.*, 2013). La prévention consiste à informer le public et les professionnels des transports, à mettre en place des législations et des mesures de quarantaines pour empêcher la propagation d'espèces invasives. Un exemple est le renouvellement des eaux de ballastes. Le fait de changer les eaux de ballaste à mi-parcours est une mesure de prévention qui permet d'éliminer 99% du plancton et de tuer la plupart des autres animaux transportés présent au départ (Gray *et al.*, 2007).

Si ces mesures échouent, la détection de l'espèce dans les premiers temps de l'invasion doit entraîner une réponse rapide, souvent pour éliminer complètement la présence de l'espèce. On ne se résout généralement qu'en dernier recours à accepter un contrôle de la population sur le long terme (Simberloff *et al.*, 2013). Il y a deux raisons à cela :

- Eradiquer l'espèce dès le départ est l'option la moins coûteuse, alors que le contrôle des populations sur le long terme peut être très cher (Olson, 2006).
- Eradiquer une E.E.E. qui est bien implantée peut avoir des conséquences écologiques inattendues, comme une croissance soudaine des populations d'une autre espèce exotique qui ne posait pas de problème jusque-là (Caut *et al.*, 2009). Cela est dû aux interactions biologiques qui se sont établies avec l'implantation de l'E.E.E., et qui vont être à nouveau perturbées par les mesures d'éradication (Caut *et al.*, 2009; Simberloff *et al.*, 2013).

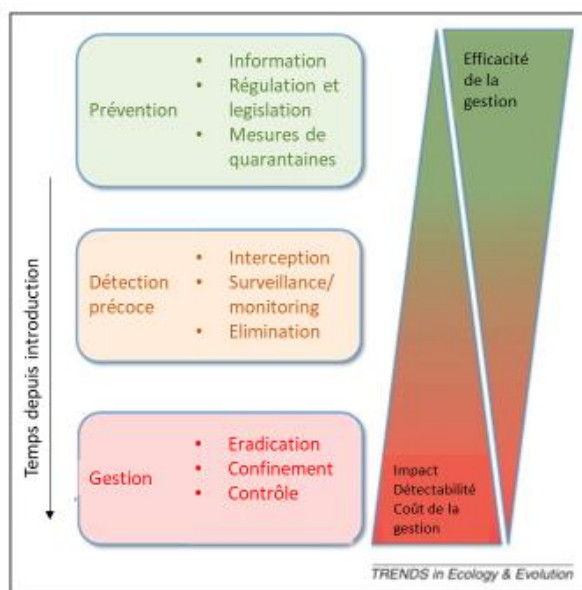


Figure 2 : actions à effectuer pour gérer la présence d'une E.E.E., selon le temps depuis son introduction (Simberloff *et al.*, 2013).

1.2.3. Impact sanitaire

En perturbant les écosystèmes, les espèces invasives vont souvent perturber les écoservices (services fournis à l'être humain par les écosystèmes). Cela nuit aux bien-être et à la santé humaine. Pyšek et Richardson (2010) liste huit catégories d'impact sanitaires (au sens large) des E.E.E. : (1) propagation de maladie humaines, (2) propagation de maladies des animaux

domestiques, (3) blessures, (4) allergies, (5) empoisonnement de la nourriture par des toxines, (6) contamination de l'eau et du sol, (7) nuisance pour le tourisme, (8) nuisance pour l'esthétique des paysages (Pyšek and Richardson, 2010).

Donnons-en quelques exemples. Au niveau de la propagation de maladies, les moustiques du genre *Aedes* sont un exemple célèbre. Ces moustiques souvent originaires d'Asie ou d'Afrique peuvent être vecteurs de maladies (dengue, encéphalite japonaise, Chikungunya virus,...) et potentiellement les importer en zones envahies (Schaffner *et al.*, 2013). Par exemple, une épidémie de Chikungunya virus a eu lieu en Italie en 2007, et il a été montré que cette maladie était transmise principalement par *Aedes albopictus*, endémique en Inde mais très invasif en Italie (Angelini *et al.*, 2008). Le genre *Aedes* et les maladies qu'il peut véhiculer continuent d'être surveillé (Leta *et al.*, 2018).

Pour les blessures, on peut penser au frelon asiatique *Vespa velutina* qui cause des piqures. Il n'est pas spécialement plus dangereux ou plus agressif que les frelons natifs (de Haro *et al.*, 2010) mais son implantation aisée dans les zones urbanisées en fait un réel problème de santé publique dans les zones envahies densément peuplées comme en Corée (Choi *et al.*, 2012).

En milieu marin, il peut aussi y avoir des conséquences sanitaires à la prolifération d'espèces invasives dans des zones de baignades. Par exemple, les méduses (scyphozoaires, hydrozoaires et cténophores) sont de manière générale bien adaptées à l'invasion biologique (Bayha and Graham, 2014) et les blooms de méduses peuvent avoir des conséquences sanitaires, variables selon la toxicité des cnidaires présents (Mariottini and Pane, 2010). Ainsi, en Méditerranée l'impact sanitaire est limité et les conséquences des blooms de méduses sont surtout économiques (impact sur le tourisme et la pêche) (Mariottini and Pane, 2010).

1.3. Caractéristiques des espèces exotiques envahissantes

Depuis la prise de conscience du problème des invasives, il s'est posé la question de savoir quelles étaient les facteurs qui favorisaient une invasion biologique (Kolar and Lodge, 2001). Nous évoquerons les trois plus importants : la pression de propagules, les caractéristiques démographiques de l'espèce et les caractéristiques du milieu.

La pression de propagule peut être considérée comme le nombre de possibilités d'introduction de l'espèce dans un nouveau milieu. La pression de propagule prend en compte le nombre

d'événements d'introduction (une espèce qui est transportée régulièrement risque plus de devenir invasive qu'une espèce qui n'a été transportée qu'une seule fois), et le nombre d'individus introduits lors de ces événements. Plus la pression de propagule est forte, plus l'espèce risque de devenir invasive (Kolar and Lodge, 2001). Cette pression de propagule est influencée par l'activité humaine et par des caractéristiques du cycle de vie de l'espèce. Les espèces qui donnent beaucoup de descendants peuvent exercer une pression de propagule plus forte puisque cela augmente le nombre d'individus qui peuvent être introduits. Elle dépend aussi de la taille efficace de la population d'origine, une plus grande population pouvant générer plus de descendants.

En plus de cela, un haut taux de croissance de la population, c'est-à-dire une croissance et une reproduction rapide des individus, minimise le risque d'extinction et augmente donc la probabilité de succès de l'invasion (Leigh, 1981; Ruesink *et al.*, 1995). Les espèces favorisées pour l'invasion biologique sont donc souvent des espèces à stratégie r, avec une grande fécondité et croissance de la population, mais une faible survie des jeunes et courte durée de vie (Lodge, 1993; Malacrida *et al.*, 2006).

Enfin, les caractéristiques des milieux dans lesquels l'espèce évolue ont aussi leur importance pour le potentiel invasif. Le milieu donneur est un facteur important (Kolar and Lodge, 2001). Ainsi, les espèces provenant de zones étendues possédant une grande biodiversité ont plus de chances de devenir invasives. Cela pourrait être dû aux adaptations que cela engendre de devoir survivre en étant en interaction avec beaucoup d'autres espèces. Par exemple, de nombreuses espèces aquatiques invasives proviennent de la région Ponto-Caspienne qui possède une biodiversité élevée (Leuven *et al.*, 2009). Le milieu receveur a aussi son importance : une E.E.E. aura plus de mal à s'implanter si il y a beaucoup d'espèces présentes, qui occupent un maximum des niches écologiques disponibles (Lodge, 1993).

1.4. Les espèces exotiques envahissantes en milieu dulcicole

Les milieux aquatiques sont particulièrement touchés par la problématique des invasives. En effet, le transport de marchandises par bateau est mondialisé, ce qui laisse de nombreuses opportunités aux organismes d'être transportés sur de longues distances, notamment grâce aux eaux de ballastes (Cariton and Geller, 1993). En outre, de nombreuses interventions humaines ont permis la connexion de milieux naturellement séparés et donc la mise en contact de

communautés différentes. Cela a évidemment contribué à la propagation d'espèces invasives (Lodge, 1993). On peut penser au canal de Suez ou du Panama pour les milieux marins, ou à tous les réseaux de canaux (milieux artificiels) utilisés pour connecter les grands fleuves en eau douce. Les modifications apportées par l'homme sur les fleuves et la dégradation des écosystèmes qui en découle jouent également un rôle (Leuven *et al.*, 2009).

Les études sur l'effet des espèces invasives sur les écosystèmes sont nombreuses, mais portent souvent sur peu d'espèces à la fois (Gallardo *et al.*, 2016). L'impact peut être lié à des interactions biotiques directes, comme de la prédation : l'introduction d'un prédateur invasif peut diminuer la population de ses proies et impacter ainsi toute la chaîne trophique (Gallardo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Par exemple, un organisme filtreur (la moule zébrée *Dreissena polymorpha*) peut diminuer la quantité de phytoplancton présent et par là impacter toute la chaîne alimentaire, modifiant par exemple la composition des macro invertébrés présents dans le milieu (Ward and Ricciardi, 2007).

Les espèces invasives peuvent également perturber les écosystèmes en modifiant les habitats (Gallardo *et al.*, 2016). On pense par exemple aux macrophytes qui, selon leur densité, peuvent énormément impacter l'habitat des poissons (Crooks, 2002). Dans l'exemple de la moule zébrée, les coquilles peuvent servir de nouvel habitat à des macro-invertébrés (Ward and Ricciardi, 2007).

Les bivalves invasifs peuvent modifier radicalement leurs milieux d'accueil (on parle d'ailleurs d'« ecosystem engineer »), principalement par deux moyens :

- L'activité de filtration qui diminue le phytoplancton et éclairci l'eau. Cela augmente la quantité et l'aire de répartition des macrophytes puisque la lumière peut aller plus loin dans l'eau (Zhu *et al.*, 2006).
- Les excréments des bivalves sont rejetés sur le fond de la rivière, donc augmentent la quantité de ressources disponibles pour les organismes benthiques (Sousa *et al.*, 2014).

La conséquence finale est l'augmentation en abondance et en diversité des macrophytes, algues et organismes benthiques, au détriment des organismes du milieu pélagique. On peut parler de « benthification » (Zhu *et al.*, 2006).

2. Ecologie du genre *Corbicula*

Parmi les espèces invasives aquatiques, nous allons nous pencher plus en détail sur le genre *Corbicula*. Il s'agit d'un genre de mollusque de la classe des Bivalves, de la famille des *Corbiculidae* (Giribet and Wheeler, 2002). La zone d'origine du genre *Corbicula* est située en Asie et en Afrique (Araujo *et al.*, 1993) mais les lignées invasives se sont répandues sur tous les autres continents. Leur présence a été notée en Amérique du Nord pour la première fois en 1938 (Burch, 1944), en 1980 en Amérique du Sud (Ituarte, 1981) et en Europe (Mouthon, 1981). Plus récemment (2018), elles sont observée en Russie près du cercle polaire arctique (Bespalaya *et al.*, 2018). Actuellement, il est difficile de dire combien d'espèces sont présentes au sein de ce genre car la délimitation d'espèce est difficile chez *Corbicula*, pour des raisons liées au mode de reproduction dont nous discuterons plus loin. Les corbicules sont des espèces d'eau douce, à l'exception de *C. japonica* vivant en eau saumâtres, dans des estuaires par exemple.

Le potentiel invasif de *Corbicula* est explicable en grande partie par son mode de vie (McMahon, 2002). *C. fluminea*, très répandu dans les régions envahies, est un exemple-type d'espèce à sélection r, présentant comme caractéristiques un temps de génération rapide, un taux de croissance et de reproduction élevé, mais une faible survie des gamètes et des larves (tableau 1) (Sousa *et al.*, 2008). En revanche, ses capacités d'acclimatation sont relativement faibles comparée aux espèces indigènes américaines (McMahon, 2002). Une des particularités des lignées invasives du genre *Corbicula* est la reproduction par androgénèse.

Tableau 1 : caractéristiques principales (pour la dynamique de la population) de *Corbicula fluminea*. Tiré de Sousa *et al* (2008)

Durée de vie	1-5 ans
Age de la maturité sexuelle	3-9 mois
Taux de croissance	Rapide
Fécondité (nombres de larves viables produites)	68 678
Survie des larves	Basse
Survie des adultes	Basse
Nombre de reproduction	Généralement 2 (variable)

3. L'androgenèse

3.1. Définition

L'androgenèse peut être définie, de manière générale, comme une forme de reproduction dans laquelle seul le génome paternel est transmis à la descendance (Schwander and Oldroyd, 2016). Cela peut se faire de plusieurs façons, les types principaux étant l'expulsion du génome nucléaire femelle hors de l'œuf déclenchée par la fécondation (Rieger *et al.*, 2012) ou la fécondation d'un œuf ne contenant pas de matériel génétique nucléaire (anucléé) (Schwander and Oldroyd, 2016).

L'androgenèse est un mode de reproduction assez rare, qui n'est confirmé que chez quelques groupes (Schwander and Oldroyd, 2016). Dans le monde animal, ce mode de reproduction est fort répandu au sein du genre *Corbicula* (Komaru *et al.*, 1998), mais aussi certaines fourmis comme la fourmi de feu *Wasmannia auropunctata*, qui est originaire des forêts tropicales mais est invasive en Amérique du Nord, Afrique de l'ouest et Polynésie. Cet insecte eusocial n'utilise l'androgenèse que pour produire les mâles, alors que les femelles sont des clones de la reine et les ouvrières le résultat d'une reproduction sexuée classique (Fournier *et al.*, 2005). Toujours chez les insectes, certains phasmes du genre *Bacillus* peuvent aussi se reproduire par androgenèse. C'est uniquement le cas des hybrides *Bacillus rossi*–*grandii benazzii* et *B. rossi*–*grandii grandii*. Contrairement à la fourmi de feu et au genre *Corbicula*, ces phasmes sont originaires du bassin méditerranéen et plutôt rares (Tinti and Scali, 1992).

Chez les végétaux, l'androgenèse est très rare également (Schwander and Oldroyd, 2016). L'exemple le plus fameux est le conifère *Cupressus dupreziana*, un arbre rare de la région du Sahara, chez qui le pollen est diploïde et l'ovule non-nucléé (Pichot *et al.*, 2000).

3.2. Avantages et inconvénients de l'androgenèse

La rareté de l'androgenèse peut être expliquée au niveau évolutif. En effet, une approche par modélisation (McKone and Halpern, 2003) a montré que la propagation d'un allèle causant l'androgenèse était rapide et aboutissait souvent à la fixation de l'allèle, à condition qu'il n'ait pas d'impact sur le fitness des femelles ou que cela soit compensé par une augmentation du

fitness des mâles. Cependant, la fixation de cet allèle peut causer à terme la perte des femelles et de la production d'ovules dans la population, aboutissant à l'extinction de celle-ci (McKone and Halpern, 2003). Ce problème peut être résolu si les individus sont hermaphrodites, car la fixation de l'androgénèse n'empêche plus la formation d'ovules (McKone and Halpern, 2003) tel que constaté chez le genre *Corbicula* (Pigneur *et al.*, 2012).

Une autre manière d'expliquer sa faible occurrence est de considérer l'androgénèse comme un cas de parasitisme sexuel, dans lequel le parasite est le mâle, et l'hôte la femelle. Le fitness d'une femelle parasitée tombant à 0, on comprend que la propagation du parasite induit au bout de quelques générations l'absence d'hôtes et donc un déclin du parasite (Lehtonen *et al.*, 2013).

Une autre contrainte sur l'androgénèse est la ploïdie des individus. Si le spermatozoïde est haploïde, l'individu qui en résultera après fécondation sera haploïde et souvent non viable. Il faut donc que l'espèce puisse survivre en possédant (au moins) certains individus haploïdes. Cela se passe chez les insectes sociaux androgénétiques (Schwander and Oldroyd, 2016). L'autre solution est l'apparition d'un mécanisme permettant la formation par androgénèse d'individus de ploïdie supérieure à 1. Cela peut être la formation de spermatozoïdes non-réduit, tel que chez *Corbicula* (Komaru *et al.*, 1997) ou la fécondation de l'ovule par deux spermatozoïdes (figure 3) tel que cela est soupçonné chez *Bacillus* (Schwander and Oldroyd, 2016).

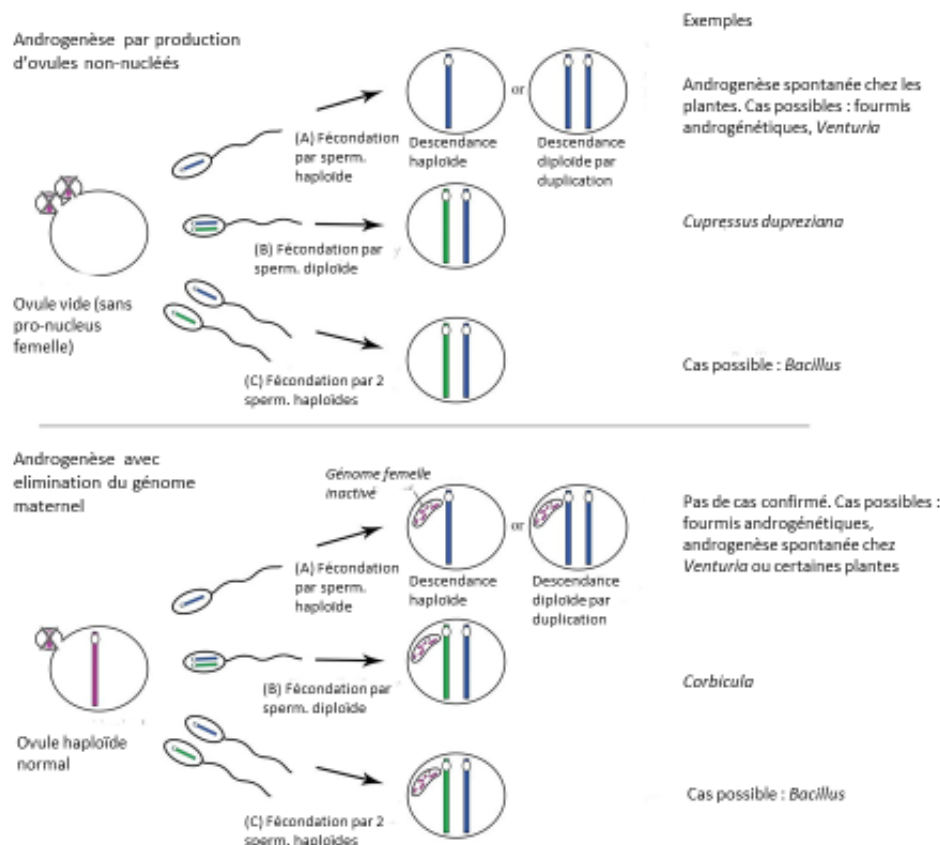


Figure 3 : différentes possibilités pour la fécondation dans une reproduction par androgenèse. Au-dessus, androgenèse avec fécondation d'un ovule sans matériel génétique, en dessous androgenèse avec expulsion du génome maternel. D'après Schwander et Oldroyd, 2016.

En revanche, l'androgenèse telle qu'elle est réalisée chez *Corbicula* pourrait être un avantage pour l'invasion biologique (Pigneur *et al.*, 2011a). En effet, ce mode de reproduction peut être considéré comme asexué dans la mesure où la descendance est un clone du père (Pigneur *et al.*, 2012). Si les individus sont capables de s'autoféconder, comme c'est le cas chez *Corbicula*, un seul individu hermaphrodite peut donc fonder une population (Pigneur *et al.*, 2011a). De plus, l'asexualité est avantageuse chez les invasives, car elle permet d'éviter la dépression de consanguinité qui arrive facilement chez de petites populations ayant subi un bottleneck (perte de diversité génétique due au fait que seule une petite partie de la population d'origine est représentée) (Frankham, 2004). Il n'est donc pas étonnant de constater que toutes les lignées invasives chez *Corbicula* soient uniquement androgénétiques (Pigneur *et al.*, 2011a).

3.3. L'androgénèse chez *Corbicula*

Une particularité des corbicules androgénétiques est la présence d'hermaphrodites, capables de produire des gamètes mâles et femelles. Dans les lignées invasives, on ne décrit que des hermaphrodites (Pigneur *et al.*, 2012). Ce n'est cependant pas généralisable à toutes les populations : dans une population de *C. leana* japonaise, la proportion décrite était de 21,8% d'hermaphrodites pour 71,8% de mâles (population androdioïque, Houki *et al.*, 2011). Comme nous l'avons vu, la présence d'hermaphrodites est un facteur important pour la maintenance de l'androgénèse chez *Corbicula* (Pigneur *et al.*, 2012).

Les spermatozoïdes des lignées androgénétiques chez *Corbicula* sont non-réduits, c'est-à-dire qu'ils ont la même ploïdie que les cellules somatiques des individus qui les ont produits. Au contraire, les spermatozoïdes de lignées à priori sexuées semblent réduits, car ils contiennent la moitié de l'ADN des cellules somatiques (Komaru *et al.*, 1997). La présence de spermatozoïdes non-réduits est considérée comme un bon indicateur d'une reproduction par androgénèse chez *Corbicula* (Ishibashi *et al.*, 2003).

De plus, les spermatozoïdes des lignées androgénétiques sont biflagellés, contrairement à ceux des lignées sexuées qui sont uniflagellés (Pigneur *et al.*, 2012). Le mécanisme de formation de ces spermatozoïdes est encore mal connu chez *Corbicula*. Il pourrait s'agir :

- D'une réplication de l'ADN supplémentaire avant la méiose, phénomène appelé endoréplication (Komma and Endow, 1995; Pigneur *et al.*, 2012).
- De la fusion de deux spermatozoïdes (McKone and Halpern, 2003). Cela pourrait expliquer la présence de deux flagelles chez les lignées androgénétiques (Pigneur *et al.*, 2012).
- D'une méiose incomplète, sans cytokinèse (Komaru *et al.*, 1997). Cela peut arriver en méiose 1 ou en méiose 2.

Une étude récente au sein de notre équipe, par Emilie Etoundi, a démontré que c'est une méiose incomplète chez *Corbicula* pour former des spermatozoïdes non-réduits (Martin Vastrade, pers. comm).

Chez *Corbicula*, l'androgénèse se fait par une expulsion du matériel génétique de la femelle lors de la fécondation (Komaru *et al.*, 1998). L'ensemble du mécanisme est le suivant (les numéros font référence à ceux de la figure 4 (Pigneur *et al.*, 2012)) :

1. L'ovule est bloqué en métaphase de méiose I, le fuseau méiotique parallèle à la membrane plasmique. C'est une différence majeure avec une méiose classique, dans laquelle le fuseau méiotique est perpendiculaire à la membrane. Quand un spermatozoïde non-réduit féconde l'ovule, le génome mâle rentre dans l'œuf sous forme de pronucléus ;
2. Une fois l'ovule fécondé, la méiose reprend. L'anaphase se déroule toujours avec le fuseau méiotique parallèle à la membrane ;
3. Le cytoplasme se déforme autour des centrosomes, les deux moitiés de génome femelles sont condensées sous forme de corps polaires, contrairement à la méiose classique dans laquelle un seul corps polaire est formé ;
4. Expulsion des deux corps polaires et de tout le matériel génétique de l'ovule ;
5. L'œuf ne contient plus que le génome nucléaire mâle combiné aux mitochondries de l'œuf fécondé. Il rentre en mitose et commence l'embryogénèse (Komaru *et al.*, 1998).

L'étude de Komaru (1998) porte sur *C. leana*, mais cela a été confirmé aussi chez *C. fluminea* (Ishibashi *et al.*, 2003).

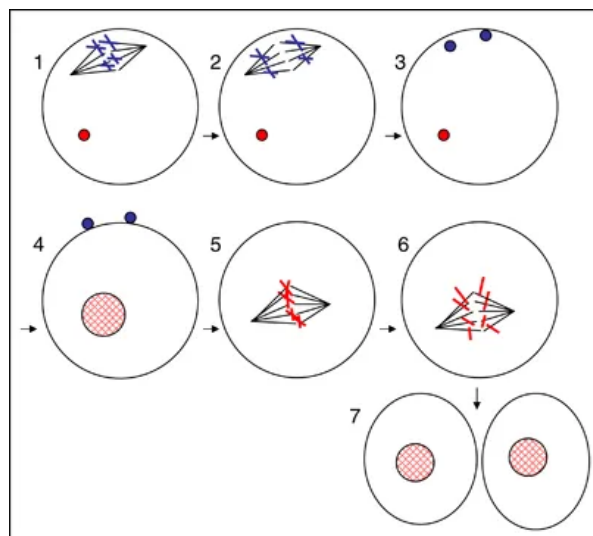


Figure 4 : mécanisme de la reproduction par androgenèse chez *Corbicula*. Rouge : génome mâle, bleu : génome femelle. Les étapes 1 à 4 montrent l'éjection du génome femelle après la fécondation et son remplacement par le génome mâle. Les étapes 5 à 7 représentent la première mitose. Image de Pigneur *et al.*, 2012.

3.4. Parasitisme de l'œuf chez *Corbicula*

Lorsque l'on réalise des phylogénies chez *Corbicula*, il n'est pas rare d'observer des mismatches cytonucléaires, c'est-à-dire que la phylogénie reconstituée grâce aux marqueurs

mitochondriaux ne correspond pas à celle reconstituée à partir de marqueurs nucléaires (Hedtke *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2005). Ce phénomène est directement lié à l'androgénèse. Au cours de la fécondation, le génome nucléaire de la femelle est expulsé, mais les mitochondries restent. L'histoire évolutive décrite par les marqueurs mitochondriaux est donc différente de celle décrite par les marqueurs nucléaires dans le cas de l'androgénèse et de parasitisme d'œuf entre espèces. Cela implique qu'on ne peut pas se contenter d'une phylogénie basée sur des marqueurs mitochondriaux pour établir des liens génétiques entre individus chez *Corbicula* (Pigneur *et al.*, 2011a).

Ce phénomène est observé entre des lignées (espèces) différentes de *Corbicula* et on parle de « parasitisme de l'œuf » (figure 5). Cela permet d'expliquer des situations où un haplotype mitochondrial d'une lignée est trouvé chez des individus appartenant morphologiquement à l'autre lignée (Hedtke *et al.*, 2008).

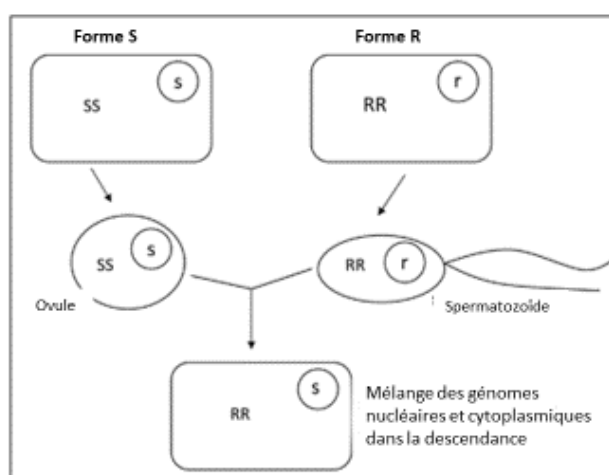


Figure 5 : représentation schématique du parasitisme d'un œuf de la lignée S par un spermatozoïde de la lignée R. Cela entraîne la capture du génome mitochondrial de la lignée S. Image de Pigneur *et al* (2012).

3.5. Formation d'hybrides chez *Corbicula*

Une particularité des lignées androgénétiques de *Corbicula* que nous n'avons pas encore abordée est leur polyploïdie fréquente : on trouve ainsi fréquemment des individus tri ou tétraploïdes (Qiu *et al.*, 2001). A l'opposé, *C. sandai* et *C. japonica* (sexués) sont diploïdes (Okamoto, 1986).

Cette particularité permet de proposer une hypothèse pour la formation d'hybride chez *Corbicula*, par un mécanisme de capture de gènes. Comme nous l'avons vu dans le point 3.3., lors de l'androgénèse, le génome de la femelle est éjecté sous forme de deux corps polaires car le fuseau méiotique reste parallèle à la membrane plasmique (Komaru *et al.*, 1998). Si le fuseau méiotique se place perpendiculairement à la membrane (comme dans une méiose classique) mais que l'ovule se fait féconder par un spermatozoïde non réduit, alors une copie du génome femelle reste dans l'œuf (Komaru *et al.*, 2006).

Dès lors, deux cas de figures sont possibles :

- L'ovule et le spermatozoïde proviennent de la même lignée, voire du même parent (autofécondation d'un individu hermaphrodite) : on observera alors une augmentation de la ploïdie de l'individu par rapport aux parents, mais les allèles qu'il portera restent ceux de sa lignée.
- L'ovule et le spermatozoïde proviennent de lignées différentes : alors la rétention d'une copie de génome maternel équivaut à une hybridation entre les deux lignées, avec ici aussi une augmentation de ploïdie (Hedtke *et al.*, 2011; Komaru *et al.*, 2006).

Ceci est différent d'une simple capture de génome mitochondrial (figure 6). L'hybridation devrait notamment induire des changements morphologiques qui ne sont pas observables dans le cas de mismatches cytonucléaires sans rétention (Bespalaya *et al.*, 2018; Hedtke *et al.*, 2011).

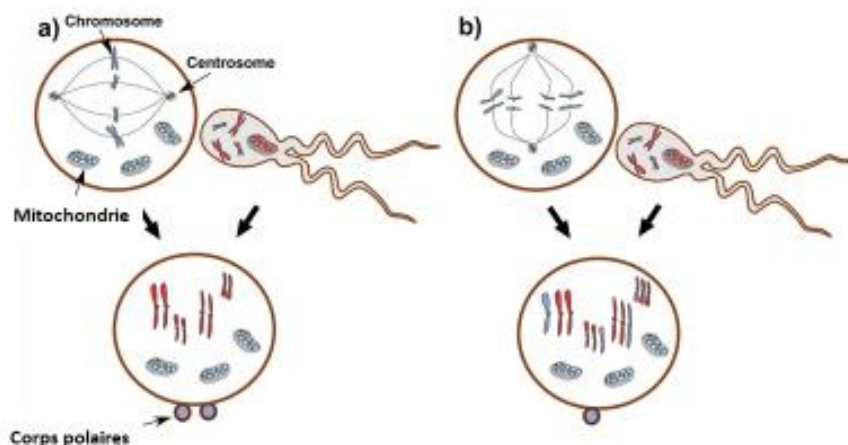


Figure 6 : a) parasitisme d'un œuf d'une lignée par une autre (androgénétique), provoquant un mismatch cytonucléaire. b) même situation mais avec rétention d'une copie du génome maternel, aboutissant à la formation d'un embryon hybride. Image de Etoundi *et al.*, 2019.

Cette formation d'hybrides n'est pas considérée comme fréquente entre les lignées androgénétiques, car quand les différentes lignées vivent en sympatrie, on continue à pouvoir les distinguer d'un point de vue génétique (Hedtke *et al.*, 2008, 2011).

Toutefois, des hybrides ont été trouvés dans la nature. Par exemple, lors d'une étude sur l'invasion de *Corbicula* dans la péninsule ibérique, des individus porteurs d'allèles venant de différentes lignées ont été découverts (Peñarrubia *et al.*, 2017). De même, dans une population russe, des individus hétérozygotes portent des allèles provenant de deux lignées différentes (présumément de forme A/R et C/S, voir point 4 pour une description des différentes lignées) pour le marqueur 28S. Ces hybrides ne se distinguent pas morphologiquement (Bespalaya *et al.*, 2018). Dans une étude en Europe, Etoundi (2011) a retrouvé dans la Seine trois individus de morphotype intermédiaire portant des allèles nucléaires (microsatellites) associés à la forme A/R et à la forme C/S.

Ces découvertes posent des questions, à la fois sur les mécanismes de formation des hybrides et sur l'impact de l'hybridation sur l'évolution des populations et lignées de *Corbicula*. Au niveau évolutif, il est probable que les captures de gènes permettent la persistance sur un plus long terme des lignées asexuées en augmentant la diversité de ces lignées (Hedtke *et al.*, 2011).

4. Diversité du genre *Corbicula*

Malgré la difficulté de délimitation d'espèces chez *Corbicula*, il existe des espèces bien définies surtout sur base de caractéristiques morphologiques. *C. japonica* est la seule espèce d'eau saumâtre, et semble phylogénétiquement être le groupe-frère de toutes les autres corbicules. (Pigneur *et al.*, 2011a).

Certaines espèces de *Corbicula* sont assez rares, comme *C. sandai*. Cette espèce est endémique du lac Biwa, au Japon. Elle est intéressante car elle est parfois décrite comme groupe-frère des lignées invasives (Haponski and Foighil, 2019) et parfois comme faisant partie du clade des invasives (Lee *et al.*, 2005). Tout comme *C. japonica*, *C. sandai* est dioïque et se reproduit par reproduction sexuée (Komaru *et al.*, 2013).

D'autres espèces *Corbicula* sont nettement plus répandues. Par exemple, *C. leana* et *C. fluminea* sont bien décrites comme invasives. Au Japon, *C. leana* est considérée comme locale et *C. fluminea* comme invasive (Komaru *et al.*, 2013; Masuda and Uchiyama, 1984). *C.*

fluminea a d'ailleurs souvent été citée comme l'espèce invasive de *Corbicula* (Araujo *et al.*, 1993; Britton and Morton, 1986). Ces deux espèces se reproduisent par androgenèse et sont composée au moins en partie d'individus hermaphrodites (Houki *et al.*, 2011). La séparation entre les deux espèces est floue, malgré des morphotype de coquille différents (Komaru *et al.*, 2013)

Chez les corbicules invasives, le problème de délimitation d'espèce est aussi très présent à cause de l'androgenèse et les hybridations entre espèces, c'est pourquoi on préfère parler en termes de formes et de lignées, qui ont été décrites différemment en Amérique et en Europe. En Amérique du Nord, on a d'abord distingué des morphotypes A, présent sur tout le continent, et B, présent au sud-ouest (Britton and Morton, 1986; Lee *et al.*, 2005). Un troisième morphotype C a ensuite été découvert en Amérique du Sud (Ituarte, 1994; Lee *et al.*, 2005). Plus récemment, une forme D a été identifiée dans l'Illinois (Tiemann *et al.*, 2017). Les quatre formes américaines, ainsi que *C. japonica* et *C. sandai*, sont illustrées en figure 7.

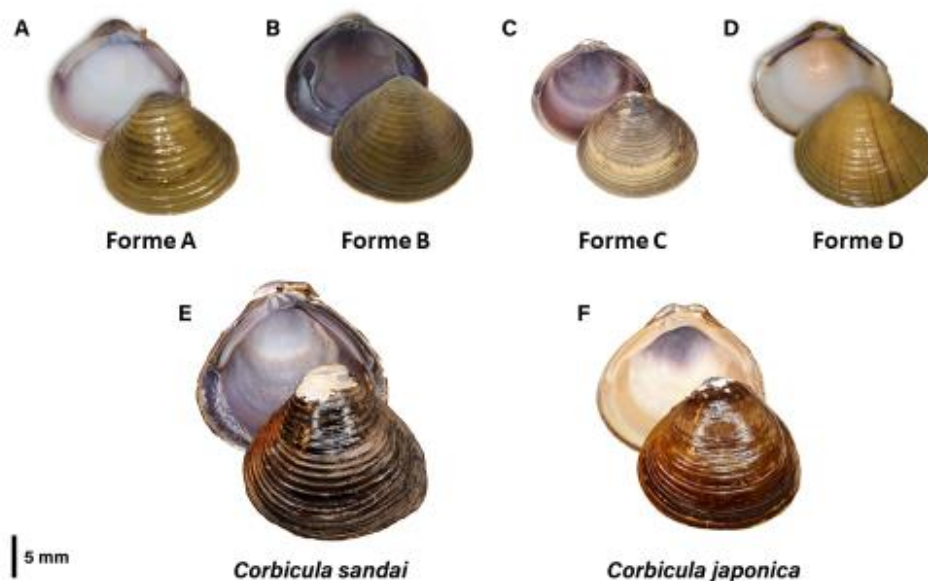


Figure 7 : photographies des coquilles des 4 formes américaines identifiées à ce jour, ainsi que des espèces sexuées et a priori non-invasives *C. sandai* et *C. leana*. Image tirée de Haponski et Foighil (2019). Photos de M. Jared Thomas et Danielle Ruffatto pour les formes A, B, D et de Taehwan Lee pour les autres.

En Europe, les principales formes décrites sont R (Round) et S (Saddle) (Pfenninger *et al.*, 2002). Il y a une troisième forme, la forme Rlc, qui est minoritaire (Marescaux *et al.*, 2010; Mouthon, 2000). Les trois formes européennes sont représentées en figure 8.



Figure 8 : coquille des trois formes européennes de *Corbicula*. I : forme R, II : forme Rlc, III : forme S (Marescaux et al , 2010)

Un mémoire précédent (Etoundi, 2011) a montré qu'on pouvait distinguer les lignées R et S sur base de critères morphologiques (ratios hauteur / longueur, hauteur / épaisseur, largeur / épaisseur, nombre de stries / hauteur). Il est par contre plus difficile de voir une différence entre la forme R et Rlc (figure 9).

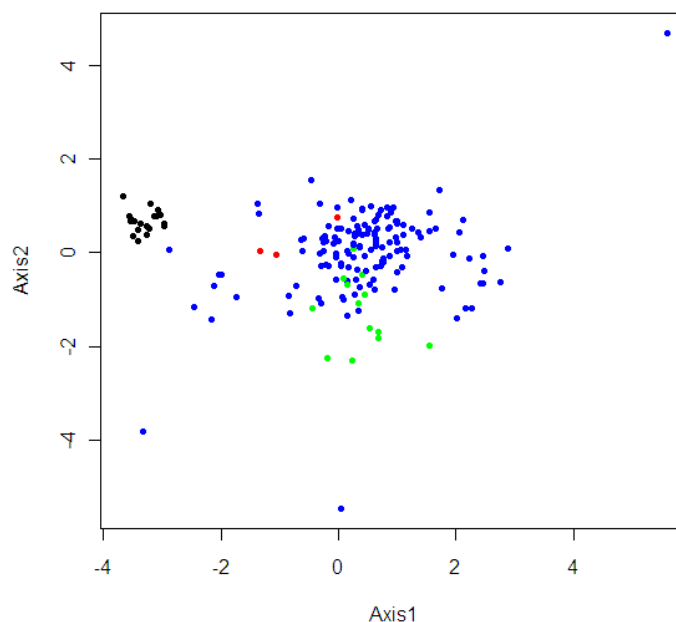


Figure 9 : Résultat d'un ACP basé sur les ratios morphologiques (H/L , H/E , L/E , S/H). Noir = forme S, Bleu = forme R, vert = forme Rlc, Rouge = forme indéterminée (Image de Etoundi, 2011).

Des études génétiques utilisant quelques marqueurs moléculaires et des analyses phylogénétiques ont démontré que la lignée A américaine est identique à la lignée R européenne, car elles partagent le même génotype nucléaire pour les gènes cytochrome B, la sous-unité alpha de l'adénosine triphosphate synthase (ATPS) et alpha-amylase (amy) et mitochondrial pour le gène du cytochrome oxydase I (COI) (Hedtke *et al.*, 2011; Pigneur *et al.*, 2011a). De même pour C et S, bien que leurs morphologies soient plus différentes (Hedtke and Hillis, 2011), mais cela pourrait être dû à de la plasticité phénotypique. Par contre, l'éventuelle correspondance entre les lignées Rlc et B n'est pas établie. Leurs haplotypes COI sont très proches (une mutation d'écart), et elles peuvent être groupées en une espèce dans une phylogénie se basant sur ce marqueur (Pigneur *et al.*, 2011a). Par contre, les génomes nucléaires sont clairement distincts pour le gène amy et des marqueurs microsatellites (Pigneur *et al.*, 2011b, 2011a).

Chez *Corbicula*, la morphologie ne suffit donc pas à distinguer les espèces, c'est pourquoi les outils moléculaires sont essentiels. Néanmoins, la reproduction par androgenèse qui crée des mismatches cytonucléaires et des hybrides et rend cette délimitation d'espèces très complexe.

5. Lien entre lignées et populations chez *Corbicula*

5.1. Origine de l'androgenèse chez *Corbicula*

Une question intéressante et encore mal résolue concernant l'androgenèse chez *Corbicula* est celle de son origine. Le lien entre les lignées sexuées et androgénétiques reste cependant assez mal compris. Hedtke *et al* (2008) suggèrent une origine multiple de l'androgenèse, sur base d'une phylogénie en inférence bayésienne qui suggère trois ou quatre clades androgénétiques distincts. Cependant, cette analyse n'a été faite que sur des marqueurs mitochondriaux (Hedtke *et al.*, 2008).

Une situation d'androdioécie (coexistence de mâle et d'hermaphrodites) a été trouvée au sein d'une population androgénétique de *C. leana* (Houki *et al.*, 2011). Cependant, ce ne sont pas ces mâles qui auraient donné les hermaphrodites mais probablement l'inverse. En effet, les mâles et hermaphrodites partagent deux haplotypes COI qui sont radicalement différents de ceux d'espèces sexuées (*C. sandai* et *C. japonica*) (Houki *et al.*, 2011).

L'origine de l'androgénèse reste à ce jour méconnue. Comme toutes les lignées invasives sont androgénétiques, cette question est fortement liée à la suivante, qui est celle de l'origine des lignées invasives.

5.2. Origine des lignées invasives

Il a été proposé que l'espèce qui a donné naissance aux lignées invasive est *C. fluminea* (Araujo *et al.*, 1993; Britton and Morton, 1986). Cependant, la compréhension des mécanismes de l'androgénèse et notamment les possibilités de mismatches cytonucléaires et d'hybridation remet en question les phylogénies classiques, qui sont souvent établies grâce au seul marqueur mitochondrial COI. De telles phylogénies ne sont pas suffisantes chez *Corbicula* pour comprendre les relations phylogénétiques et l'origine des lignées androgénétiques (Hedtke *et al.*, 2008).

Cela remet également en cause la délimitation d'espèces au sein du genre *Corbicula*. Une comparaison des haplotypes présents chez *C. fluminea* et *C. leana* pour COI (mitochondrial) et pour l'ARN 28S (nucléaire) montre qu'il n'y a pas de différence au niveau de l'ADN mitochondrial (les allèles les plus fréquents sont les mêmes des deux côtés). Par contre pour l'ARN 28S, on n'observe pas les mêmes haplotypes entre les deux espèces, mais les haplotypes différents sont suffisamment proches que pour envisager l'existence d'un ancêtre commun récent (Komaru *et al.*, 2013). Il est difficile de conclure si ces espèces partagent un ancêtre commun ou si du parasitisme d'œuf explique la présence d'haplotypes COI identiques.

Plutôt que de parler en termes d'espèces, on préfère donc parler en termes de populations et de lignées, et essayer de déterminer les liens entre populations d'origines géographiques distinctes. Une nouvelle étude de partage d'allèle montre que les lignées androgénétiques invasives auraient des origines différentes (Vastrade *et al.*, In Prep).

Premièrement, la lignée A/R invasive et abondante en Europe et en Amérique, se retrouvent regroupées (via le partage d'allèles nucléaires) avec les lignées invasives androgénétique B et Rlc et avec la majorité des populations androgénétiques non-invasives asiatiques, ainsi qu'avec des individus de l'espèce sexuée *C. sandai* du lac Biwa (Japon) (Vastrade *et al.*, In Prep). Par ailleurs, vu que plusieurs allèles invasifs sont présents dans les populations du lac Biwa et vu le partage d'allèles (pour l'ARN 28S) entre *C. leana* et *C. sandai*, ces résultats suggèrent que

le lac Biwa dans lequel se trouve l'espèce sexuée *C. sandai* soit un lieu d'origine de l'androgénèse et des lignées invasives (Komaru *et al.*, 2012, 2013; Vastrade *et al.*, In Prep).

Deuxièmement, la lignée invasive C/S se retrouve regroupée dans un autre clade avec *C. fluminalis africana* dans une phylogénie basée sur le marqueur COI (Pigneur *et al.*, 2014) mais surtout dans cette étude plus récente basée sur le partage d'allèles nucléaires (Vastrade *et al.*, In Prep).

Troisièmement, un autre clade reprend des lignées androgénétiques non-invasives d'Asie du Sud-Ouest (Vastrade *et al.*, In Prep). Un haploweb issu de cette étude est disponible en annexe 2.

5.3. Liens entre lignées invasives

Concernant les liens entre lignées invasives, certains sont assez bien établis. Tout d'abord, comme dit précédemment, les lignées A et R sont identiques, ainsi que C et S (Hedtke and Hillis, 2011; Hedtke *et al.*, 2011; Pigneur *et al.*, 2011a).

Il semble que pour la forme A/R, l'invasion ait commencé en Amérique. En effet, les individus européens et américains partagent exactement le même génotype, nucléaire et mitochondrial, et donc il est probable qu'une des populations dérive de l'autre. Or, les corbicules ont d'abord été trouvés en Amérique et ne sont apparus en Europe que 40 ans plus tard (Pigneur *et al.*, 2014).

Un cheminement du même type est envisageable pour la forme C/S : originaire d'Afrique de l'Ouest, elle se serait répandue en Amérique du Sud avant de migrer vers l'Europe (Pigneur *et al.*, 2014). Les relations entretenues par les autres lignées sont plus controversées.

La forme D, découverte beaucoup plus récemment que les autres, semble bien distincte pour le gène de l'ARN 28S des formes A et B avec lesquelles elles vit en sympatrie dans l'Illinois (Tiemann *et al.*, 2017). Cependant, les allèles présents dans la lignée « D » pour ce marqueur 28S se retrouvent aussi dans des individus dans des endroits assez éloignés (des individus de forme B au Texas : Hedtke *et al.*, 2008 ; des individus de *C. leana/fluminea* au Japon : Komaru *et al.*, 2012). En revanche, elle porte le même ADN mitochondrial que la forme A/R, ce qui suggère un parasitisme d'œuf entre A/R et B qui pourrait être à l'origine de la forme D (Tiemann *et al.*, 2017).

Les lignées B et Rlc portent presque le même gène COI et ont donc probablement un ancêtre commun très récent du point de vue de l'ADN mitochondrial (Pigneur *et al.*, 2014). Par contre, ces lignées sont assez différentes au niveau nucléaire et peuvent facilement se distinguer par microsatellites (Pigneur *et al.*, 2011b). La forme B pourrait être un hybride de la lignée A et d'une autre lignée (Hedtke *et al.*, 2008).

6. Objectifs du mémoire

L'androgenèse, bien que souvent considérée comme délétère au niveau évolutif, pourrait faciliter l'invasion biologique chez *Corbicula*. D'une part, parce qu'elle permet l'autofécondation et facilite donc l'établissement d'une population clonale. D'autre part, parce qu'elle permet la formation d'hybrides. Il est donc intéressant de chercher à mieux comprendre la présence et la formation des hybrides, ce qui sera l'objectif de ce mémoire.

Pour cette étude de mémoire nous allons étudier la population *Corbicula* de la Waal (Pays-Bas). Une précédente collecte (2017) dans cette région avait trouvé des individus au phénotype douteux, intermédiaire entre forme A/R et C/S. Il est donc attendu de trouver des individus hybrides au sein de cette population. Les individus récoltés en 2020 dans ce mémoire seront caractérisés morphologiquement et génétiquement par différents marqueurs : COI, ATPS, alpha-amylase, 28S et microsatellites (Pigneur *et al.*, 2011b). Cela permettra, au sein des populations investiguées :

1. D'observer quelles sont les lignées de *Corbicula* présentes dans la Waal.
2. De vérifier la présence d'hybrides et/ou de mismatches cytonucléaires entre ces lignées.
3. De tester la possibilité de distinguer morphologiquement les hybrides et les différentes lignées. Pour cela une ACP sera réalisée sur les données morphologiques. Elle sera mise en relation avec les génotypes des individus et également intégrée à une étude précédente plus large (Etoundi, 2011).
4. En observant les patterns génétiques, de tester l'hypothèse du mécanisme de formation des hybrides. Dans l'hypothèse de la figure 9, on s'attend à avoir, chez un hybride triploïde et pour un marqueur génétique donné, un haplotype provenant d'une lignée et deux haplotypes (ou deux copies du même haplotype) provenant d'une autre lignée.

Matériel et méthode

1. Collecte des individus

Les individus *Corbicula* étudiés dans ce mémoire ont été récoltés dans la Waal, à proximité de Nijmegen (Pays-Bas). Les stations de récoltes sont résumées ci-dessous :

1. Plage A (récolte par Abraham bij de Vaate, contact local)
 - a. Position : borne 877 du cours d'eau
 - b. Substrat : inconnu
 - c. Récolte très abondante (plus de 100 individus *Corbicula*)
2. Plage B
 - a. Position : approximativement 51°51'59''N 5°53'03.6"E
 - b. Substrat : sable assez meuble + rochers
 - c. Récolte : 6 individus *Corbicula*
3. Plage C
 - a. Position : peu après la borne 879 du cours d'eau
 - b. Substrat : sable.
 - c. Récolte : La plupart des corbicules ont été trouvées échouées sur la plage (seules quelques-unes ont été récoltées dans l'eau). A peu près 50 individus *Corbicula*.
4. Plage D
 - a. Position : à proximité de la plage B, de l'autre côté d'une avancée de pierres
 - b. Substrat : sable + vase
 - c. Récolte : abondante (plus de 100 individus *Corbicula*)

Les corbicules récoltées sur des plages différentes ont été considérées comme des populations différentes. Les populations ont été nommées WaA, WaB, WaC, WaD en fonction de la plage (figure 10). La récolte s'est faite à l'aide d'un filet à mailles en fer de tailles variables. Le dessous du filet possède des mailles de 2 mm, le milieu 5 mm et le haut (moins utile pour la collecte) 1 cm. Il laisse donc la possibilité à certains individus de moins de 5 mm de partir par les mailles du milieu lors de l'agitation du filet. Le filet a été enfoncé dans le substrat pour récupérer les individus enfouis. Ensuite, il a été agité dans l'eau pour enlever le sable. Les

corbicules étaient dans les organismes récoltés. Exception à ce mode opératoire, la population WaC a été retrouvée majoritairement échouée sur la plage.

Le transport des individus s'est fait dans des Falcons remplis d'eau, sauf pour la population WaA qui a été transportée dans un bocal avec un peu d'herbe pour assurer l'humidité. Ensuite, ils ont été mis en culture dans des aquariums séparés pour chaque population. L'eau a été changée trois fois par semaine et la nourriture (algues *Chlorella*, *Chlamydomonas*) a été donnée *ad libitum* (se basant sur la couleur de l'eau).

En plus des populations récoltées dans le cadre de ce mémoire, nous avons utilisé des individus provenant de populations récoltées précédemment maintenues depuis en culture à l'UNamur (mêmes conditions). Il s'agit des populations :

- Wa : provenant d'une collecte antérieure (2018) dans la Waal. La position est indiquée sur la figure 10.
- Go : provenant d'une collecte de 2017 dans la Meuse, à Godinne (Belgique). Contrairement aux individus de la Waal qui ne présentent pas de morphotype évident, les individus de la population Go sont de lignée A/R (démonstré au niveau du phénotype et du génotype).

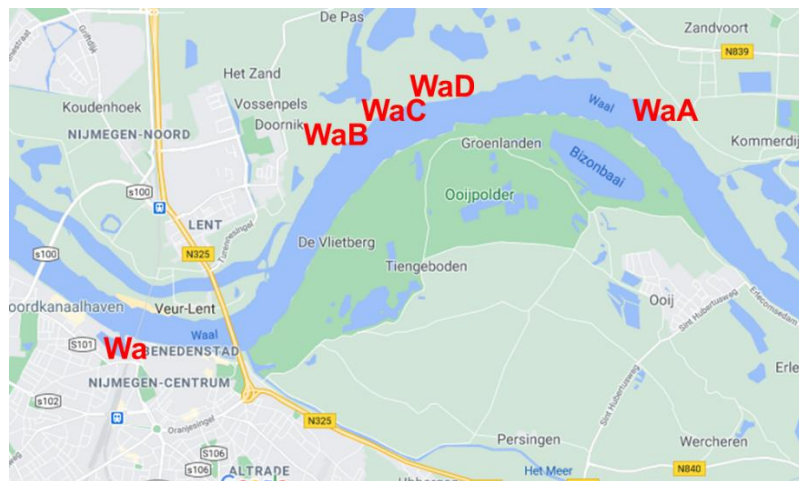


Figure 10 : Position approximative des populations Wa (collecte de 2017), WaA/B/C/D (collecte de 2020)

2. Dissection et prise de mesures morphologiques

2.1. Choix des individus

Dans un premier temps, nous avons sélectionné :

- 15 individus de WaA
- 6 individus de WaB
- 5 individus de WaC
- 10 individus de WaD
- 6 individus de Wa
- 5 individus de Go

Les nombres d'individus ont été choisis en fonction de la quantité d'individus disponibles par population et de l'état de santé des individus. Les individus de WaA ont montré un taux de mortalité durant le transport et l'acclimatation aux aquariums bien plus important, ils ont donc été disséqués prioritairement par crainte d'une extinction de la population. Par la suite, nous avons ajouté à cela cinq individus de WaD et cinq de WaC, de manière à augmenter le volume des données de ces populations. Les individus ont été choisis aléatoirement dans l'aquarium, ce qui a été facilité par le fait qu'il n'y avait pas, à vue d'œil, de différences morphologiques entre individus.

2.2. Mesure des paramètres morphologiques

Les mesures morphologiques ont été prises à l'aide d'un pied à coulisse tel que réalisé par Etoundi (2011). Elles se détaillent comme suit :

- Height (H) : Mesure (mm) de l'axe dorso-ventral
- Width (W) : Mesure (mm) de l'axe gauche-droite
- Length (L) : Mesure (mm) de l'axe antéro-postérieur
- Stries (S) : Nombre de stries sur 5 mm, comptée à partir du "sommet" visible côté charnière (arrondi au supérieur en cas de doute).

Ensuite, les individus ont été ouverts par insertion du scalpel dans le siphon. Les pieds ont été prélevés et conservés dans l'éthanol. Le reste du corps, y inclus les muscles adducteurs et la

masse viscérale, ont été conservés dans l'éthanol également en tant que « back up ». Chaque individu a été identifié individuellement par un code comprenant le nom de la population et le numéro individuel.

Le facteur « Colour » a été déterminé comme étant la couleur dominante à l'intérieur de la coquille. Nous avons utilisé « purple » et « yellow-white ». En effet, la différence entre les coquilles jaunes et les blanches était rarement flagrante. De plus, la différence n'est pas faite non plus dans la littérature (Marescaux *et al.*, 2010). La couleur externe n'a pas été documentée car variable chez *Corbicula* (Marescaux *et al.*, 2010).

Les coquilles ont été identifiées individuellement en annotant au marqueur sur la face interne de la coquille, et conservées.

2.3. Analyse des résultats

Les résultats des mesures morphologiques ont été analysés par une analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur le logiciel R (package ade4). Les différentes variables incluses dans l'ACP, calculées pour chaque individu, sont :

- Ratio L/H
- Ratio H/W
- Ratio H/L
- Ratio S/H

Ensuite, les individus ont été colorés selon leur population d'origine.

Cette analyse a été réalisée sur les données récoltées lors de ce mémoire, puis sur un jeu de données plus large en y ajoutant les données de Etoundi (2011). Pour cette deuxième analyse, le ratio S/H n'a pas été pris en compte.

3. Extraction d'ADN

L'ADN total des individus disséqués a été extrait en utilisant le matériel du kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue. Le protocole suivi est celui du kit Qiagen. Deux écarts au protocole ont eu lieu :

- L'étape de séchage des colonnes s'est faite cinq minutes à 16000 G, plutôt que trois minutes à 20000 G, en raison des capacités de la centrifugeuse utilisée.
- La digestion à la protéinase K s'est faite « overnight » à 300 rpm.

La vérification de la qualité et de la quantité de l'ADN extraite s'est faite au Nanodrop.

4. Marqueur mitochondrial COI

4.1. Amplification PCR et séquençage

La PCR du gène mitochondrial COI (cytochrome oxydase I) s'est faite sur tous les échantillons en utilisant la GoTaq polymérase de ProMega. Les conditions PCR sont disponibles en tableau 2.

Tableau 2: Conditions du mix PCR COI

Réactif	Volume par échantillon (µl)
Eau	15.14
ADN	1
dNTPs (2mM)	2.5
Go Taq Polymerase	0.10
Tampon	5
Amorce « forward » (20µM)	0.63
Amorce « reverse » (20µM)	0.63

Conditions du cycle PCR : 45s à 94°C, 45s à 45°C, 45s à 72°C (30 cycles).

Le bon déroulement des PCRs a été vérifié par migration des produits PCRs sur gel d'agarose 1% (100 V, 35 minutes).

Les produits PCRs ont été envoyés à Genewiz pour la réalisation d'un séquençage Sanger. Chaque échantillon a été séquençé en « forward » et en « reverse » pour le gène COI, permettant d'avoir une plus grande fiabilité dans les données car les deux séquences peuvent être comparées pour obtenir un consensus fiable. En plus de nos échantillons de la Waal, des contrôles positifs ont été ajoutés pour les haplotypes FW5 (forme A/R) et FW17 (forme C/S).

Ces contrôles proviennent d'ADN conservé d'individus collectés précédemment : AA13 qui est de forme A/R confirmée (contrôle pour FW5) et Sa72 qui est de forme C/S confirmée (contrôle pour FW17).

4.2. Analyse des résultats

Les chromatogrammes de séquençage ont été analysés sur le logiciel Sequencher. Dans un premier temps, les amorces ont été trimées et les séquences de mauvaise qualité ont été enlevées. Ensuite, nous avons obtenu une séquence consensus avec les deux séquences disponibles pour chaque individu, de manière à vérifier que l'haplotype obtenu est bien le même en forward et en reverse.

Les haplotypes retrouvés ont été alignés avec des haplotypes COI connus (récoltés sur la base de données du NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et caractéristiques des différentes lignées grâce au logiciel MAFFT, en gardant les paramètres par défaut (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

Pour la visualisation de l'alignement, le logiciel BioEdit a été privilégié. HaplowebMaker (<https://eeg-ebi.github.io/HaplowebMaker/>) a été utilisé pour construire un réseau d'haplotypes des séquences COI, incluant celles de l'étude et celles récoltées sur NCBI, et permettre une visualisation rapide des individus présentant le même haplotype. Le but de Haplowebmaker est initialement de permettre la visualisation des partages d'haplotypes entre individus, en construisant le réseau puis en reliant les haplotypes nucléaires retrouvés chez les mêmes individus.

5. Marqueurs microsatellites

5.1. Choix des marqueurs

Les marqueurs microsatellites utilisés ont été identifiés dans Pigneur *et al*, 2011b, et les noms des marqueurs font références à ceux de cet article. Le génotypage microsatellite de chaque individu s'est fait en trois temps. D'abord les marqueurs C01, C08 et D06, E01 ont été testés. Pour ces deux premiers essais, les amorces utilisées sont celles provenant de l'expérience de

Pigneur *et al* (2011b) qui étaient encore disponibles, conservées à -20°C. Enfin, les quatre marqueurs cités auparavant ont été re-testés avec de nouvelles amorces, ainsi que pour les marqueurs microsatellites A01, A03, C12 et D12.

5.2. Amplification PCR et préparation du génotypage

Les amorces forward utilisées lors de la PCR étaient couplées à un fluorochrome. Dans les deux premiers essais, ce fluorochrome était le 56-FAM. Dans le cas du génotypage utilisant les nouvelles amorces, pour la moitié des marqueurs l'amorce était couplée au 56-FAM et l'autre moitié au 5-HEX, qui émet une longueur d'onde différente. Ceci nous a permis de multiplexer les réactions PCR deux par deux. Les conditions PCR utilisées sont celles décrites dans Pigneur *et al*, 2011b (tableau 3) :

Tableau 3 : Conditions du mix PCR microsatellites

Réactif	Volume par échantillon (µl)
Eau	5.56
ADN	1
dNTPs (2mM)	1
Go Taq Polymerase	0.04
Tampon	2
Amorce « forward » (20µM)	0.25
Amorce « reverse » (20µM)	0.25

Les produits PCR ont ensuite été dilués 200x dans de l'eau stérile. 1µl de chaque produit PCR dilué a été chargé dans un mix de génotypage contenant 10µl de formamide pour 1 µl de GenScan 500 LIZ, utilisé comme marqueur de taille.

Le génotypage a eu lieu à l'ULB sur un séquenceur 48 capillaires AB3730.

5.3. Analyse des résultats

Tous les pics ont été visualisé sur le logiciel PeakScanner et utilisés pour déterminer les états de caractère (nombre de répétition du motif microsatellite) visibles pour chaque individu sur

chaque marqueur. Les résultats ont été stockés dans un tableur Excel reprenant tous les individus et tous les états de caractère trouvés, et les tailles de pics ont été comparées avec les données de Pigneur *et al*, 2011b.

Par manque de logiciel adapté à des données triploïdes, le génotype multi locus microsatellite a été établi manuellement en se basant sur les critères suivants :

- Génotype hybride (deux allèles exclusifs de deux lignées différentes) sur au moins un marqueur ou bien présence sur l'ensemble des marqueurs d'allèles exclusif à des lignées différentes : hybrides
- Uniquement des génotypes indéterminés (pas d'amplification ou bien uniquement des allèles partagés entre plusieurs lignées) sur tous les marqueurs : indéterminé
- Génotypes A/R sur tous les marqueurs ou bien au moins un génotype A/R et des génotypes indéterminés : A/R
- Génotypes C/S sur tous les marqueurs ou bien au moins un génotype C/S et des génotypes indéterminés : C/S
- Génotype B sur au moins un marqueur : B. Il n'y a pas d'information disponible pour cette lignée dans le papier de Pigneur, 2011. Le génotype B est donc établi uniquement par comparaison avec AB15 (forme B confirmée).

Une ACP a été réalisée sur ces données à l'aide du package ade4 en R, en utilisant les tailles de pics comme variable et en encodant la présence/absence de ces pics dans chaque individu par 1/0.

6. Clonage du marqueur nucléaire ATPS

6.1. Amplification PCR et purification

La PCR du gène nucléaire ATPS s'est faite en utilisant une polymérase d'haute-fidélité (Q5 Higt-Fidelity DNA polymerase, New England BioLabs), qui a nécessité une dilution de l'ADN utilisée pour obtenir des concentrations en ADN de l'ordre de 5 ng/μl. Le calcul de dilution s'est fait sur base du Nanodrop qui a suivi l'extraction d'ADN. L'utilisation de cette polymérase est nécessaire car même des erreurs rares peuvent être rendues visibles par le clonage et être confondue avec des allèles. Le protocole utilisé pour la préparation du mix PCR et les

conditions PCR sont celles fournies par le fabricant (<https://international.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>). Les conditions PCR sont disponibles en tableau 4.

Tableau 4 : Conditions du mix PCR ATPS pour le clonage.

Réactif	Volume par échantillon (µl)
Eau	15,75
ADN	1
dNTPs (2mM)	0.5
Q5 Polymerase	0.25
Tampon	5
Amorce « forward » (20µM)	1.25
Amorce « reverse » (20µM)	1.25

Conditions du cycle PCR : 45s à 94°C, 45s à 52°C, 90s à 72°C (35 cycles).

Le bon déroulement de la PCR a été vérifié par migration sur gel d'agarose 1% (100V, 35 minutes) de 27 échantillons.

Tous les produits PCRs ont été purifiés en utilisant le kit Monarch (New England BioLabs) suivant le protocole fourni. Après purification, tous les échantillons ont été testés au Nanodrop.

6.2. Clonage

Le clonage étant très chronophage, cette étape n'a été réalisée que sur 16 individus : trois de chaque population Wa, WaA, WaB, WaC, WaD et un seul de la population Go (car celle-ci est présumée clonale d'après des données antérieures). Les individus sélectionnés pour le clonage sont ceux qui présentaient les meilleures concentrations au Nanodrop, pour maximiser les chances de succès de la manipe.

L'étape de clonage comporte plusieurs sous-étapes :

1. Ligation des inserts (nos produits PCR) dans un plasmide ;
2. Transformation dans des bactéries *E. coli* compétentes ;

3. Mise en culture sur plaque des bactéries. Le milieu utilisé est du LB-agar contenant de l'ampicilline.
4. Sélection aléatoire de 20 colonies bactériennes par individu et mise en culture liquide (milieu LB contenant de l'ampicilline (100 mg/ml).
5. Purification de chaque clone pour en obtenir l'ADN.

Les trois premières ont été réalisées grâce au PCR Cloning Kit (New England BioLabs) et suivant le protocole fourni par le fabricant ([https://international.neb.com/products/e1202-neb-pcr-cloning-kit#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage Protocols](https://international.neb.com/products/e1202-neb-pcr-cloning-kit#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage%20Protocols)).

A la fin de l'étape 4, les cultures ont été centrifugées et le milieu de culture a été vidé. Le culot a été stocké à -20°C en attendant de pouvoir réaliser la purification. Cette dernière étape s'est faite au moyen du kit Qiagen Miniprep, suivant le protocole fourni avec le kit. La vérification de la qualité de l'ADN obtenue s'est faite au Nanodrop.

Au total, les 20 clones de dix individus sur les 16 prévus ont été envoyés à Genewiz pour un séquençage Sanger, soit un total de 200 clones séquencés. Chaque clone a été séquencé en forward et en reverse. Les six individus non séquencés sont des individus pour lesquels nous n'avons pas obtenu suffisamment de colonies. L'étape de mise en culture sur plaque a été réessayée plusieurs fois sans succès pour ces individus.

6.3. Analyse des résultats

L'analyse des données brutes de séquençage s'est faite sur le logiciel Sequencher, qui a permis de trimer les amorces et le plasmide, ainsi que de supprimer les séquences de mauvaise qualité. Pour chaque individu, les séquences ont été regroupées de manière à identifier des allèles potentiels.

Ensuite, les haplotypes obtenus ont été alignés sur MAFFT (paramètres par défaut), d'abord entre eux puis avec d'autres haplotypes connus chez différentes lignées de *Corbicula*. Le logiciel HaplowebMaker a été utilisé pour réaliser un haploweb sur les données, permettant la visualisation des allèles présents et également le partage d'allèles entre individus.

L'haploweb représente les haplotypes sous forme de points, qui sont reliés par des lignes grises indiquant les distances génétiques. Les lignes de couleurs relient les haplotypes présents chez un même individu. Les pools d'allèles, c'est-à-dire les groupes d'allèles partagés, sont colorés

d'une même couleur. Il est ainsi facile de voir les allèles qui sont partagés, et d'identifier des hybrides. L'épaisseur des lignes colorées est proportionnelle au nombre d'individus qui partagent les allèles reliés par cette ligne. Tous les paramètres de Haplowebmaker ont été laissés par défaut, excepté les traits représentant le nombre de mutation qui ont été ajustés pour être visibles. Ceci est également vrai pour toutes les utilisations d'Haplowebmaker présentées ultérieurement.

Les données ont été stockées en Excel sous forme d'un tableau présentant les allèles présents chez chaque individu et le nombre de clones associés à cet allèle.

7. Séquençage Illumina des marqueurs nucléaires ATPS, 28S, alpha-amylase

7.1. Design des amorces

Le séquençage Illumina exige des fragments d'ADN de 300-400 paires de base au maximum, il a été nécessaire de redessiner des amorces pour l'alpha-amylase (*amy*). En effet, les haplotypes *amy* font chez *Corbicula* 439-547 pb (Hedtke *et al.*, 2011). Le design de nouvelles amorces s'est fait en visualisant dans BioEdit un alignement de l'ensemble des séquences *amy* disponibles dans les données du laboratoire et en recherchant une région non-variable de 20-25 pb. Cela a abouti à la définition de deux marqueurs, *amy1* et *amy2*. Ce design d'amorces n'a pas été nécessaire pour les gènes ATPS et 28S, pour lesquels les amorces pré-existantes ont été utilisées.

Afin de multiplexer les échantillons, chaque individu s'est vu attribué un tag spécifique qui a été ajouté aux amorces F et R de chaque marqueur. Les amorces ont été synthétisées par IDT (<https://eu.idtdna.com>).

7.2. Amplification PCR

Les PCRs ont été réalisées marqueur par marqueur pour 41 individus. Le choix des individus est lié au nombre de marqueurs microsatellites ayant fonctionnés (le but étant de pouvoir comparer les résultats du séquençage avec ceux du génotypage microsatellites), et d'autre part

à la redondance du génotype visible en microsatellites et en COI avec d'autres individus. Parmi les 41 individus sélectionnés, il y en a :

- 7 de WaA
- 6 de WaB
- 9 de WaC
- 11 de WaD
- 5 de Wa
- 3 de Go

Toutes les réactions ont été faites avec la GoTaq polymérase de ProMega. Les conditions PCR (tableau 5) sont similaires à celles utilisées pour le COI (tableau 2), mais ont légèrement varié selon les marqueurs nucléaires au niveau de la quantité d'ADN de départ dans les 25 µl de mix et des températures d'hybridation des amorces. Ces différences sont justifiées par la réalisation de tests préliminaires des nouvelles amorces.

Tableau 5 : Particularités des conditions PCR pour chaque marqueur.

	Quantité d'ADN de départ (µl)	Température d'hybridation des amorces (°C)
ATPS	2	60
28S	1	54
Amy1 et amy2	2	54

Le bon déroulement des PCRs a été vérifié par migration de tous les échantillons sur gel d'agarose 1% (100 V, 20 minutes).

7.3. Purification et multiplexage

Tous les produits PCRs ont été purifiés individuellement en utilisant le kit Monarch (New England BioLabs) et le protocole associé. Des échantillons test ont été passés au Qubit et au Nanodrop pour vérifier si les résultats du Qubit correspondaient davantage à ceux du Nanodrop ou à l'intensité lumineuse des échantillons révélés sur le gel. En effet, le Qubit est la méthode

de dosage la plus précise. Dans les délais impartis il était impossible d'en réaliser un sur chaque échantillon.

Les résultats montrant un Qubit proche du Nanodrop, chaque échantillon purifié a ensuite été passé au Nanodrop. Les échantillons ont été mélangés en quantité proportionnelle à leur résultats Nanodrop de sorte à obtenir dans le mélange final des concentrations à peu près similaires pour chaque échantillon.

Les échantillons ont été transmis à e-biom, une spin-off spécialisée dans l'analyse d'ADN environnementale avec laquelle le laboratoire a des collaborations scientifiques, qui ont eux-mêmes fait sous-traité le séquençage. Il s'agit d'un séquençage Illumina direct de notre mélange d'ADN sans PCR préalable. La taille des séquences était comprise entre 300 et 400 pb.

7.4. Analyse des résultats

Les premiers traitements bio-informatiques ont été réalisés par e-biom. De par leurs activités, e-biom a une bonne expertise de l'analyse de résultats de séquençage Illumina.

Les données ont été reçues sous forme d'un ensemble de séquences pour chaque individu et pour chaque marqueur. A chaque séquence était associé le nombre de fois qu'elle a été retrouvée. Pour éliminer les erreurs de séquençage, seules les séquences dont le nombre d'occurrence dépassait 10% du nombre total d'occurrence de toutes les séquences ont été sélectionnées. Le calcul appliqué pour ne sélectionner que les séquences abondantes dans chaque échantillon est donc le suivant. Parmi les séquences retrouvées pour le marqueur X chez individu Y, une est retrouvée 80x, une autre 60x, 8 autres 10x et 17 autres 1x. Le seuil de sélection sera calculé comme ceci :

$$10\% * ((1 * 80) + (1 * 60) + (8 * 10) + (17 * 1)) = 10\% * 237 = 23.7$$

Le nombre total d'occurrence de toutes les séquences est égal à 237, donc chez cet individu Y et pour ce marqueur X, seuls les séquences dont le nombre d'occurrence est supérieure à 23,7 seront retenues, c'est-à-dire les deux premières.

Les séquences retenues ont été alignées par MAFFT (tous paramètres laissés par défaut) avec les données de Vastrade *et al*, in prep. La détection des séquences identiques et la visualisation

des données se sont fait par la réalisation d'haploweb de façon similaire aux résultats de clonage.

Les résultats ont été stockés en Excel et le génotype a été déterminé séparément pour chaque marqueur sur base d'une comparaison avec les génotypes de Vastrade *et al*, in prep. Un individu est défini comme hybride quand il porte des allèles exclusifs à deux formes différentes. Un individu est considéré comme indéterminé quand son génotype pourrait correspondre à deux formes différentes (par exemple, un homozygote pour un allèle partagé entre deux formes).

Résultats

1. Morphologie

L'ACP sur les paramètres morphologiques (figure 11) ne montre pas de distinction entre individus et populations de la Waal. La population Go, contenant la forme A/R de *Corbicula*, est confondue avec les populations de la Waal. De manière générale, les individus sont regroupés au centre et se distinguent peu les uns des autres.

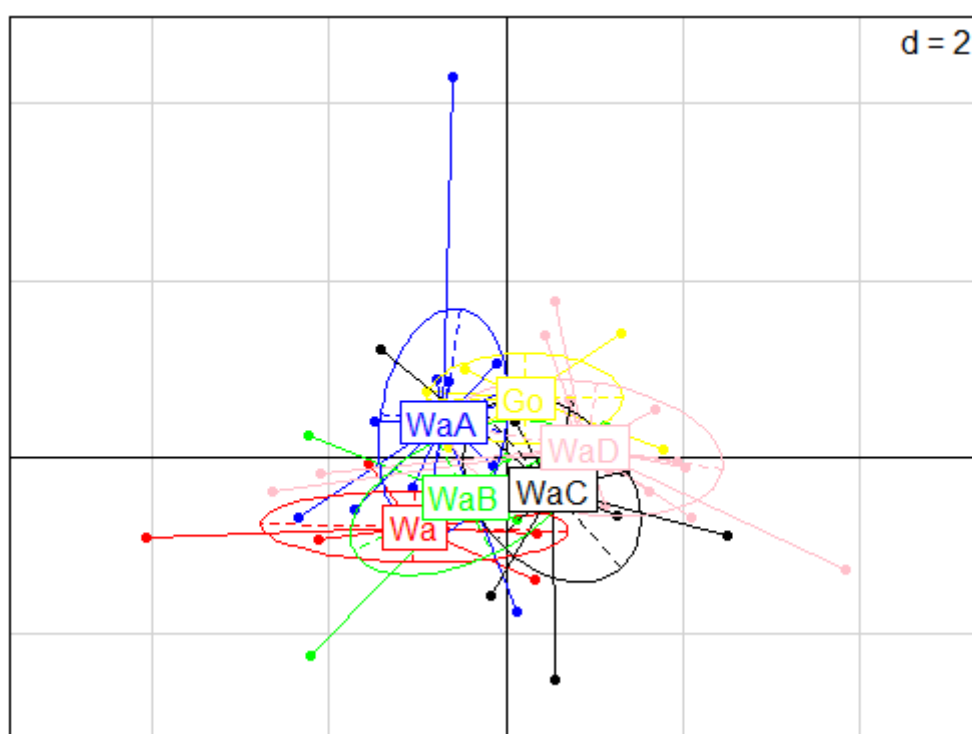


Figure 11 : Position des individus dans l'analyse en composante principale. Les individus appartenant à une même population sont de même couleur. Variables intégrées dans l'analyse : rapports S/H, L/H, W/L, W/H.

L'intégration de ces données avec celles d'Etoundi (2011) est visible en figure 12. Sur cette figure, les couleurs représentent les formes déterminées morphologiquement sur base de la forme de la coquille : rouge correspond à la forme A/R, jaune à la forme C/S et vert à la forme Rlc (Marescaux et al., 2010). Les individus de la Waal ont été mis en violet (hybrides morphologiques), tout comme l'étaient trois individus de la Seine (Etoundi, 2011). Ce jeu de données complet en figure 12 comporte 142 individus de forme A/ R, 13 de forme Rlc, 20 de forme C/S, ainsi que 55 de forme non identifiée (52 de la Waal et trois de la Seine). Les

individus de formes C/S et Rlc sont plus distincts sur cette ACP (Figure 12), néanmoins quelques individus de la forme C/S se retrouvent groupés avec la forme A/R. Les individus morphologiquement hybrides (violet) sont par contre confondus avec les individus de forme A/R. L'analyse morphologique ne permet pas facilement de distinguer les formes invasives de *Corbicula*.

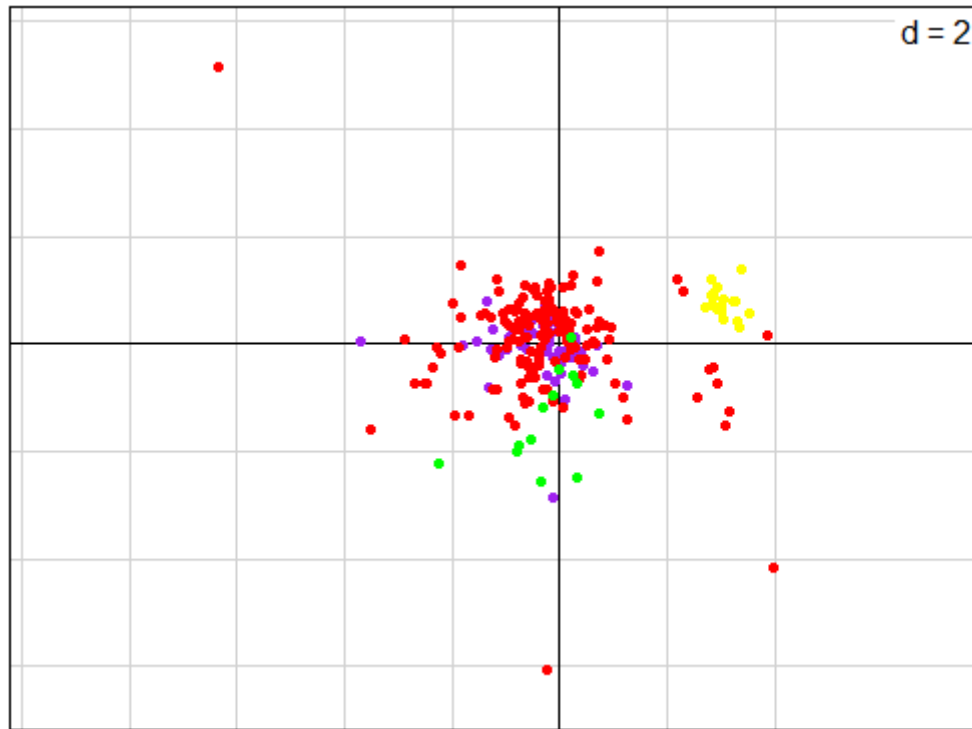


Figure 12 : Position des individus *Corbicula* dans le plan de l'analyse en composante principale. Rouge = forme A/R, jaune = forme C/S, vert = forme Rlc, violet = lignée invasive mais forme non identifiée

2. ADN mitochondrial

Le séquençage du marqueur COI montre la présence de trois haplotypes différents dans la Waal (figure 13) :

- FW5, caractéristique de la forme A/R
- FW1, associé à la forme B
- FW17, associé à la forme C/S

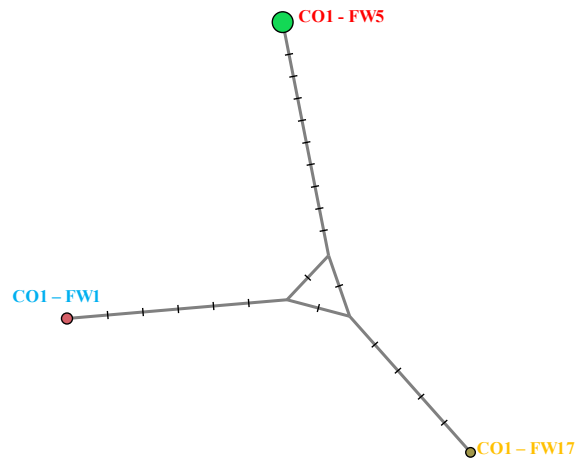


Figure 13 : Réseau d'haplotypes comprenant les trois haplotypes retrouvés en Waal.

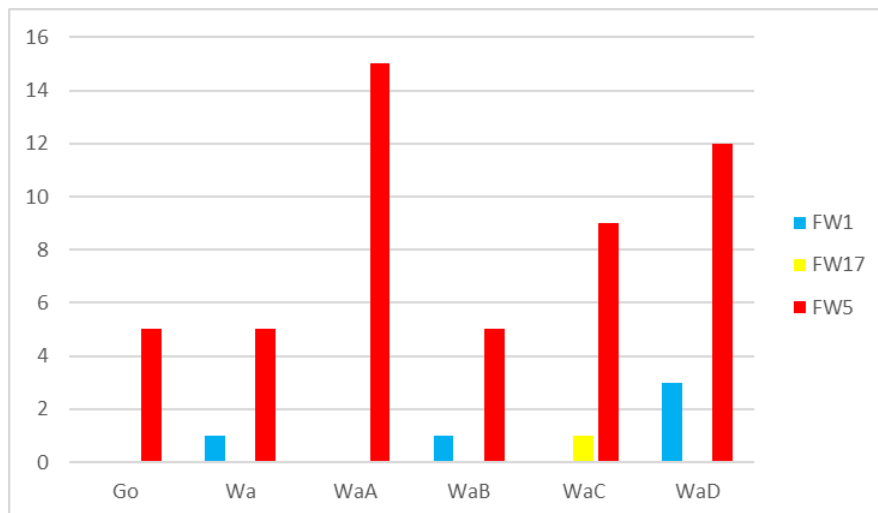


Figure 14 : distribution des haplotypes COI par population

Dans toutes les populations étudiées, l'haplotype FW5 est largement majoritaire (figure 14). FW17 n'est retrouvé que chez un seul individu de la population WaC. FW1 est principalement retrouvé au sein de la population WaD (trois individus sur les cinq), mais aussi chez WaA et Wa.

3. ADN nucléaire

3.1. **Microsatellites**

Sur les huit marqueurs microsatellites testés, deux (A01 et E01) ont été écartés à cause d'une contamination dans le contrôle négatif. Les tailles (en nombre de paires de bases) obtenues sur les autres loci pour chaque individu sont montrés en tableau 6. Les lignées ont été attribuées pour chaque allèle sur base de Pigneur *et al* (2011b), avec une exception pour le locus C12.

En effet, pour ce locus, on observe des pics à 228 et 230. Sur base de l'article de Pigneur *et al* (2011b), il faudrait attribuer l'allèle 228 à la lignées C/S, et l'allèle 230 à la lignée Rlc. Cependant, deux éléments font douter de cette attribution :

- L'allèle 228 est retrouvé chez un individu de la population Go (Go13), bien établi dans des études précédentes comme étant de la lignée A/R d'un point de vue morphologique et génétique (Vastrade *et al*, in prep)
- Le pic à 230 est courant (retrouvé chez 34 des 57 individus étudiés). Pourtant, dans le reste des résultats, dans les marqueurs microsatellites ou d'autres, aucun allèle exclusif à la lignée Rlc n'est retrouvé parmi les individus étudiés.

En se basant sur l'hypothèse que Go13 est notre contrôle positif, nous avons émis l'hypothèse d'un décalage de deux paires de bases entre les pics observés dans nos résultats et ceux observés par Pigneur *et al* (2011b) dû à l'utilisation d'un appareil séquenceur ABI différent. En appliquant ce principe, cela nous permet d'obtenir des résultats plus cohérents à la fois avec les données existantes mais également avec les données récoltées sur d'autres marqueurs. Dans le tableau 6, les tailles de pic données sont celles observées, mais les nombres sont colorés en suivant ce principe.

Tableau 6 : Vue d'ensemble des allèles présents chez chaque individu à chaque locus microsatellite. Les populations « contrôles » sont à chaque fois représentées par deux lignées. La ligne grisée représente les tailles des allèles attendues selon l'article de Pigneur et al, 2011b. L'autre ligne représente un individu de la population correspondante utilisée dans ce mémoire. Ces individus ne sont pas à proprement parler des contrôles positifs puisqu'il n'était pas a priori certain qu'ils donnent des résultats interprétables (ADN ancienne). Les couleurs représentent les lignées auxquelles appartiennent les allèles. Rouge : A/R, jaune : C/S, vert : Rlc, bleu : B, violet : partagé entre au moins deux lignées, noir : non identifié.

Population	ID	A03	C01	C08	C12	D06	D12	MLG
Ctrl R	AA	192 194	175 179	216 220	226	199 207	274 278	A/R
	AA13							
Ctrl S	C		173 175	261 306	226 228	237	274 264	C/S
	Sa72		173 175	261 305				
Ctrl Rlc	Db	190	173 175	306	230		274	Rlc
	Db25							
Ctrl B	AB							
	AB15		173 175			212	278	B
WaA	WaA1							Indéterminé
	WaA4	192			228 230			Hybride
	WaA8	189			228 230			C/S
	WaA10	189	173 179		228 230			Hybride
	WaA12		173 175					Indéterminé
	WaA13	189			228 230 207		274 278	Hybride
	WaA15		173 175		228 230 237		274 264 278	Hybride
WaB	WaB1	189			228 230 207		274	Hybride
	WaB2	189	173 175 179	216	230			Hybride
	WaB3	192	173 175 179		228 230		274 264	Hybride
	WaB4	189			230	207	274	Hybride
	WaB5	189			228 230 212		274	B
	WaB6	189			228 230 207		274 264 278	Hybride
WaC	WaC1					237	274 264	C/S
	WaC2				228 230		274 264	C/S
	WaC3	189			230	207		Hybride
	WaC4	192			228 230 207 237		274 264 278	Hybride
	WaC5	189			228 230			C/S
	WaC7	189	173 179		228 230 207		274	Hybride
	WaC8					207	274 264 278	Hybride
	WaC9	189	173 179		228 230			Hybride
	WaC10	192	173 175 179		228 237		274 264	Hybride
	WaD1	192	173 175 179		228 230		274	Hybride
WaD	WaD2	189			228 230 207		274 264 278	Hybride
	WaD3	192	173 175 179		228 230			Hybride
	WaD4	189	173 175		228 212		274	B
	WaD5	189	173 175 179		228 230			Hybride
	WaD6	189			228 230 212		274	B
	WaD8	192			228 230 237		274 264 278	Hybride
	WaD9	189			228 230 207		274 264	Hybride
	WaD10	192			228		274 264 278	Hybride
	WaD11	189	173 175 179		228 230 207		274	Hybride
	WaD15	192	173 175		228 230		274 264	Hybride
	WaD16							
Wa	Wa10	189	173 175		228 212		274	B
	Wa11	189	173 175 179	216		207	274	A/R
	Wa12	192			228 230 237		274 264	Hybride
	Wa14	189			228 230 207 237		274 264 278	Hybride
	Wa15		173 175 179			207	274 264 278	Hybride
Go	Go10		175 179	220		199 207	274 278	A/R
	Go12		175 179	216 220		199 207	274 278	A/R
	Go13	189 192	175 179	216 220	228			A/R
Individus non séquencés en Illumina	WaA2	189 192 194			228			A/R
	WaA3	189			228 230			C/S
	WaA5							Indéterminé
	WaA6							Indéterminé
	WaA7							Indéterminé
	WaA9	189			228 230			C/S
	WaA11	189			228 230			C/S
	WaA14	192			228 230			Hybride
	WaC6	192			228 230			Hybride
	WaD7	192			228 230			Hybride
	WaD12	189			228			Indéterminé
	WaD13	189			228 230			C/S
	WaD14							Indéterminé
	Wa13							Indéterminé
	Go11		175 179	216 220			274 278	A/R
	Go14							Indéterminé

Les résultats de l'ACP sur les données microsatellites sont visibles en figure 15. On observe que les A/R et C/S se distinguent bien, et que les hybrides sont plus au centre. Les individus sont toutefois assez dispersés sur le graphique, ce qui indique une certaine variabilité dans les génotypes.

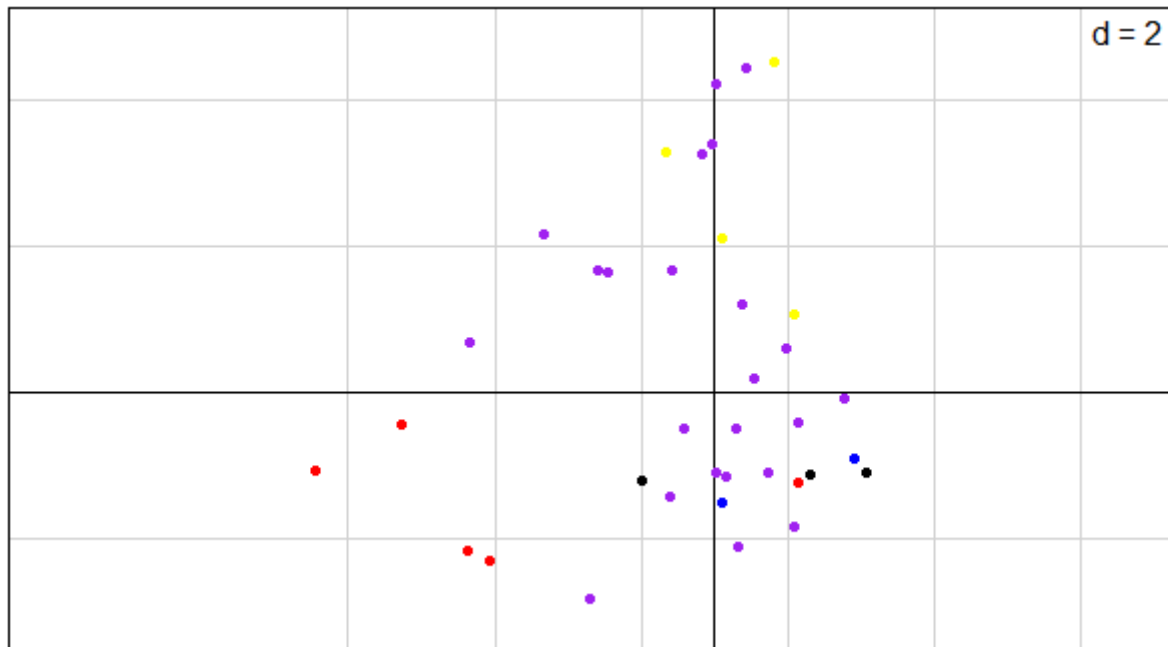


Figure 15 : Position des individus dans l'ACP sur les données microsatellites. Analyse réalisée en prenant en compte les tailles de pics présents chez chaque individu. Les couleurs représentent les lignées (qui n'ont pas été incluses comme facteur dans l'ACP). Rouge : A/R, jaune : C/S, bleu : B, violet : hybride, noir : indéterminé.

Pour les microsatellites, on retrouve plus de la moitié (30/52) des individus de la Waal considérés comme hybrides (figure 16). Ces individus ne sont généralement pas hybrides sur tous les marqueurs (tableau 6), mais portent sur l'ensemble des loci considérés des allèles exclusifs à des lignées différentes.

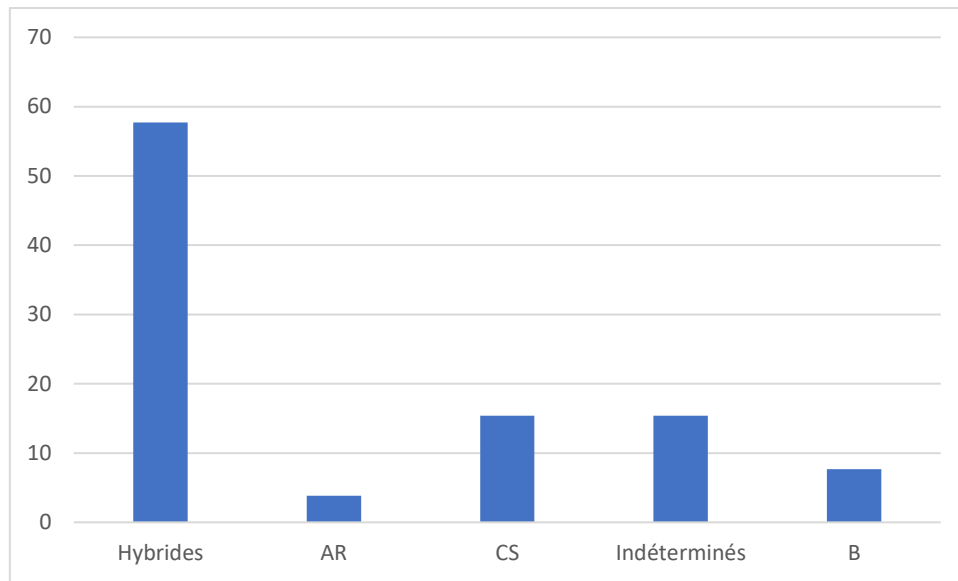


Figure 16 : Pourcentage d'individu de la Waal correspondant aux différentes lignées selon les marqueurs microsatellites. Nombre total d'individus : 52.

3.2. ATPS

3.2.1. Clonage

Sur les dix individus envoyés en séquençage Sanger, huit individus de la Waal ont montré un génotype associé à la forme C/S (tableau 7). Il est composé de deux allèles : ATPS-IA1 (retrouvé chez plusieurs lignées invasives) et ATPS-C1a (exclusif à la forme C/S). Le seul individu de la population Go envoyé (Go10) porte également l'allèle ATPS-IA1, l'autre allèle porté par cet individu est ATPS-AA12c, spécifique de la forme R. L'individu de la Waal restant (WaD4) porte trois allèles différents des autres : ATPS-AB11a et ATPS-AB11b (deux allèles partagés avec la forme B), et ATPS-CFG1b, non associé avec une lignée invasive. Ce résultat est en accord avec les données microsatellites ayant défini forme B pour cet individu.

Tableau 7: Allèles retrouvés par clonage chez les dix individus génotypés par cette méthode (20 clones par individu). Les allèles sont triés par nombre de clones les portant (allèle 1 : le plus représenté, allèle 3 : le moins représenté).

Individu	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Génotype
Go10	ATPS-AA12c	ATPS-IA1		A/R
Wa12	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
Wa14	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
WaB4	ATPS-IA1			Indéterminé
WaB6	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
WaC3	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
WaC4	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
WaD4	ATPS-AB11a	ATPS-AB11b	ATPS-CFG1b	B
WaD5	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
WaD7	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S

3.2.2. Séquençage Illumina

Tous les allèles et génotypes retrouvés par le clonage ont été retrouvés en séquençage Illumina. Sur les 41 individus envoyés au séquençage, un seul n'a pas donné de résultats. Pour ce marqueur nucléaire ATPS, il n'y a que cinq génotypes et six allèles retrouvés. Le génotype majoritaire (24 individus) dans la Waal est celui correspondant à la lignée C/S (tableau 8). On retrouve également un génotype associé à la forme B pour quatre individus, qui portent aussi un allèle considéré comme « natif ». Sur les six individus portant un génotype A/R, on retrouve les trois Go et trois individus de la Waal (WaA1, WaA4 et WaD1). Enfin, quatre individus portent à la fois l'allèle ATPS-AA12c et ATPS-C1a, et ont donc un génotype hybride A/R-C/S pour ce marqueur.

L'haploweb ATPS (figure 17) montre deux pools d'allèles partagés bien distincts (c'est à dire 2 clusters génétiques distincts), l'un correspondant aux individus qui contiennent les allèles B et l'autre à ceux contenant les allèles A/R et C/S. Il n'y a pas de partage d'allèles entre les individus de ces 2 pools d'allèles. Les hybrides A/R-C/S sont visibles sur l'haploweb car on voit une ligne brune reliant les allèles ATPS-AA12c (exclusif à la lignée A/R) et ATPS-C1a (exclusif à la lignée C/S), indiquant que ces allèles sont retrouvés ensemble chez au moins un individu.

Tableau 8 : Allèles présents chez chaque individu au locus ATPS. Les quatre premières lignes montrent les allèles retrouvés dans des populations de forme bien caractérisées. Les données de ces individus proviennent de Vastrade et al (in prep.). Les couleurs représentent les lignées auxquelles appartiennent les allèles. Rouge : A/R, jaune : C/S, vert : Rlc, bleu : B, violet : partagé entre au moins deux lignées invasives, noir : allèle non-attribué à une lignée. Les cellules noires représentent des allèles non retrouvés en Illumina mais retrouvés en clonage.

Population	ID	ATPS			Génotype
AA (forme R)		ATPS-AA11a	ATPS-IA1	ATPS-AA12c	A/R
C (forme C/S)		ATPS-C1a	ATPS-IA1		C/S
Db (forme Rlc)		ATPS-Db22a	ATPS-Db22b		Rlc
AB (forme B)		ATPS-AB11a	ATPS-AB11b	ATPS-AB11c	B
WaA	WaA1	ATPS-IA1	ATPS-AA12c		A/R
	WaA4	ATPS-IA1	ATPS-AA12c		A/R
	WaA8	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaA10	ATPS-IA1			Indéterminé
	WaA12	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaA13	ATPS-IA1			Indéterminé
	WaA15	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
WaB	WaB1	ATPS-IA1			Indéterminé
	WaB2	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaB3	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaB4	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaB5	ATPS-AB11b	ATPS-AB11a	ATPS-CFG1b	B
	WaB6	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
WaC	WaC1	ATPS-IA1			Indéterminé
	WaC2	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaC3	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaC4	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaC5	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaC7	ATPS-IA1			Indéterminé
	WaC8	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaC9	ATPS-IA1			Indéterminé
	WaC10	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
WaD	WaD1	ATPS-IA1	ATPS-AA12c		A/R
	WaD2	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaD3	ATPS-IA1			Indéterminé
	WaD4	ATPS-AB11b	ATPS-AB11a	ATPS-CFG1b	B
	WaD5	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaD6	ATPS-AB11b	ATPS-AB11a	ATPS-CFG1b	B
	WaD8	ATPS-IA1	ATPS-C1a	ATPS-AA12c	Hybride
	WaD9	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaD10	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	WaD11				Indéterminé
	WaD15	ATPS-IA1			Indéterminé
Wa	Wa10	ATPS-AB11b	ATPS-AB11a	ATPS-CFG1b	B
	Wa11	ATPS-IA1			Indéterminé
	Wa12	ATPS-IA1			Indéterminé
	Wa14	ATPS-IA1	ATPS-C1a		C/S
	Wa15	ATPS-IA1			Indéterminé
Go	Go10	ATPS-IA1	ATPS-AA12c		A/R
	Go12	ATPS-IA1	ATPS-AA12c		A/R
	Go13	ATPS-IA1	ATPS-AA12c		A/R

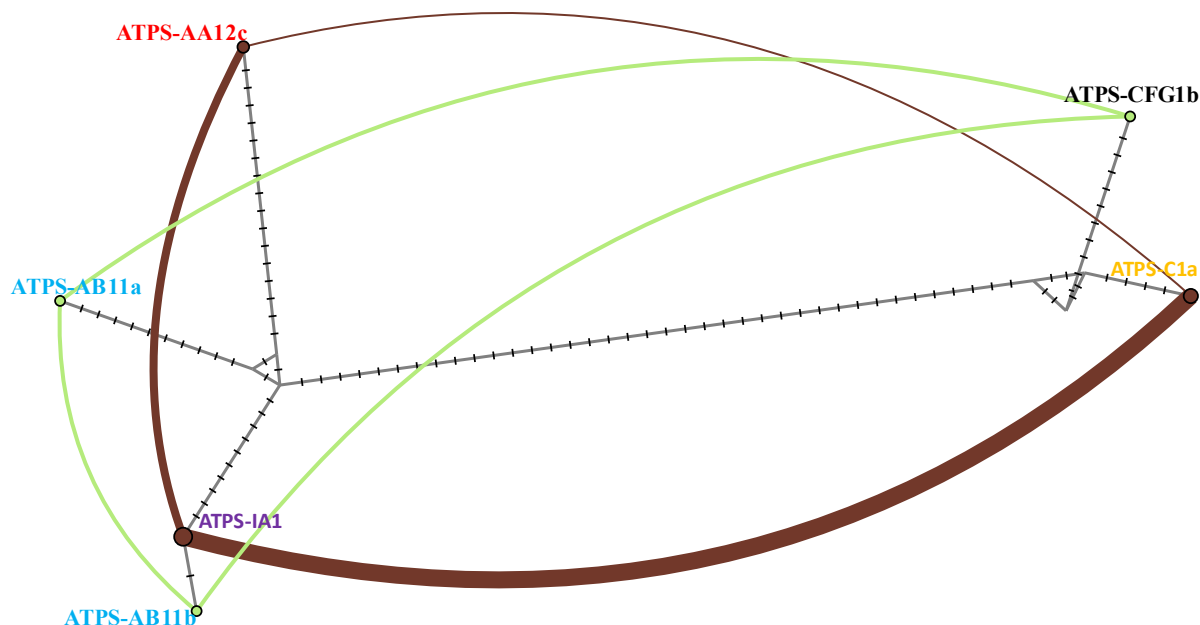


Figure 17 : Haplweb représentant les partages d'allèles entre les individus *Corbicula* étudiés pour le marqueur ATPS. Les nœuds représentent des allèles. Les lignes de couleur relient les allèles retrouvés chez un même individu. La couleur des noms des allèles indique la lignée à laquelle ils appartiennent : Rouge : A/R, jaune : C/S, vert : Rlc, bleu : B, violet : partagé entre au moins deux lignées, noir : allèles non attribués à une lignée invasive. Les lignées grises représentent le nombre d'étapes évolutives entre chaque allèle. Les singletons ont été enlevés.

3.3. 28S

Pour le marqueur nucléaire 28S on retrouve dans la Waal sept allèles présents dans d'autres populations et neuf allèles exclusifs à la Waal, présents en plus faibles nombre de copies et chez moins d'individus. La ploïdie maximale observée est de 5, chez les individus Wa10 et WaD6 qui sont identiques. Tous les individus ont fonctionné sauf WaD9 (donc 40/41 individus ont donné des séquences).

On observe pour ce marqueur 28S une majorité d'allèles partagés (tableau 9). 28S-IA1, partagé entre les lignées A/R et C/S, est présent chez 31 individus dans la Waal et chez un Go. 28S-IA3, partagé entre A/R et Rlc, est présent chez 17 individus. Tous les individus portant cet allèle portent également 28S-IA1. Contrairement aux résultats de l'ATPS, on retrouve ici peu d'allèles spécifiques à C/S : 28S-C1a est retrouvé chez un seul individu.

Quatre individus de la Waal se différencient des autres en portant un génotype 28S associé à la forme B, ce sont les mêmes individus qui portent les allèles ATPS de la forme B. Enfin, l'allèle

28S-ggg2a est retrouvé chez trois individus de la Waal et un de Go. Cet allèle est partagé avec une population Néerlandaise de forme A/R. En résumé, on retrouve pour ce marqueur 28S quatre génotypes différents pouvant être associés à la lignée A/R :

- IA3 – IA2 – IA3
- IA1 – IA3 – ggg2a
- IA2 – IA3 – ggg2a
- IA1 – IA2 – ggg2a

Comme dans le cas de l'ATPS, deux pools d'allèles ou clusters génétiques se distinguent dans l'haploweb (figure 18), l'un correspondant aux individus portant les allèles B et l'autre aux individus avec les autres allèles, sans partage d'allèles entre ces 2 clusters. Les allèles B sont bien différents des autres avec trois mutations d'écart par rapport à l'allèle le plus proche génétiquement. Contrairement à l'ATPS, il n'y a pas d'individu qui porte deux allèles spécifiques de deux lignées différentes, c'est-à-dire sur l'haploweb qu'il n'y a aucune lignée qui relie directement les allèles 28S-C1a et 28S-ggg2a. Le lien entre les deux se fait via l'allèle 28S-IA1, qui est partagé entre A/R et C/S.

Pour ce marqueur, beaucoup d'individus (27 des 37 individus séquencés avec succès) montrent un génotype indéterminé. L'allèle IA1 étant partagé entre la forme A/R et la forme C/S et l'allèle IA3 étant partagé entre A/R et Rlc, les génotypes homozygotes pour un de ces deux allèles ne permettent pas de trancher sur une lignée. De même, le génotype IA1-IA3 peut aussi bien indiquer une lignée A/R, un hybride A/R-C/S ou même un hybride A/R-Rlc. Les allèles exclusifs à la Waal ne sont attribués à aucune lignée.

Tableau 9 : Allèles présents chez chaque individu au locus 28S. Les quatre premières lignes montrent les allèles retrouvés dans des populations de forme bien caractérisées. Les données de ces individus proviennent de Vastrade et al (in prep.). Les couleurs représentent les lignées invasives auxquelles appartiennent les allèles. Rouge : A/R, jaune : C/S, vert : Rlc, bleu : B, violet : partagé entre au moins deux lignées, noir : allèles de la Waal

Population	ID	28S					Génotype
AA (forme R)		28S-IA1	28S-IA2	28S-IA3			A/R
C (forme C/S)		28S-C1a	28S-IA1				C/S
Db (forme Rlc)		28S-IA2	28S-IA3				Rlc
AB (forme B)		28S-AB11a	28S-AB11b				B
WaA	WaA1	28S-IA1	28S-IA3	28S-IA2			A/R
	WaA4	28S-IA1	28S-IA3	28S-ggg2a			A/R
	WaA8	28S-IA1	28S-ggg2a	28S-IA2			A/R
	WaA10	28S-IA1	WaA10_b				Indéterminé
	WaA12	28S-IA1	WaA12_b	WaD5_b	28S-Wa1b		Indéterminé
	WaA13	28S-IA1	28S-IA3	WaA13_c	WaA13_d		Indéterminé
	WaA15	28S-IA1	WaA12_b	WaD5_b			Indéterminé
WaB	WaB1	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
	WaB2	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
	WaB3	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
	WaB4	28S-IA1	28S-C1a	28S-Wa1b			C/S
	WaB5	28S-AB11b	28S-AB11a				B
	WaB6	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
WaC	WaC1	28S-IA1					Indéterminé
	WaC2	28S-IA1	WaD5_b				Indéterminé
	WaC3	28S-IA1	28S-IA3	28S-Wa1b			Indéterminé
	WaC4	28S-IA1	WaD5_b				Indéterminé
	WaC5	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
	WaC7	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
	WaC8	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
	WaC9	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
	WaC10	28S-IA1	WaA12_b	WaD5_b			Indéterminé
WaD	WaD1	28S-IA3	WaA13_c				Indéterminé
	WaD2	28S-IA1	WaA13_c	WaA10_b			Indéterminé
	WaD3	28S-IA1	28S-IA3	WaA13_d	28S-IA2		A/R
	WaD4	28S-AB11b	28S-AB11a	Wa10_c	Wa10_d	Wa10_e	B
	WaD5	28S-IA3	WaD5_b				Indéterminé
	WaD6	28S-AB11b	28S-AB11a	Wa10_d			B
	WaD8	28S-IA1					Indéterminé
	WaD9						Indéterminé
	WaD10	28S-IA1					Indéterminé
	WaD11	28S-IA1	28S-IA3				Indéterminé
	WaD15	28S-IA1	WaA12_b				Indéterminé
Wa	Wa10	28S-AB11b	28S-AB11a	Wa10_c	Wa10_d	Wa10_e	B
	Wa11						Indéterminé
	Wa12	28S-IA1	28S-IA3	28S-ggg2a			A/R
	Wa14	28S-IA1					Indéterminé
	Wa15	28S-IA1					Indéterminé
Go	Go10	28S-IA3	28S-IA2				Indéterminé
	Go12	28S-IA1	28S-IA3				A/R
	Go13	28S-IA3	28S-ggg2a	28S-IA2			A/R

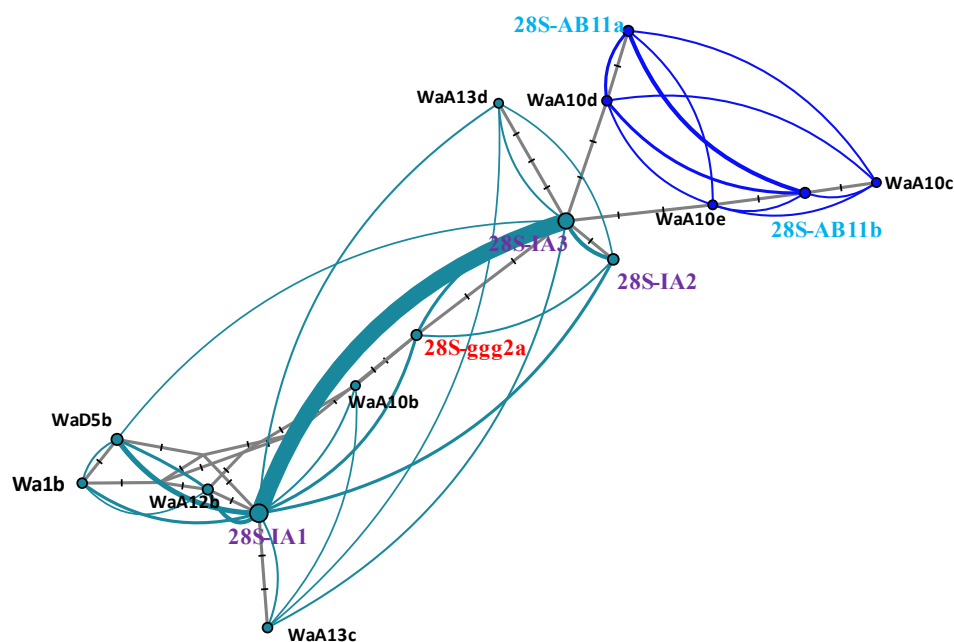


Figure 18 : Haplotype network representing the sharing of alleles between the individuals of *Corbicula* studied for the 28S marker. The nodes represent alleles. The colored lines connect the alleles found in the same individual. The color of the names of the alleles indicates the lineage to which they belong: Red: A/R, yellow: C/S, green: Rlc, blue: B, purple: shared by at least two lineages, black: alleles not assigned to a lineage. The grey lines represent the number of evolutionary steps between each allele.

3.4. Alpha-amylase

3.4.1. Amy1

On retrouve dans la Waal trois allèles amy1 spécifiques de la forme C/S : amy1-C4a, amy1-C4b, amy1-fff2c¹. Amy1-C4b est présent chez tous les individus de la Waal à l'exception des quatre portant un génotype B et de WaA1 (tableau 10). Amy1-C4a et amy1-fff2c sont moins présents (respectivement cinq et six individus sur les 36 individus séquencés avec succès). On ne les retrouve pas dans la population Go où tous les individus portent un génotype à trois allèles : IA1-IA2-AA10c. WaA1 est le seul individu de la Waal qui partage ce génotype.

Il n'y a pas en amy1 d'individu qui portent des allèles exclusifs à deux lignées différentes. Cependant, certains individus (7/36, par exemple WaA12 ou WaD11) sont considérés comme

¹ Remarque : amy1 en tant que tel n'existe pas dans les analyses précédentes. Par amy1-C4a, il faut comprendre « la portion de la séquence amy1-C4a correspondant au marqueur amy1 ». Idem pour amy2.

hybrides car ils portent un génotype avec un ou plusieurs allèles exclusifs à la forme C/S et un allèle invasif partagé, soit IA1 ou IA2. Or, les allèles IA1 et IA2 sont partagés entre les lignées A/R et B mais ne sont pas retrouvés chez la forme C/S (tableau 10, premières lignes). Ces individus sont donc à considérer comme des hybrides C/S-A/R ou C/S-B.

Sur l'haploweb (figure 19) il n'y a qu'un seul pool d'allèle, contrairement à ce qui était observé en ATPS et 28S. Cela est dû aux allèles IA1 et IA2 qui sont partagés par A/R et B. En amy1 (figure 17), on constate que l'allèle amy1-C4b se différencie plus des autres au point de vue génétique. Amy1-C4a et amy1-ff2c sont très proches (une mutation d'écart).

Tableau 10: Allèles présents chez chaque individu au locus amy1. Les quatre premières lignes montrent les allèles retrouvés dans des populations de forme bien caractérisées. Les données de ces individus proviennent de Vastrade et al (in prep.). Les couleurs représentent les lignées auxquelles appartiennent les allèles. Rouge : A/R, jaune : C/S, vert : Rlc, bleu : B, violet : partagé entre au moins deux lignées, noir : allèles de la Waal

Population	ID	Amy1				Génotype
AA (forme A/R)		amy-IA1	amy-IA2	amy-AA10c		A/R
C (forme C/S)		amy-C4a	amy-C4b	amy-fff2c		C/S
Db (forme Rlc)		amy-Db22a	amy-IA3			Rlc
AB (forme B)		amy-IA3	amy-IA1	amy-AB12b	amy-IA2	B
WaaS	WaA1	amy1-IA2	amy1-IA1	amy1-AA10c		A/R
	WaA4	amy1-C4b				C/S
	WaA8	amy1-C4b				C/S
	WaA10	amy1-C4b				C/S
	WaA12	amy1-C4b	amy1-IA2			Hybride
	WaA13	amy1-C4b				C/S
	WaA15	amy1-C4b	amy1-IA2			Hybride
WAB	WaB1	amy1-C4b				C/S
	WaB2					Indéterminé
	WaB3	amy1-C4b	amy1-C4a			C/S
	WaB4					Indéterminé
	WaB5	amy1-IA2	amy1-AB12b			B
	WaB6	amy1-C4b	amy1-fff2c			C/S
WAC	WaC1	amy1-C4b				C/S
	WaC2	amy1-C4b				C/S
	WaC3	amy1-C4b				C/S
	WaC4	amy1-C4b	amy1-IA2			Hybride
	WaC5	amy1-C4b				C/S
	WaC7	amy1-C4b	amy1-fff2c	amy1-C4a		C/S
	WaC8	amy1-C4b				C/S
	WaC9	amy1-C4b				C/S
	WaC10	amy1-C4b				C/S
WAD	WaD1	amy1-C4b				C/S
	WaD2	amy1-C4b				C/S
	WaD3	amy1-C4b				C/S
	WaD4	amy1-IA2	amy1-AB12b			B
	WaD5	amy1-C4b				C/S
	WaD6	amy1-IA2	amy1-AB12b			B
	WaD8	amy1-C4b	amy1-fff2c	amy1-IA2		Hybride
	WaD9	amy1-C4b				C/S
	WaD10	amy1-C4b	amy1-IA2			Hybride
	WaD11	amy1-C4b	amy1-fff2c	amy1-C4a	amy1-IA1	Hybride
	WaD15	amy1-C4b	amy1-fff2c	amy1-C4a		C/S
WAA	Wa10	amy1-IA2	amy1-AB12b			B
	Wa11	amy1-C4b				C/S
	Wa12	amy1-C4b				C/S
	Wa14	amy1-C4b				C/S
	Wa15	amy1-C4b	amy1-fff2c	amy1-C4a	amy1-IA1	Hybride
Go	Go10	amy1-IA2	amy1-IA1	amy1-AA10c		A/R
	Go12	amy1-IA2	amy1-IA1	amy1-AA10c		A/R
	Go13	amy1-IA2	amy1-IA1	amy1-AA10c		A/R

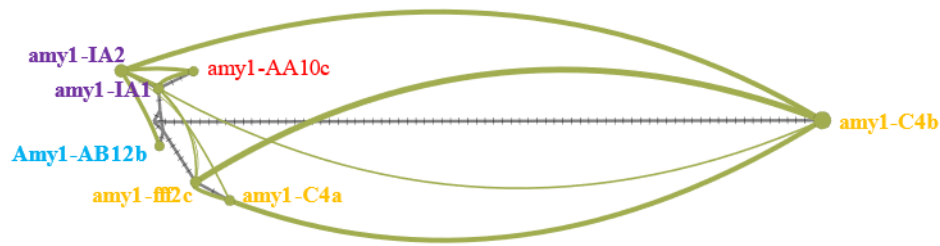


Figure 19 : Haploweb représentant les partages d'allèles entre les individus étudiés pour le marqueur amy1. Les nœuds représentent des allèles. Les lignes de couleur relient les allèles retrouvés chez un même individu. La couleur des noms des allèles indique la lignée à laquelle ils appartiennent : Rouge : A/R, jaune : C/S, vert : Rlc, bleu : B, violet : partagé entre au moins deux lignées, noir : allèles non attribués à une lignée. Les lignes grises représentent le nombre d'étapes évolutives entre chaque allèle.

3.4.2. Amy2

Pour amy 2, on observe davantage d'allèles par individu. Le génotype majoritaire est hybride (27 sur 38 individus séquencés avec succès). Parmi les hybrides, un seul (WaA8) porte des allèles spécifiques de la forme C/S et A/R. Les autres portent des allèles C/S et un allèle amy2-IA2, qui est partagé entre les formes A/R et B (tableau 11). Il faut noter que sur la portion de séquence correspondant à amy2, les allèles amy-IA1 et amy-IA2 ne sont pas distinguables. Les allèles notés amy2-IA2 dans le tableau pourraient aussi être amy2-IA1. Du point de vue de l'hybridation, cela ne change rien car amy-IA1 et amy-IA2 sont partagés par les mêmes formes. Comme pour les autres marqueurs, on retrouve quatre individus de génotype B.

Sur l'haploweb (figure 20), les distances génétiques entre les différents allèles sont moins grandes qu'en amy1. Tous les allèles sont partagés, on n'observe pas de pools d'allèles ou clusters génétiques séparés comme c'est le cas pour les marqueurs ATPS et 28S. Cela est similaire à ce qui était observé en amy1.

Tableau 11 : Allèles présents chez chaque individu au locus amy2. Les quatre premières lignes montrent les allèles retrouvés dans des populations de forme bien caractérisées. Les données de ces individus proviennent de Vastrade et al (in prep.). Les couleurs représentent les lignées auxquelles appartiennent les allèles. Rouge : A/R, jaune : C/S, vert : Rlc, bleu : B, violet : partagé entre au moins deux lignées, noir : allèles de la Waal

Population	ID	Amy2				Génotype
AA (forme R)		amy-IA1	amy-IA2	amy-AA10c		A/R
C (forme C/S)		amy-C4a	amy-C4b	amy-fff2c		C/S
Db (forme Rlc)		amy-Db22a	amy-IA3			Rlc
AB (forme B)		amy-IA3	amy-IA1	amy-AB12b	amy-IA2	B
WaA	WaA1	amy2-IA2	amy2-AA10c			A/R
	WaA4	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a	amy2-fff2c	Hybride
	WaA8	amy2-C4b	amy2-C4a	amy2-AA10c		Hybride
	WaA10	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaA12	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaA13	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaA15	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
WaB	WaB1	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaB2	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a	amy2-fff2c	Hybride
	WaB3	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-fff2c		Hybride
	WaB4	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-fff2c		Hybride
	WaB5	amy2-IA2	amy2-IA3	amy2-AB12b		B
	WaB6	amy2-C4b	amy2-C4a			C/S
WaC	WaC1	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaC2	amy2-C4b	amy2-C4a	amy2-fff2c		C/S
	WaC3	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaC4	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaC5	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a	amy2-fff2c	Hybride
	WaC7	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a	amy2-fff2c	Hybride
	WaC8	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaC9	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a	amy2-fff2c	Hybride
	WaC10	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
WaD	WaD1	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaD2	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaD3	amy2-C4b	amy2-C4a			C/S
	WaD4	amy2-IA2	amy2-IA3	amy2-AB12b		B
	WaD5	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a	amy2-fff2c	Hybride
	WaD6	amy2-IA2	amy2-IA3	amy2-AB12b		B
	WaD8	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaD9	amy2-C4b	amy2-C4a	amy2-fff2c		C/S
	WaD10	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	WaD11	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a	amy2-fff2c	Hybride
	WaD15	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a	amy2-fff2c	Hybride
Wa	Wa10	amy2-IA2	amy2-IA3	amy2-AB12b		B
	Wa11	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	Wa12	amy2-C4b	amy2-C4a			C/S
	Wa14	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
	Wa15	amy2-C4b	amy2-IA2	amy2-C4a		Hybride
Go	Go10	amy2-IA2	amy2-AA10c			A/R
	Go12	amy2-IA2	amy2-AA10c			A/R
	Go13	amy2-IA2	amy2-AA10c			A/R

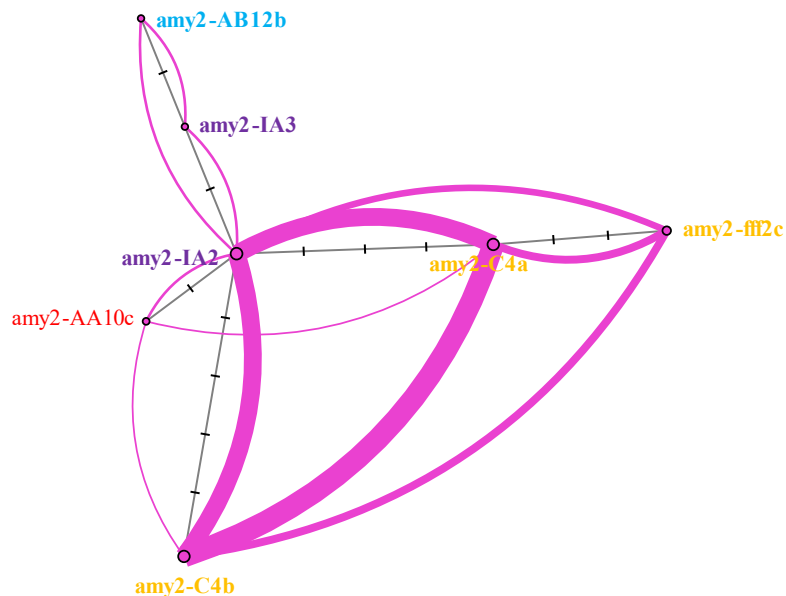


Figure 20 : Haplotype network representing the sharing of alleles between the individuals studied for the marker amy2. The nodes represent alleles. The lines of color connect the alleles found in the same individual. The color of the names of the alleles indicates the lineage to which they belong: Red: A/R, yellow: C/S, green: Rlc, blue: B, purple: shared between at least two lineages, black: alleles not assigned to a lineage. The grey lines represent the number of evolutionary steps between each allele.

4. Synthèse des différents marqueurs

Les individus de la population Go ont tous les trois un génotype A/R pour tous les marqueurs testés. On trouve dans la Waal davantage de lignées différentes : A/R, C/S, B et des hybrides. Une synthèse comparant les résultats de séquençage pour COI et les différents marqueurs nucléaires séquencés en Illumina est montrée en figure 21.

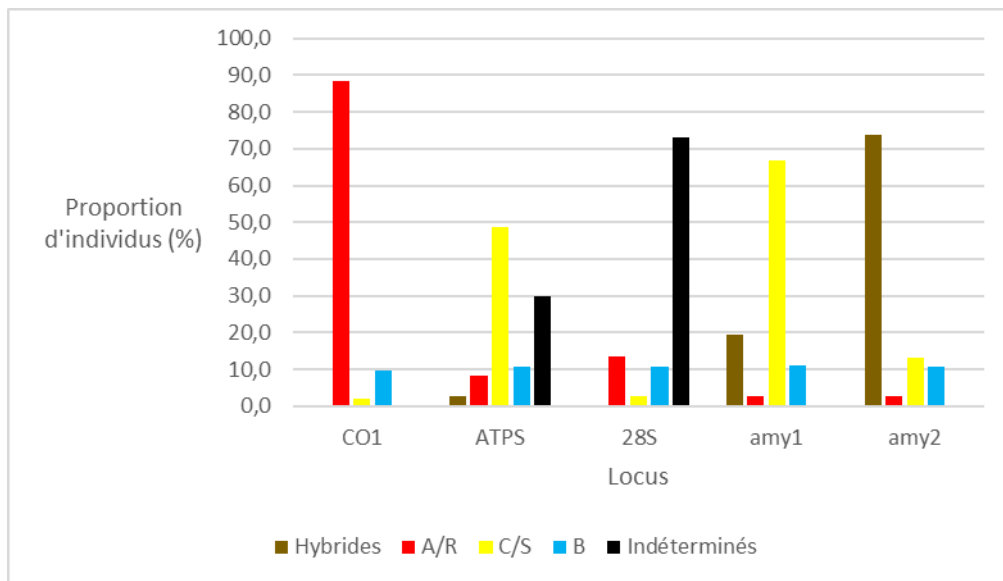


Figure 21 : histogramme représentant les résultats de séquençage pour COI et les différents marqueurs nucléaires séquencés en Illumina. Seuls les individus de la Waal sont compris. Pour chaque marqueur, le graphique indique la proportion d'individus portant un génotype associé à chaque forme. Les allèles exclusifs à la Waal pas été pris en compte dans la réalisation de l'histogramme. Nombre total d'individu : COI : 52, ATPS : 37, 28S : 37, amy1 : 36, amy2 : 38.

L'allèle majoritaire au locus COI est FW5 (lignée A/R), alors qu'on observe dans les marqueurs nucléaires peu d'allèles exclusif à la lignée A/R mais plutôt la forme C/S (figure 21). Par contre, les individus de la population Go correspondent au niveau mitochondrial et nucléaire à la forme A/R, et ne montrent aucun mismatch cytonucléaire.

Dans la Waal, en regardant plus en détail, l'individu WaA1 correspond à la forme A/R pour tous les marqueurs testés (c'est le seul individu forme A/R trouvé en Waal). Enfin, WaC2, qui est le seul à porter l'haplotype COI FW17 (forme C/S), ne contient que des allèles partagés avec C/S pour les marqueurs nucléaires. On peut donc considérer qu'il ne semble pas y avoir de mismatch chez cet individu et qu'il s'agit d'un individu de la forme C/S.

Quatre individus présentent des génotypes de la forme B : WaB5, WaD4, WaD6, Wa10. Ces individus sont strictement identiques pour les marqueurs COI (ayant l'haplotype FW1 de la forme B) et pour les marqueurs nucléaires ATPS, 28S et alpha-amylase (ayant des allèles de la forme B). Pour les marqueurs microsatellites, Wa10 et WaD4 sont identiques et WaB5 et WaD6 sont identiques mais ayant moins de loci amplifiés que pour Wa10 et WaD4, ils ont tous un allèle spécifique forme B pour le locus D06. Il y a un autre individu (WaD3) qui possède un haplotype COI FW1 (forme B) mais pas d'allèles nucléaires exclusif à la forme B.

WaA1 pourrait être un « pur » A/R, WaC2 un « pur » C/S, et WaB5, WaD4, WaD6, Wa10 des « purs » B. Si l'on considère l'ensemble des marqueurs, tous les autres individus possèdent des allèles pouvant provenir de deux lignées différentes, avec 84 % des individus considérés comme hybrides (tableau 13). Parmi ceux-ci, on compte 73% (29 individus) d'hybrides qui portent des allèles de A/R et C/S. Un individu est également hybride A/R-C/S au niveau nucléaire mais porte un haplotype COI de la forme B. Les 8% (3 individus) restant portent des allèles de C/S et un allèle partagé par B et A/R (amy2-IA2), qui les définit comme hybride mais ne permet pas de trancher sur les lignées hybridées.

La répartition des individus en lignées sur base de l'ensemble des marqueurs est synthétisée dans le tableau 12. Un tableau récapitulatif de l'ensemble des marqueurs pour tous les individus est fourni en annexe 1.

Tableau 12 : Nombres, proportion et exemples d'individus des différentes lignées retrouvées dans la Waal. Nombre total d'individus : 38. Cela comprend les individus de la Waal qui ont été analysés pour tous les marqueurs.

	N individus	Proportion	Exemples
Hybrides A/R-C/S	28	73,68	WaA4, WaB2, WaC4, WaD8, Wa12
A/R	1	2,63	WaA1
C/S	1	2,63	WaC2
B	4	10,53	WaB5, WaD4, WaD6, Wa10
Hybrides A/R-C/S ou A/R-B	3	7,89	WaC5, WaA12, WaC1
Hybride nucléaire A/R-C/S avec ADN mitochondrial B	1	2,63	WaD3

La comparaison des marqueurs nucléaires montre aussi une différence dans le nombre d'allèles retrouvés entre les marqueurs (figure 22). Pour l'ATPS on ne voit généralement qu'un ou deux allèles différents, trois allèles ne sont retrouvés que chez les B ou chez l'hybride WaD8. Pour amy2 la tendance est inversée avec le plus souvent trois ou quatre allèles différents.

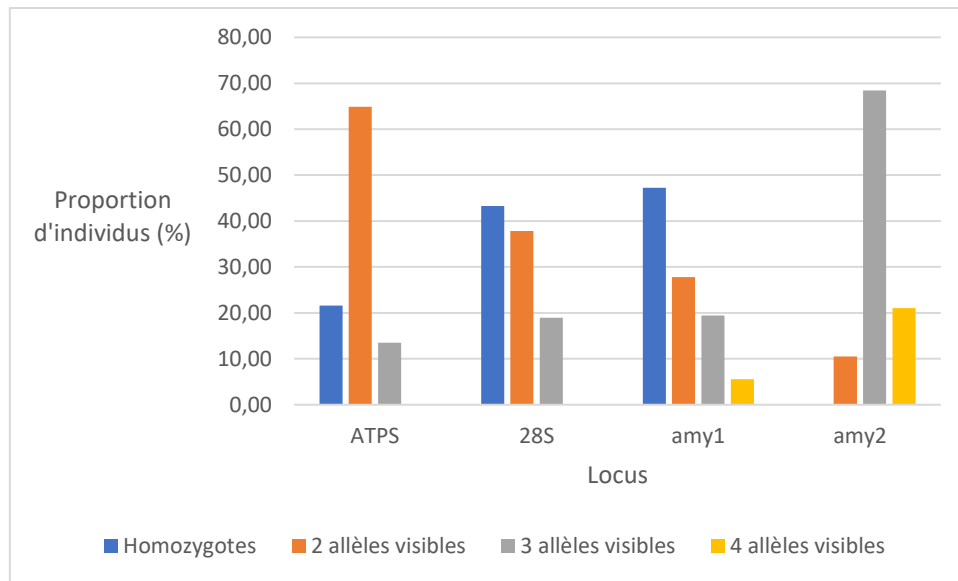


Figure 22 : Histogramme représentant pour chaque marqueur séquencé en Illumina la proportion d'individus pour lesquels on retrouve un (homozygote), deux, trois ou quatre allèles. Nombre total d'individu : 38.

5. Lien génétique-morphologie

L'ACP réalisée en figure 11 a été refaite en regroupant les individus selon la lignée déterminée par les marqueurs génétiques : A/R, C/S, B, hybrides. Le résultat est visible en figure 23. Les individus de la lignée B sont séparés. On ne peut pas distinguer les hybrides et les formes A/R. Le seul individu C/S est également séparé. Les différences entre B et les autres individus sont principalement liées à un ratio hauteur / longueur plus faible et un ratio longueur sur épaisseur plus élevé (figures 24 et 25).

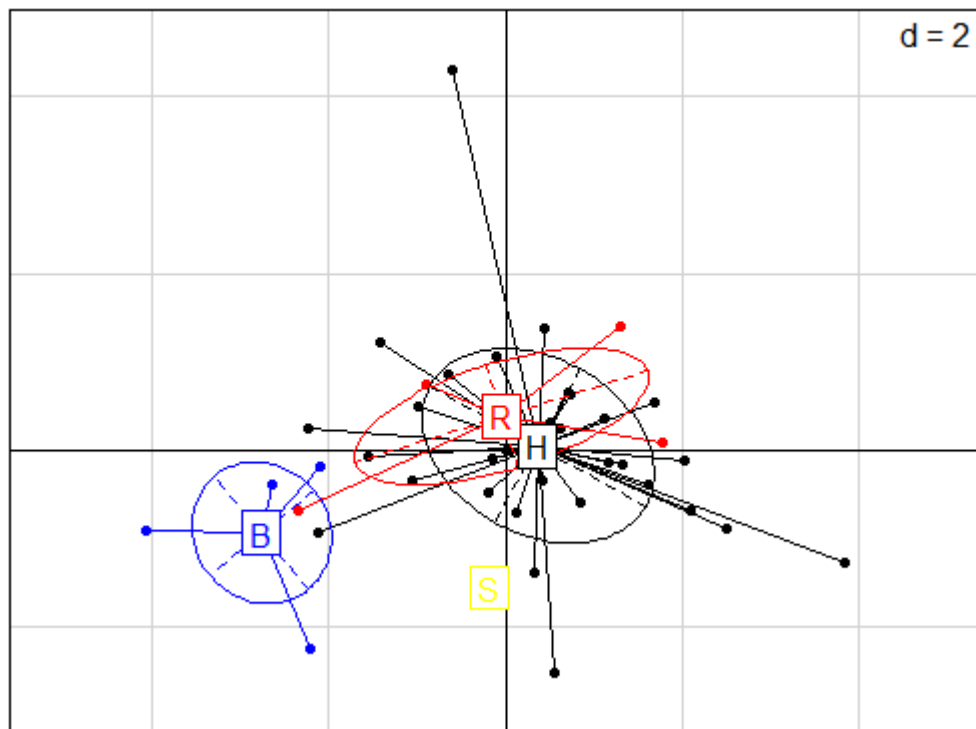


Figure 23 : Position des individus dans l'analyse en composante principale. Les individus appartenant à une même lignée sont colorés en une même couleur. B : bleu, R : rouge, S : jaune, hybride : noir. Nombre total d'individus : 41 (38 de la Waal et 3 de Go).

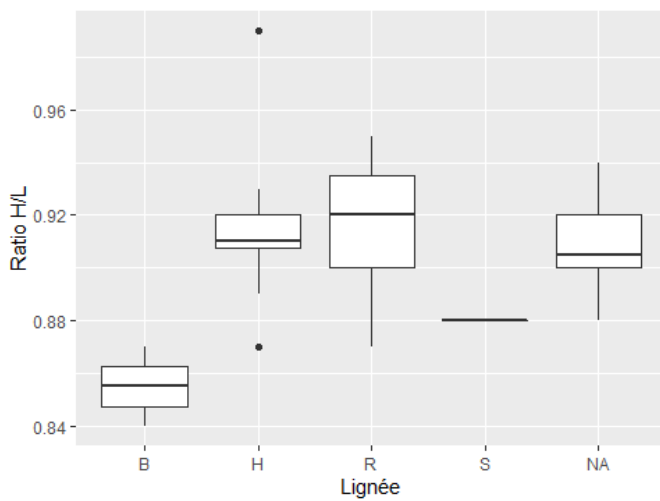


Figure 25 : Boxplot du ratio hauteur / longueur en fonction de la lignée. Les lettres indiquent la lignée. H : hybrides, NA : individus non passés en Illumina (auxquels aucune lignée n'a été attribuée).

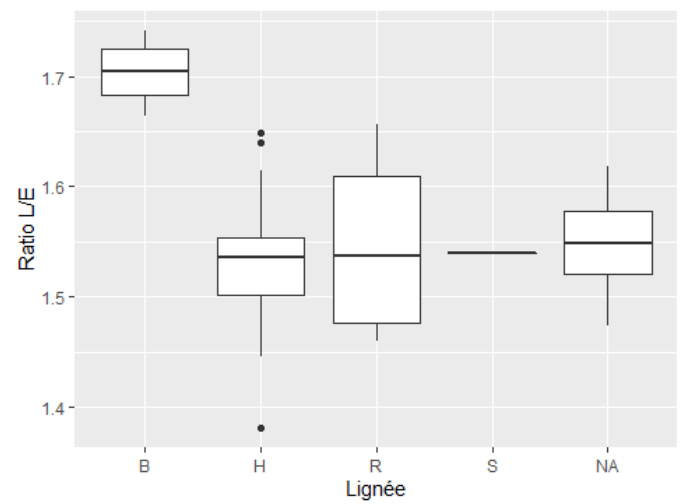


Figure 24 : Boxplot du ratio hauteur / longueur en fonction de la lignée. Les lettres indiquent la lignée. H : hybrides, NA : individus non passés en Illumina (auxquels aucune lignée n'a été attribuée).

Discussion

1. Microsatellites

Le pic à 189 retrouvé au locus A03 est le seul qui ne puisse pas être relié à une lignée. Ce pic est connu et a été retrouvé dans certaines populations du Rhône de morphotype Rlc, mais sans confirmation à que ce pic soit bien un allèle et pas un pic parasite (Etoundi, no published data).

En comparant les résultats avec ceux présentés par Pigneur *et al* (2011b), une différence frappante est le nombre d'allèles par marqueurs. L'article ne montre que des génotypes homozygotes ou avec deux allèles, alors que nous avons retrouvé retrouve des génotypes avec trois allèles : 274-264-278 au locus D12 et 173-175-179 au locus C01. Il s'agit dans les deux cas de génotypes hybrides, ce qui est cohérent avec l'hypothèse présentée en introduction (figure 6), selon laquelle l'hybridation s'accompagne d'une augmentation de ploïdie. On observe cependant également des génotypes hybrides à seulement deux allèles visibles (207-237 au locus D06 et 173-179 au locus C01). La limite de la méthode utilisée ici est qu'il est difficile de savoir s'il n'y a réellement que deux allèles ou si un des deux est présent en double copie.

Les individus de la population Go, qui sont de forme A/R et présumés non-hybrides, montrent des génotypes qui correspondent à ce qui est attendu pour cette forme pour tous les marqueurs microsatellites, à l'exception du cas du pic à 228 au locus C12 que l'on a déjà évoqué.

Le manque de succès d'amplification des « contrôles » par rapport aux individus de la population Waal peut s'expliquer par le fait qu'il s'agit d'ADN plus ancienne

2. Autres marqueurs nucléaires

Pour le 28S, on voit apparaitre neuf nouveaux allèles. Parmi ceux-ci, il se peut que certains résultent d'erreurs de séquençage. Le séquençage Illumina génère un grand nombre de séquences, donc d'erreurs, et il peut être difficile de distinguer un véritable allèle d'une erreur de séquençage récurrente. La présence d'erreur dans le jeu de données est soutenue par le fait qu'on note chez certains individus cinq allèles différents alors qu'une ploïdie de cinq n'a jamais

été observée chez *Corbicula*, le maximum étant de quatre (Qiu et al., 2001). D'un autre côté, l'exigence de notre analyse laisse penser qu'il ne devrait pas y avoir d'erreur, ou en tout cas très peu. Parmi ces allèles spécifique à la Waal, il est probable que 28S-Wa1b soit réel car il avait déjà été retrouvé chez un individu de la Waal en clonage (Vastrade *et al.*, In Prep). De plus, sa position dans l'haploweb à minimum deux mutations de tout allèle déjà connu diminue la probabilité qu'il soit le résultat d'une erreur de séquençage.

Les allèles 28S-Wa10-c, Wa10-d et Wa10-e pourraient être des erreurs fréquentes du séquençage de 28S-AB11b et 28S-AB11a puisqu'on les retrouve toujours ensemble et qu'il n'y a qu'une mutation d'écart entre ces allèles.

Une autre hypothèse que l'erreur pour expliquer l'apparition de ces allèles exclusif à la Waal est qu'ils résultent de duplication de gène. Comme on ne retrouve d'allèles spécifiques à la Waal que pour le locus 28S, il est aussi possible que ce gène soit particulièrement favorable à des duplications. Cette hypothèse explique également de manière satisfaisante la présence de cinq allèles à ce locus (dû à des paralogues), sans que cela n'implique forcément que l'individu soit pentaploïde.

Au niveau de l'ATPS, on observe uniquement des allèles déjà présents dans d'autres populations. La présence d'un allèle retrouvé en clonage mais pas en Illumina (individu Wa14) montre que la méthode n'est pas parfaite et peut laisser passer certains allèles. Cependant, le séquençage Illumina permet en contrepartie de séquencer bien plus d'individus sur davantage de loci différents. Etant donné le fait que certains individus peuvent avoir un génotype de forme C/S sur un locus et un génotype hybride ou de forme A/R sur un autre, comme cela est également observé en microsatellites, il paraît avantageux de pouvoir séquencer plus marqueurs.

3. Lignées présentes dans la Waal

Parmi les allèles présents dans la Waal, on retrouve presque toutes les lignées invasives. Les trois lignées retrouvées en Europe A/R, C/S, Rlc (Marescaux *et al.*, 2010) sont représentées. La lignée Rlc est moins visible car on ne retrouve qu'un état de caractère spécifique à Rlc apparaitre uniquement en microsatellites (C12). On retrouve néanmoins plusieurs allèles qui

sont partagés entre Rlc et d'autres lignées (amy-IA3, 28S-IA3 et plusieurs états de caractère en microsatellites), mais aucun allèle exclusif à Rlc.

De manière intéressante, on retrouve également la lignée B dans la population de la Waal. Celle-ci est décrite comme exclusivement américaine (Britton and Morton, 1986; Lee *et al.*, 2005). La présence d'individus porteur d'allèles B dans la Waal est donc surprenante. Cependant, les espèces exotiques envahissantes sont toujours des espèces capables de se disperser facilement, entre autres via les eaux de ballastes (Cariton and Geller, 1993). L'introduction de lignées invasives de *Corbicula* par les eaux de ballaste de bateaux en provenance du continent américain est une hypothèse qui est souvent avancée pour expliquer leur apparition en Europe (Pfenninger *et al.*, 2002; Pigneur *et al.*, 2011a, 2014; Renard *et al.*, 2000).

Il s'agit donc d'une hypothèse plausible pour expliquer l'apparition de la lignée B dans la Waal. De plus, la ville de Nijmegen où les individus ont été récoltés est relativement proche du port maritime de Rotterdam (approximativement 120 kilomètres, distance calculée avec Google Map). Un des individus concernés étant Wa10, collecté en 2018, on doit en conclure que l'invasion date au moins d'il y a trois ans.

Il est à noter que ce n'est pas la première fois qu'un allèle B est retrouvé en Europe puisque un haplotype COI FW1 avait déjà été trouvé en Espagne (Peñarrubia *et al.*, 2017). Les auteurs ne l'expliquaient pas par une invasion de la lignée B depuis l'Amérique mais par une grande proximité phylogénétique entre la lignée B et Rlc, au moins du point de vue de l'ADN mitochondrial. Cependant, les deux lignées sont distinctes au moins par microsatellites (Pigneur *et al.*, 2011b), mais ceci n'avait pas été testé par les auteurs.

Etant donné la présence sur ces individus d'un allèle considéré comme appartenant à la zone native, une troisième hypothèse est l'introduction d'individus de génotype B depuis la zone native.

4. Mismatches cytonucléaires et hybridation

Les lignées invasives de *Corbicula* sont connues pour se reproduire par androgénèse (Komaru *et al.*, 1998). Ce mode de reproduction considère tous les individus comme étant des clones de leurs père (Pigneur *et al.*, 2012), à l'exception de l'ADN mitochondrial qui est gardé de la mère (Hedtke *et al.*, 2008). Cela peut conduire à des mismatches cytonucléaires dans le cas d'un

événement de parasitisme de l'œuf d'une autre lignée ou à de l'hybridation (Hedtke and Hillis, 2011; Hedtke *et al.*, 2008). Dans la Waal, ces mismatches cytonucléaires/hybrides forment la règle plutôt qu'une exception puisque seuls WaA1, WaC2 et les 4 individus de la forme B semblent contenir un haplotype mitochondrial de la même lignée que tous les allèles nucléaires séquencés.

Au niveau nucléaire, presque tous les individus de la Waal (84%) portent des allèles provenant de plusieurs lignées invasives (tableau 13). On peut donc parler d'une population dominée par des hybrides. Pour tous les cas de mismatches observés, le génome nucléaire est toujours hybride avec une majorité d'allèles C/S (tableau 12, figure 21, annexe 1), ce qui laisse penser que la forme C/S est davantage capable de parasiter les œufs d'autre lignées que l'inverse. Par ailleurs, le génome nucléaire hybride est dans 28 cas sur 29 associé à l'haplotype COI FW5 de la forme A/R, suggérant que l'hôte parasite est souvent la forme A/R (Annexe 1). Il y a également un cas où l'œuf envahit est de lignée B (haplotype COI FW1). Le parasitisme plus fréquent d'un œuf de A/R par rapport à un œuf de B est probablement lié au fait que A/R est implantée depuis plus longtemps en Europe et donc plus abondante que la forme B.

Les individus qui composent la population de la Waal ne sont pas clonaux puisqu'ils ne portent pas tous les mêmes allèles sur tous les marqueurs. Les différentes sous-populations échantillonnées ne paraissent pas se différencier clairement les unes des autres, bien que ceci n'ait pas été vérifié statistiquement. Les individus sont différents entre eux mais la différence observée entre individus au sein d'une sous-population ne semble pas moins grande que la différence observée entre individus des populations. On peut donc considérer l'ensemble des individus de Waal récoltés dans le cadre de ce mémoire comme faisant partie d'une même population. Ce n'est pas surprenant vu les faibles distances entre sites de récolte.

Les captures de gènes semblaient des événements rares chez *Corbicula* (Hedtke *et al.*, 2011). On se serait donc attendu à voir un faible nombre de génotypes hybrides partagés par un grand nombre d'individu. Ce modèle semble valable quand on étudie un marqueur à la fois. Ce n'est cependant pas suffisant. En effet, dans l'androgenèse c'est l'entièreté du génome nucléaire du père qui est transmis à la descendance via la fertilisation de l'ovule par un spermatozoïde non-réduit (Pigneur *et al.*, 2012). Le génotype transmis devrait donc être le même pour tous les marqueurs, sauf s'il y a hybridation (rétention d'une partie du génome nucléaire maternelle). Or, peu d'individus ont un génotype identique sur l'ensemble des marqueurs et combinent parfois des allèles de lignées différentes. Il est donc possible que des événements de capture de gènes (hybridation) aient eu lieu dans la Waal plus fréquemment que ce que l'on imagine

habituellement. Cela expliquerait la ploïdie élevée observée chez les individus étudiés, souvent tétraploïdes si l'on se base sur le nombre d'allèles différents retrouvés en amy2 (parfois pentaploïdie si on considère tous les allèles retrouvés en 28S). La littérature a déjà relevé des individus tétraploïdes (Qiu *et al.*, 2001), mais le plus fréquemment on ne retrouve que trois allèles par individu (Vastrade *et al.*, In Prep).

Un autre problème est celui des contradictions entre marqueurs : individus portant des allèles d'une lignée spécifique sur un marqueur, et des allèles d'une autre lignée ou hybrides sur un autre marqueur. Une explication pourrait être que la capture de gènes n'est pas complète mais partielle, et que l'hybridation peut survenir successivement en impliquant plusieurs lignées. Au lieu de capturer une le génome entier d'une autre lignée, il n'y a capture que d'une partie du génome, par exemple le génome haploïde maternel donnant lieu à un individu triploïde (figure 6b). Si par la suite cet individu peut capturer le génome haploïde maternel d'une autre lignée, cela permet de combiner différents génomes nucléaires au sein d'un même individu. On peut aussi imaginer qu'uniquement quelques chromosomes maternels soient capturés, il faut cependant expliquer comment ces quelques chromosomes ne s'intégreraient pas dans le corps polaire visualisé par Komaru *et al* (1998). Cette hypothèse pourrait être testée par une analyse FISH (Fluorescent in situ hybridisation) sur les caryotypes d'individus polyploïdes contenant des allèles de différentes lignées ou en séquençant le génome complet de ces individus.

Une autre hypothèse qui expliquerait à la fois le manque de ressemblance entre individus sur l'ensemble des marqueurs et les contradictions entre marqueurs pourrait être la possibilité de crossing-over pendant la spermatogenèse. Si un individu hybride (par exemple celui résultant d'une capture de chromatide comme dans la figure 9b) est capable de recombinaison, alors il peut produire des gamètes qui auront des génotypes différents du sien. Un individu dont le génotype ATPS serait IA1-AA12c-Cla pourrait produire des gamètes dont le génotype ATPS serait par exemple IA1-Ia1-Cla ou Cla-Cla-AA12c. Le mécanisme de spermatogenèse chez *Corbicula* reste assez peu connu et la possibilité de recombinaison n'a jamais été écartée (Pigneur *et al.*, 2012). Cependant, cette hypothèse est remise en question par le fait que les populations sont généralement clonales (Pigneur *et al.*, 2014; Vastrade *et al.*, In Prep).

5. Morphologie

L'intégration des données du mémoire dans les données d'Emilie Etoundi (figure 12) s'est faite en supprimant la variable stries, ce qui conduit à une perte d'information. Cette décision a été prise suite à la difficulté de réaliser la mesure de stries exactement de la même façon que ce qui avait été fait à l'époque (manque de précisions sur la prise en compte ou non de petites stries près de la charnière très difficiles à compter de manière fiable). Néanmoins, une comparaison du graphique obtenu avec celui du mémoire de 2011 (figure 5) montre que les deux amènent aux mêmes conclusions avec une forme C/S qui se distingue davantage de la forme A/R que la forme Rlc, et des morphotypes hybrides plutôt proches de la forme R.

Le manque de différences entre populations observé au point de vue morphologique reflète le manque de différences entre populations au point de vue génétique. Abraham bij de Vaate a évoqué la ressemblance morphologique de notre récolte avec *C. largillietti*, retrouvée récemment en Italie et en Espagne (Lopez-Soriano *et al.*, 2018). Bien qu'il y ait effectivement une ressemblance, je n'ai pas trouvé de papier faisant une étude à la fois morphologique et génétique chez cette espèce et il est donc difficile de mettre cette observation en relation avec les données de ce mémoire. De plus, la grande plasticité phénotypique chez *Corbicula* (figure 26) rend la détermination très difficile et met en doute la validité de cette ressemblance.



Figure 26 : Photographies de quatre espèces (déterminées morphologiquement) de *Corbicula* retrouvées en Italie. Image tirée de Lopez-Soriano *et al.*, 2018.

Quand on intègre dans l'étude morphologique la lignée déterminée par les méthodes moléculaires, on observe bien une distinction entre la lignée B et le reste. Il est possible également que la lignée C/S soit distinguable des A/R et des hybrides, mais n'ayant qu'un seul individu C/S il est impossible de l'affirmer dans le cadre de ce mémoire. En revanche, on peut dire que les hybrides ne se distinguent pas morphologiquement des formes A/R même s'ils contiennent au niveau nucléaire davantage d'allèles C/S que d'allèles A/R.

Conclusion et perspectives

Les individus du genre *Corbicula* présents dans la Waal, bien qu'à l'œil nu extrêmement semblables, possèdent une diversité génétique étonnante au vu de leur mode de reproduction généralement considéré comme clonale. Tout d'abord, on retrouve dans cette population Waal des allèles appartenant à presque toutes les lignées invasives : A/R, C/S, B et même un état de caractère de Rlc. Quelques individus appartiennent clairement à la lignée B par leur génotype, et sont les seuls à se distinguer morphologiquement. Il aurait néanmoins été difficile de les identifier comme des formes B sans les techniques moléculaires. Cela souligne la nécessité de coupler l'analyse génétique à l'analyse morphologique chez *Corbicula* et d'intégrer dans l'analyse génétique les données mitochondriales et nucléaires. Cette lignée B a pu arriver en Europe depuis l'Amérique ou depuis une zone considérée comme native.

En dehors de cette lignée B, les individus de la Waal semblent pour la plupart être le résultat de parasitisme de l'œuf et d'hybridations, d'une part car les mismatches cytonucléaires sont nombreux, et d'autre part parce que le génome nucléaire est fréquemment hybride. Cette trace d'hybridation n'est pas forcément identique sur tous les marqueurs ni d'un individu à l'autre. Cela conduit à émettre les hypothèses suivantes :

1. Le phénomène de capture de gènes, lors de l'hybridation notamment, implique plusieurs lignées lors de fécondations successives.
2. Le phénomène de capture de gènes, lors de l'hybridation notamment, n'implique pas forcément la capture d'une copie complète de génome mais peut-être juste une capture partielle.
3. La spermatogenèse chez *Corbicula* permet la recombinaison chez les hybrides.

Tester ces hypothèses implique de mieux comprendre la formation des gamètes chez *Corbicula*. Il serait également judicieux pour poursuivre les recherches sur la population de la Waal de réaliser une analyse plus détaillée de la ploïdie des individus et du marquage de leur caryotype ou des analyses de génome complet.

Références

- Angelini, P., Macini, P., Finarelli, A.C., Po, C., Venturelli, C., Bellini, R., and Dottori, M. (2008). Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. *Parassitologia* 50, 97–98.
- Araujo, R., Moreno, D., and Ramos, M.A. (1993). The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. 12.
- Bayha, K.M., and Graham, W.M. (2014). Nonindigenous Marine Jellyfish: Invasiveness, Invasibility, and Impacts. In *Jellyfish Blooms*, K.A. Pitt, and C.H. Lucas, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 45–77.
- Bespalaya, Y.V., Bolotov, I.N., Aksenova, O.V., Kondakov, A.V., Gofarov, M.Yu., Laenko, T.M., Sokolova, S.E., Shevchenko, A.R., and Travina, O.V. (2018). Aliens are moving to the Arctic frontiers: an integrative approach reveals selective expansion of androgenic hybrid *Corbicula* lineages towards the North of Russia. *Biol Invasions* 20, 2227–2243.
- Britton, J.C., and Morton, B. (1986). Polymorphism in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculoidea) from North America. *Malacol. Rev* 19, 1–43.
- Burch, J. Q. (1944). CheckList of west American mollusks. Family Corbiculidae. *Minutes of the Conchological Club of Southern California*, 36:18.
- Caravaggi, A., Cuthbert, R.J., Ryan, P.G., Cooper, J., and Bond, A.L. (2019). The impacts of introduced House Mice on the breeding success of nesting seabirds on Gough Island. *Ibis* 161, 648–661.
- Cariton, J.T., and Geller, J.B. (1993). Ecological Roulette: The Global Transport of Nonindigenous Marine Organisms. *Science* 261, 78–82.
- Caut, S., Angulo, E., and Courchamp, F. (2009). Avoiding surprise effects on Surprise Island: alien species control in a multitrophic level perspective. *Biol Invasions* 11, 1689–1703.
- Choi, M.B., Martin, S.J., and Lee, J.W. (2012). Distribution, spread, and impact of the invasive hornet *Vespa velutina* in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15, 473–477.
- Crooks, J.A. (2002). Characterizing ecosystem-level consequences of biological invasions: the role of ecosystem engineers. *Oikos* 97, 153–166.
- Etoundi, E. (2011). Etude génétique et cytologique des populations de palourdes asiatiques invasives (*Corbicula* spp.). Mémoire en Biochimie et Biologie cellulaire et moléculaire. Université de Namur.
- Fournier, D., Estoup, A., Orivel, J., Foucaud, J., Jourdan, H., Breton, J.L., and Keller, L. (2005). Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature* 435, 1230–1234.
- Frankham, R. (2004). Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity* 94.

- Gallardo, B., Clavero, M., Sánchez, M.I., and Vilà, M. (2016). Global ecological impacts of invasive species in aquatic ecosystems. *Global Change Biology* 22, 151–163.
- Giribet, G., and Wheeler, W. (2002). On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* 121, 271–324.
- Gozlan, R.E. (2008). Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? *Fish and Fisheries* 9, 106–115.
- Gray, D.K., Johengen, T.H., Reid, D.F., and MacIsaac, H.J. (2007). Efficacy of open-ocean ballast water exchange as a means of preventing invertebrate invasions between freshwater ports. *Limnology and Oceanography* 52, 2386–2397.
- Haponski, A.E., and Foighil, D.Ó. (2019). Phylogenomic analyses confirm a novel invasive North American Corbicula (Bivalvia: Cyrenidae) lineage. *PeerJ* 7, e7484.
- de Haro, L., Labadie, M., Chanseau, P., Cabot, C., Blanc-Brisset, I., and Penouil, F. (2010). Medical consequences of the Asian black hornet (*Vespa velutina*) invasion in Southwestern France. *Toxicon* 55, 650–652.
- Hedtke, S.M., and Hillis, D.M. (2011). The Potential Role of Androgenesis in Cytoplasmic–Nuclear Phylogenetic Discordance. *Systematic Biology* 60, 87–96.
- Hedtke, S.M., Stanger-Hall, K., Baker, R.J., and Hillis, D.M. (2008). All-male asexuality: origin and maintenance of androgenesis in the asian clam *Corbicula*. *Evolution* 62, 1119–1136.
- Hedtke, S.M., Glaubrecht, M., and Hillis, D.M. (2011). Rare gene capture in predominantly androgenetic species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 9520–9524.
- Houki, S., Yamada, M., Honda, T., and Komaru, A. (2011). Origin and Possible Role of Males in Hermaphroditic Androgenetic *Corbicula* Clams. *Zoological Science* 28, 526–531.
- Huxel, G.R. (1999). Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation* 89, 143–152.
- Ishibashi, R., Ookubo, K., Aoki, M., Utaki, M., Komaru, A., and Kawamura, K. (2003). Androgenetic Reproduction in a Freshwater Diploid Clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Jzoo* 20, 727–732.
- Ituarte, C. F. (1981). Primera noticia de la introducción de pelecipodos asiáticos en el área Rioplatense (Mollusca, Corbiculidae). *Neotropica*, 27 (77), 79-82.
- Ituarte, C.F. (1994). *Corbicula* and *Neocorbicula* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Paraná, Uruguay and Río de La Plata basins. *Nautilus* (Philadelphia, PA) 107, 129–135.
- Kolar, C.S., and Lodge, D.M. (2001). Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 199–204.

- Komaru, A., Konishi, K., Nakayama, I., Kobayashi, T., Sakai, H., and Kawamura, K. (1997). Hermaphroditic Freshwater Clams in the Genus *Corbicula* Produce Non-Reductional Spermatozoa With Somatic DNA Content. *The Biological Bulletin* 193, 320–323.
- Komaru, A., Kawagishi, T., and Konishi, K. (1998). Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime. *Development Genes and Evolution* 208, 46–50.
- Komaru, A., Kumamoto, A., Kato, T., Ishibashi, R., Obata, M., and Nemoto, T. (2006). A Hypothesis of Ploidy Elevation by Formation of a Female Pronucleus in the Androgenetic Clam *Corbicula fluminea* in the Tone River Estuary, Japan. *Jzoo* 23, 529–532.
- Komaru, A., Houki, S., Yamada, M., Miyake, T., Obata, M., and Kawamura, K. (2012). 28S rDNA haplotypes of males are distinct from those of androgenetic hermaphrodites in the clam *Corbicula leana*. *Dev Genes Evol* 222, 181–187.
- Komaru, A., Yamada, M., and Houki, S. (2013). Relationship Between Two Androgenetic Clam Species, *Corbicula leana* and *Corbicula fluminea* , Inferred from Mitochondrial Cytochrome b and Nuclear 28S rRNA Markers. *Zoological Science* 30, 360–365.
- Komma, D.J., and Endow, S.A. (1995). Haploidy and androgenesis in *Drosophila*. *PNAS* 92, 11884–11888.
- Kovach, R.P., Muhlfeld, C.C., Boyer, M.C., Lowe, W.H., Allendorf, F.W., and Luikart, G. (2015). Dispersal and selection mediate hybridization between a native and invasive species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282, 20142454.
- Lee, T., Siripattrawan, S., Ituarte, C.F., and Foighil, D.O. (2005). Invasion of the clonal clams: *Corbicula* lineages in the New World. *AMERICAN MALACOLOGICAL BULLETIN* 10.
- Lehtonen, J., Schmidt, D.J., Heubel, K., and Kokko, H. (2013). Evolutionary and ecological implications of sexual parasitism. *Trends in Ecology & Evolution* 28, 297–306.
- Leigh, E.G.J. (1981). The average lifetime of a population in a varying environment. *Journal of Theoretical Biology* 90, 213–239.
- Leta, S., Beyene, T.J., De Clercq, E.M., Amenu, K., Kraemer, M.U.G., and Revie, C.W. (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases* 67, 25–35.
- Leuven, R.S.E.W., van der Velde, G., Baijens, I., Snijders, J., van der Zwart, C., Lenders, H.J.R., and bij de Vaate, A. (2009). The river Rhine: a global highway for dispersal of aquatic invasive species. *Biol Invasions* 11, 1989.
- Lodge, D.M. (1993). Biological invasions: Lessons for ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 8, 133–137.
- Lopez-Soriano, J., Quiñonero-Salgado, S., Cappelletti, C., Faccenda, F., and Ciutti, F. (2018). Unraveling the complexity of *Corbicula* clams invasion in Lake Garda (Italy). *Adv Ocean Limnol*.

- Malacrida, A.R., Gomulski, L.M., Bonizzoni, M., Bertin, S., Gasperi, G., and Guglielmino, C.R. (2006). Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica* 131, 1.
- Marescaux, J., Pigneur, L.-M., and Doninck, K.V. (2010). New records of *Corbicula* clams in French rivers. p.
- Mariottini, G.L., and Pane, L. (2010). Mediterranean Jellyfish Venoms: A Review on Scyphomedusae. *Marine Drugs* 8, 1122–1152.
- Masuda, O., and Uchiyama, R. (1984). PISCES Ecological Field Guide Series 2. Freshwater Mollusks of Japan 2. Including Brackish Water Species. Pisces Publishers.
- McKone, M.J., and Halpern, S.L. (2003). The Evolution of Androgenesis. *The American Naturalist* 161, 641–656.
- McMahon, R.F. (2002). Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1235–1244.
- Mouthon, J. (1981). Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) originaire d'Asie. *Basteria* 45, 109–116.
- Mouthon, J. (2000). Répartition du genre *Corbicula* Megerle von Mühlfeld (Bivalvia : Corbiculidae) en France à l'aube du XXI^e siècle. *Hydroécol. Appl.* 12, 135–146.
- Okamoto, A. (1986). Chromosomes of *Corbicula japonica*, *C. sandai* and *C. (Corbiculina)a* (Bivalvia : Corbiculidae)". *Venus (Japanese Journal of Malacology)* 45, 194–202.
- Olson, L.J. (2006). The Economics of Terrestrial Invasive Species: A Review of the Literature. *Agricultural and Resource Economics Review* 35, 178–194.
- Pascal, M., Lorvelec, O., and Vigne, J.-D. (2006). Invasions Biologiques et Extinctions : 11 000 ans d'histoire des Vertébrés en France. (Paris: Coédition Belin - Quæ), p. 350.
- Peñarrubia, L., Araguas, R.-M., Vidal, O., Pla, C., Viñas, J., and Sanz, N. (2017). Genetic characterization of the Asian clam species complex (*Corbicula*) invasion in the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia* 784, 349–365.
- Pfenninger, M., Reinhardt, F., and Streit, B. (2002). Evidence for cryptic hybridization between different evolutionary lineages of the invasive clam genus *Corbicula* (Veneroida, Bivalvia). *Journal of Evolutionary Biology* 15, 818–829.
- Pichot, C., Fady, B., and Hochu, I. (2000). Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camus embryos. *Ann. For. Sci.* 57, 17–22.
- Pigneur, L.-M., Marescaux, J., Roland, K., Etoundi, E., Descy, J.-P., and Van Doninck, K. (2011a). Phylogeny and androgenesis in the invasive *Corbicula* clams (Bivalvia, Corbiculidae) in Western Europe. *BMC Evol Biol* 11, 147.
- Pigneur, L.-M., Risterucci, A.-M., Dauchot, N., Li, X., and Doninck, K.V. (2011b). Development of novel microsatellite markers to identify the different invasive lineages in the *Corbicula* complex and to assess androgenesis. *Molecular Ecology Resources* 11, 573–577.

- Pigneur, L.-M., Hedtke, S.M., Etoundi, E., and Doninck, K.V. (2012). Androgenesis: a review through the study of the selfish shellfish *Corbicula* spp. *Heredity* 108, 581–591.
- Pigneur, L.-M., Etoundi, E., Aldridge, D.C., Marescaux, J., Yasuda, N., and Van Doninck, K. (2014). Genetic uniformity and long-distance clonal dispersal in the invasive androgenetic *Corbicula* clams. *Mol Ecol* 23, 5102–5116.
- Pyšek, P., and Richardson, D.M. (2010). Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35, 25–55.
- Pyšek, P., Jarošík, V., Hulme, P.E., Pergl, J., Hejda, M., Schaffner, U., and Vilà, M. (2012). A global assessment of invasive plant impacts on resident species, communities and ecosystems: the interaction of impact measures, invading species' traits and environment. *Global Change Biology* 18, 1725–1737.
- Qiu, A., Shi, A., and Komaru, A. (2001). Yellow and brown shell color morphs of *Corbicula fulminea* (*Bivalva* : *Corbiculidae*) from Sichuan province, China, are triploids and tetraploids. *Journal of Shellfish Research* 20, 323–328.
- Renard, E., Bachmann, V., Cariou, M.L., and Moreteau, J.C. (2000). Morphological and molecular differentiation of invasive freshwater species of the genus *Corbicula* (*Bivalvia*, *Corbiculidea*) suggest the presence of three taxa in French rivers. *Molecular Ecology* 9, 2009–2016.
- Rieger, R., Michaelis, A., and Green, M.M. (2012). Glossary of Genetics and Cytogenetics: Classical and Molecular (Springer Science & Business Media).
- Ruesink, J.L., Parker, I.M., Groom, M.J., and Kareiva, P.M. (1995). Reducing the Risks of Nonindigenous Species Introductions. *BioScience* 45, 465–477.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Iii, Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., et al. (2000). Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* 287, 1770–1774.
- Schaffner, F., Medlock, J.M., and Bortel, W.V. (2013). Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 685–692.
- Schwander, T., and Oldroyd, B.P. (2016). Androgenesis: where males hijack eggs to clone themselves. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371, 20150534.
- Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D.A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., et al. (2013). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution* 28, 58–66.
- Sousa, R., Antunes, C., and Guilhermino, L. (2008). Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 44, 85–94.
- Sousa, R., Novais, A., Costa, R., and Strayer, D.L. (2014). Invasive bivalves in fresh waters: impacts from individuals to ecosystems and possible control strategies. *Hydrobiologia* 735, 233–251.

SPN (2013). Synthèse et réflexions sur des définitions relatives aux invasions biologiques.

Tiemann, J., Haponski, A., Douglass, S., Lee, T., Cummings, K., Davis, M., and Ó Foighil, D. (2017). First record of a putative novel invasive *Corbicula* lineage discovered in the Illinois River, Illinois, USA. *BIR* 6, 159–166.

Tinti, F., and Scali, V. (1992). Genome exclusion and gametic dapi—dna content in the hybridogenetic *Bacillus rossius*—*grandii benazzii* complex (insecta phasmatodea). *Molecular Reproduction and Development* 33, 235–242.

UE (2014). RÈGLEMENT (UE) No1143/2014 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 22 octobre 2014 relatif à la prévention et à la gestion de l'introduction et de la propagation des espèces exotiques envahissantes.

Vastrade, M., Etoundi, E., Bournonville, T., Colinet, M., Debortoli, N., Hedtke, S.M., Pigneur, L.-M., Virgo, J., Flot, J.-F., Marescaux, J., et al. (In Prep). Extensive genetic mixing between worldwide-collected freshwater *Corbicula* lineages. *BioRxiv* 590836.

Vitule, J.R.S., Freire, C.A., and Simberloff, D. (2009). Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. *Fish and Fisheries* 10, 98–108.

Ward, J.M., and Ricciardi, A. (2007). Impacts of *Dreissena* invasions on benthic macroinvertebrate communities: a meta-analysis. *Diversity and Distributions* 13, 155–165.

Zhang, H., Rutherford, E.S., Mason, D.M., Wittmann, M.E., Lodge, D.M., Zhu, X., Johnson, T.B., and Tucker, A. (2019). Modeling potential impacts of three benthic invasive species on the Lake Erie food web. *Biol Invasions* 21, 1697–1719.

Zhu, B., Fitzgerald, D.G., Mayer, C.M., Rudstam, L.G., and Mills, E.L. (2006). Alteration of Ecosystem Function by Zebra Mussels in Oneida Lake: Impacts on Submerged Macrophytes. *Ecosystems* 9, 1017–1028.

Annexes

Annexe 1

Tableau Excel synthétisant les allèles retrouvés sur chaque marqueur pour chaque individu. Disponible dans un fichier séparé.

Annexe 2

Haploweb tiré de Vastrade et al, in prep (figure 2). Il représente les partages d'allèles du gène alpha-amylase entre individus de différentes forme récoltés à différents endroits du globe. Les FFR (fiels for recombinaison), ou groupes d'individus partageant un pool d'allèles uniques sont spécifiés par des couleurs différentes et annotés.

