



CONVENTION IAC - CIRAD N° 24/2005/CP

Conservation d'espèces rares - Biologie de la conservation d'espèces modèles et application à la réintroduction ou au renforcement de populations de *Captaincookia margaretae*

RAPPORT DES RECHERCHES PRÉVUES AU CONTRAT

FIN DE DEUXIÈME ANNÉE

« Conservation d'espèces rares - Biologie de la conservation d'espèces modèles et application à la réintroduction ou au renforcement de populations de *Captaincookia margaretae* »

Rapport de fin de deuxième année

1 Rappel des objectifs de l'étude

L'étude s'intègre dans l'action n°9 « Conservation d'espèces rares » du volet III « Restauration ex-situ » du Programme de Conservation Forêts Sèches de la Nouvelle-Calédonie. Les perspectives de réintroduction de plantes rares en forêt sèche nécessitent de réunir pour ces espèces une base de connaissances biologiques indispensables à la compréhension de la structure des populations résiduelles et de leurs mécanismes de reproduction et de dispersion. Le *Captaincookia margaretae* (Rubiaceae) espèce forestière rare, endémique à la Nouvelle-Calédonie, cauliflore, pouvant présenter un intérêt horticole a été choisie comme modèle d'étude. L'étude démographique, écologique et génétique de cette espèce forestière devra être réalisée en vue de bâtir une stratégie de conservation et de restauration.

2 Travaux de recherches prévus pour cette deuxième année

Pour cette deuxième année de travaux de recherches, et pour atteindre l'objectif fixé par cette convention renouvelable, il était prévu :

- un complément de récolte d'échantillons de *Captaincookia margaretae* dans la forêt sèche de Tiéa en Nouvelle Calédonie.
- une analyse écologique des échantillons récoltés et une analyse génétique par marqueurs moléculaires microsatellites au laboratoire de génétique du Cirad Forêt. Une étudiante en Master Professionnel « Génétique et Gestion de la Biodiversité » de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris a été accueillie au laboratoire en 2006.

Pour l'analyse écologique, l'échantillonnage des arbres des forêts de Nékoro et Tiéa a été accompagné de relevés phyto-sociologiques sur l'ensemble des espèces végétales avoisinantes le *Captaincookia margaretae*. A chaque prélèvement, les espèces présentes dans un rayon de 4 mètres ont été également notées. Ces données devaient être utilisées pour caractériser les assemblages floristiques des forêts de Nékoro et Tiéa, et les principaux traits écologiques du *Captaincookia margaretae*.

Pour l'analyse génétique, l'extraction de l'ADN de tous les échantillons de feuilles récoltés en Nouvelle Calédonie devait être faite. La révélation du polymorphisme avec les 11 locus microsatellites sélectionnés (mCIRCmA02, mCIRCmB10, mCIRCmB11, mCIRCmC02, mCIRCmC03, mCIRCmD02, mCIRCmD10, mCIRCmF04, mCIRCmF10, mCIRCmG06, mCIRCmH09) devait permettre, en fonction du plan d'échantillonnage, d'étudier :

- la diversité génétique au sein des agrégats. A Tiéa et à Nékoro, respectivement 14 et 7 agrégats comprenant chacun de 2 à 5 arbres ont été échantillonnés. Cet échantillonnage

permettra de définir la diversité des *Captaincookia margaretae* au sein des agrégats et de vérifier la clonalité compte tenu du marcottage probable de l'espèce.

- la structuration temporelle et spatiale de la diversité génétique de l'espèce. A Tiéa il a été possible de classer 38 arbres comme juvéniles et 52 arbres matures, il reste 16 arbres dont la maturité est indéterminée. A Nékoro, il a été possible de classer 15 arbres parmi les juvéniles et 75 arbres comme matures, il reste 2 arbres dont la maturité est indéterminée. Cet échantillonnage permettra d'analyser conjointement et séparément les deux cohortes d'arbres : les arbres juvéniles ne participant pas à la reproduction du *Captaincookia margaretae* et les arbres matures qui participent à la reproduction sexuée du *Captaincookia margaretae*. Les informations obtenues à partir de ces analyses sont nécessaires à la compréhension de la structuration de la diversité génétique du *Captaincookia margaretae* et aux propositions de gestion de la diversité de l'espèce.

3 Travaux réalisés et principaux résultats obtenus

31 Complément de récolte d'échantillons

A Tiéa, des compléments de récolte ont été faits régulièrement depuis le démarrage de la convention. Aujourd'hui, ce peuplement a été échantillonné de manière très intensive. D'autres sites ont été collectés par les chercheurs et techniciens de l'IAC (principalement Céline Chambrey et Gildas Gateblé)

Le tableau suivant donne l'ensemble des échantillons de feuilles reçues au laboratoire de l'UR 39 du Département BIOS du CIRAD.

Lieux de récolte	2005 Juillet	2005 octobre	2006	2007	TOTAL	Analyses génétique en 2006	Analyse en cours 2007
Nékoro	92	-	-	-	92	47	45
Tiéa	46	42	20	14	122	58	64
Metzdorf	6	-	-	-	6	4	2
Pindai	4	-	-	-	4	3	1
Nassirah	4	-	-	-	4	1	3
Pouembout	-	-	-	38*	38	0	38
Ouaménie	-	-	3**	-	3	0	3

*= 2 populations de *Captaincookia margaretae* à fleurs blanches, proches de Tiéa, récoltées par Gildas Gateblé en avril 2007

**= 2 arbres identifiés comme *Captaincookia sp.* et 1 *Ixora*, récoltés par Gildas Gateblé et reçu en avril 2007

Pour la commune de Pouembout nous avons donc échantillonné très fortement la population de Tiéa (qui a été échantillonnée en plusieurs passages) et quelques individus de Pindai. La particularité des fleurs blanches des 30 arbres des 2 populations de la région de Pouembout reste cependant à préciser pour la campagne 2007 car les arbres n'étaient pas en fleurs au moment du prélèvement des échantillons de feuilles.

Pour la commune de Poya, nous avons échantillonné Nékoro et Mépouiri.

32 Analyse écologique

L'analyse des relevés phyto-sociologiques des espèces végétales avoisinantes le *Captaincookia margaretae* a été réalisé par Aïchatou Assoumane Amadou pendant son stage de master pro II : Parcours Génétique et Gestion de la Biodiversité de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris (Annexe1). Les principaux résultats obtenus ne font que confirmer les connaissances acquises par tous les chercheurs et techniciens travaillant en Forêt Sèche de Nouvelle Calédonie.

Le *Captaincookia margaretae* est une espèce de forêt sèche que l'on rencontre presque exclusivement en milieu fermé et humide. En forêt sèche, cette situation n'est possible que le long des cours d'eau, même si ils sont temporaires, car le sol reste plus longtemps humide. Les relevés ont été faits autour du *Captaincookia margaretae* et dans deux sites forestiers légèrement contrastés. A Nékoro, la forêt est de type fermé et sclérophylle, à Tiéa c'est également une forêt sèche, mais elle a une tendance plus humide que celle de Nékoro.

Les principaux résultats obtenus par une analyse factorielle des correspondances sont :

- le premier axe sépare nettement les forêts de Nékoro et Tiéa, le second correspond plus ou moins à l'ouverture du milieu. La forêt de Tiéa a une composition floristique hétérogène de forêt sèche et de forêt plus humide alors que Nékoro présente moins de variance floristique et a plutôt une composition floristique essentiellement de forêt sèche. Il pourrait être intéressant de refaire ces analyses factorielles des correspondances séparément pour les forêts de Nékoro et de Tiéa.

- le *Captaincookia margaretae* est souvent associé à *Eugenia sp. 7152*; *Cupaniopsis sp*; *Diospyros erudita*; *Passiflora suberosa*; *Codiaeum peltatum*; *Homalium deplanchei*; *Wikstroemia indica*.

- certaines espèces autour du *Captaincookia margaretae* sont spécifiques à Nékoro comme par exemple (liste non exhaustive) : *Eugenia horizontalis*; *Eugenia bullata*; *Syzygium lateriflorum*; *Dichondra repens* et *Croton insularis*. A Nékoro, certaines espèces associées au *Captaincookia margaretae* caractérisent plutôt des milieux plus ouverts : *Ormocarpum orientale*; *Eugenia bullata*; *Rapanea novocaledonica*; *Carissa ovata*.

- certaines espèces rencontrées à Tiéa autour du *Captaincookia margaretae* sont plus particulièrement préférentielles des milieux fermés et humides (creeks) comme par exemple : *Mammea neurophylla*; *Archidendropsis paivana* et *Cordia dichotoma*.

33 Analyse génétique

331 Extraction d'ADN des échantillons

L'ADN de la totalité des 194 échantillons présents au laboratoire en 2006 a été extrait selon la méthode de Bousquet *et al.* (1990). Ce protocole n'a pas donné de très bon résultats puisque seulement 113 individus ont pu être utilisés pour la suite des analyses. Les feuilles de *Captaincookia margaretae* se sont montrées récalcitrantes à l'extraction d'ADN par la présence de polysaccharides et d'autres métabolites secondaires. Le protocole d'extraction qui a été utilisé produit, avec l'ADN, une substance gélatineuse (polysaccharides) qui bloque l'amplification des locus microsatellites par PCR. Pour remédier à ces inconvénients, un autre protocole de Ky *et al.* (2000) n'a été testé avec succès qu'en fin de stage. L'échantillonnage étudié étant réduit, il n'a pas été possible de tester la diversité des *Captaincookia margaretae* au sein des agrégats et de vérifier la clonalité compte tenu du marcottage probable de l'espèce. Il n'a pas été possible d'étudier la structuration temporelle par

l'analyse conjointe des arbres juvéniles ne participant pas à la reproduction du *Captaincookia margaretae* et les arbres matures qui participent à la reproduction. Ces études seront réalisées en 2007.

Les principaux résultats obtenus sur l'échantillon étudié en 2006 sont donnés en Annexe 1 ; les résultats essentiels présentés dans les chapitres 332 et 333 de ce rapport, sont tirés du rapport de stage ou issus de compléments d'analyses réalisées cette année.

332 Paramètres de la diversité et de la différenciation génétique

La valeur de l'indice de fixation F_{is} de Wright (1965) est positive et significativement différente de 0 à Nékoro ($F_{is} \approx 0.11$) et Tiéa ($F_{is} \approx 0.13$). Ce résultat traduit un déficit en hétérozygotes dans ces deux populations. Ce déficit en hétérozygotes peut avoir plusieurs explications :

- la présence d'allèles nuls, ceux sont des allèles qui n'amplifient pas à cause d'une mutation dans le site de fixation de l'amorce. L'allèle ne peut pas être amplifié et l'individu étudié est alors considéré comme un homozygote, alors qu'il est hétérozygote.
- l'effet Wahlund. Cet effet se produit lorsqu'il existe une structuration de la population étudiée en sous-population. En effet, si l'on mélange des sous-populations panmictiques dont les fréquences alléliques sont différentes entre les sous-populations, alors on observe un déficit en hétérozygotes par rapport à la structure de Hardy Weinberg.
- L'autofécondation ou le croisement entre apparentés des *Captaincookia margaretae* peut entraîner un déficit en hétérozygotes. Il y a également la possibilité d'une forme d'autofécondation indirecte par l'action du drageonnage qui est probable chez cette espèce.

Compte tenu des effectifs étudiés à Nékoro (47) et à Tiéa (57), le nombre moyen d'allèles par locus microsatellite semble être supérieur à Nékoro ($N_a = 9.3$) qu'à Tiéa ($N_a = 8.8$). Les taux d'hétérozygotie observée sont inférieurs à ceux attendus sous l'équilibre de Hardy-Weinberg à Nékoro ($H_o = 0.60 < H_e = 0.71$) et à Tiéa ($H_o = 0.63 < H_e = 0.74$). Ces paramètres (N_a , H_o et H_e) semblent faire apparaître une forte diversité génétique, il ne faut cependant pas oublier qu'ils sont obtenus à partir de marqueurs moléculaires microsatellites volontairement choisis pour leur grande variabilité.

Les calculs de F_{st} montrent qu'il existe une faible différenciation entre les peuplements de Tiéa et de Nékoro (F_{st} global = 0.06). Cette dernière valeur laissant supposer qu'il existe peu de différences entre les peuplements de Nékoro et Tiéa, nous avons utilisé un calcul de distances génétiques individuelles avec le logiciel MSA (Dieringer et Schlötterer, 2003) pour représenter graphiquement les différences entre les *Captaincookia margaretae* (figure 1). La distance D_c de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) a été utilisée car elle a été décrite comme la plus performante pour des populations peu éloignées (Goldstein et Pollock, 1997 ; Takezaki et Nei, 1996).

Le dendrogramme met clairement en évidence la différence qui existe entre le peuplement de Tiéa (bleu) et Nékoro (jaune), même si 10 arbres de Nékoro ressemblent beaucoup à ceux de Tiéa. Une seule origine de Tiéa ressemble plus aux arbres de Nékoro. Ces variations individuelles peuvent expliquer les faibles valeurs de F_{st} qui par ailleurs traduisent un flux de gènes possible entre la forêt de Nékoro et celle de Tiéa.

Les échantillons de Metzdorf et Pindai ressemblent beaucoup aux arbres de la forêt de Nékoro. L'échantillon de Nassirah est plus proche de la forêt de Tiéa.

Il faut également remarqué que la population de Metzdorf associée à 9 arbres de la forêt de Nékoro semble former une sous-population différente des autres échantillons.

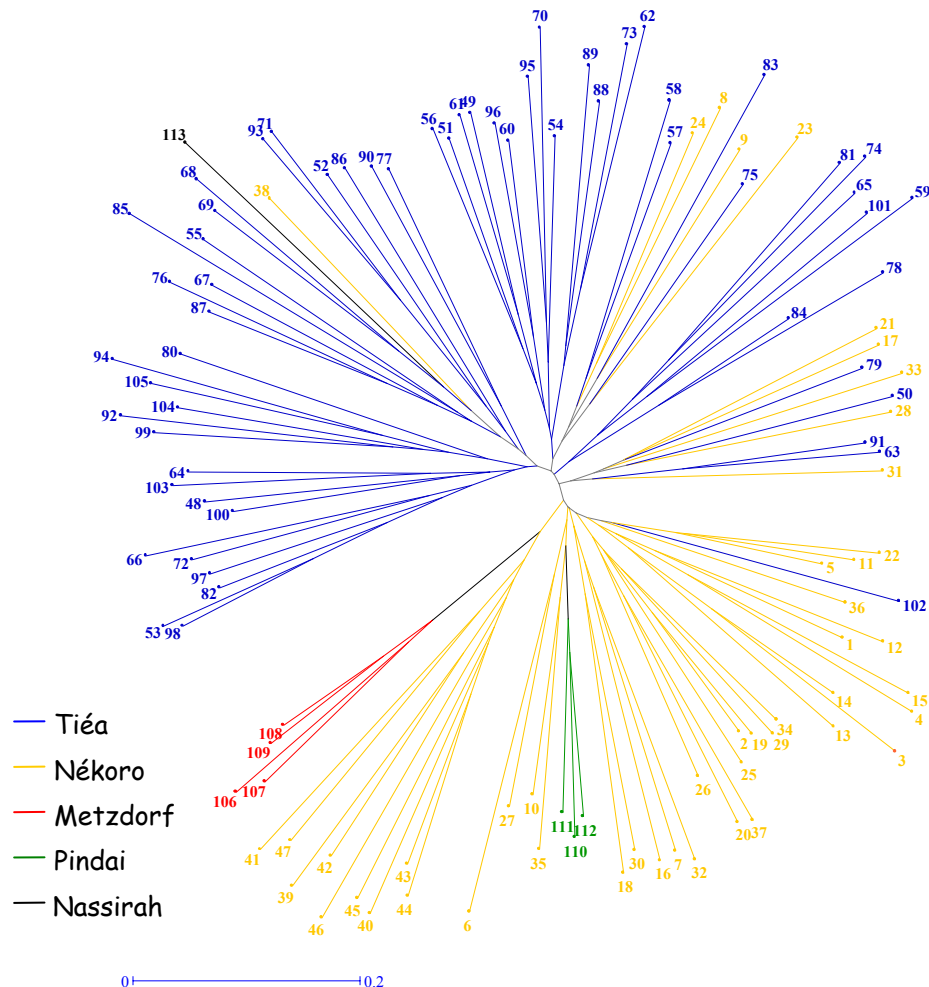


Figure 1 : Dendrogramme des distances individuelles de Cavalli-Sforza et Edwards sur les 113 individus de *Captaincookia margaretae* par la méthode des scores de Darwin (Perrier et Jacquemoud-Collet 2006)

333 Analyse de la structuration spatiale de la diversité génétique

Trois logiciels ont été utilisés pour étudier la structuration spatiale de la diversité génétique du *Captaincookia margaretae*.

Avec le logiciel Spagedi 1.2d (Hardy et Vekemans, 2002), l'analyse de la spatialisation de l'apparementement semble mettre en évidence une plus forte ressemblance des arbres dans un rayon de 20 m autour des arbres étudiés à Nékoro pour l'indice de double parenté. A Tiéa les plus fortes valeurs de ressemblance sont également observées dans un rayon de 20 m autour des arbres étudiés mais pour l'indice de simple parenté (voir Annexe 1). Ces résultats seront à nouveau analysés en 2007 avec l'ensemble des échantillons.

Pour compléter les analyses données en Annexe 1, le logiciel Structure 2.2 (Pritchard *et al.* 2000) a été utilisé pour déterminer le nombre de populations existant dans l'échantillon 2006 de 113 individus. Les résultats sont présentés dans la figure n°2.

Le logiciel définit 3 populations différentes dans notre échantillon de 113 individus et affecte chaque individu à une des 3 populations en définissant la proportion de chaque sous-population dans le génome étudié :

- 1 : Il existerait 2 sous-populations différentes à Nékoro. La première concerne la grosse majorité des individus (38) situés à l'Ouest auxquels viennent s'ajouter les 3 échantillons de Pindai. La seconde sous-population de Nékoro est composée de 8 individus situés à l'Est (identifiant n° : 39 ; 40 ; 41 ; 42 ; 44 ; 45 ; 46 ; 47) du peuplement auxquels viennent s'ajouter les 4 échantillons de Metzdorf (identifiant n° : 106 ; 107 ; 108 ; 109). Il faut remarquer que l'échantillon n°43 se retrouve dans la deuxième sous-population avec les distances génétiques de Cavalli-Sforza et Edwards et que le logiciel Structure trouve seulement 15% du génome de cet échantillon commun avec cette deuxième sous-population.
- 2 : Les échantillons de la forêt de Tiéa constituent la troisième sous-population auxquels viennent s'ajouter l'échantillon de Nassirah (identifiant n° : 113).

NB : dans le dendrogramme des distances individuelles, une majorité (70%) des échantillons de Nékoro qui étaient positionnés dans la population de Tiéa par la méthode des distances génétiques Dc de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) montre avec le logiciel structure qu'une proportion non négligeable de leur génome appartient à d'autres populations. C'est le cas des échantillons n° : 43 ; 38 ; 21 ; 17 ; 8 ; 31 ; 28 ; 23 ; 102.

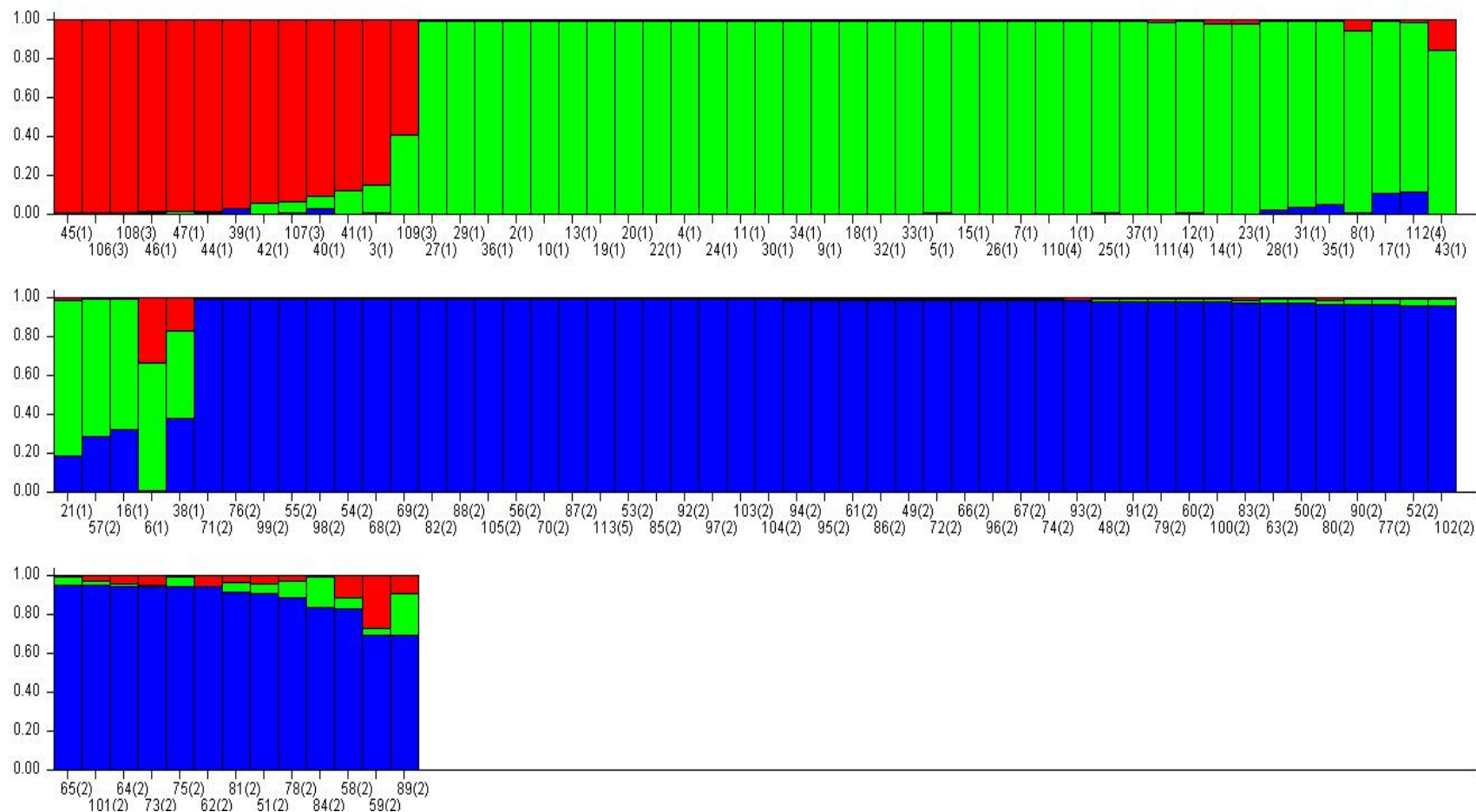


Figure 2 : Assignment des 113 arbres étudiés à K = 3 populations avec le logiciel Structure : (i) Nékoro (1) et Metzdorf (3) rouge, (ii) Nékoro (1) et Pindai (4) verte, (iii) Tiéa (2) et Nassirah (5) bleue en utilisant le modèle où chaque individu analysé peut posséder des ancêtres communs et donc avoir une proportion de son génome issue des K populations. Le modèle a été obtenu après 750000 itérations. Les résultats sont identiques en choisissant un modèle où chaque individu provient d'une des K populations.

Enfin le logiciel Geneland 2.0.0 (Guillot *et al.* 2005) a été utilisé pour analyser et prendre en compte l'information génétique avec les marqueurs moléculaires et l'information spatiale des échantillons les uns par rapport aux autres. A Nékoro, l'analyse confirme la sous-structure révélée par la méthode des distances génétiques et par le logiciel Structure. Les figures 3 et 4 présentent les deux sous populations de Nékoro.

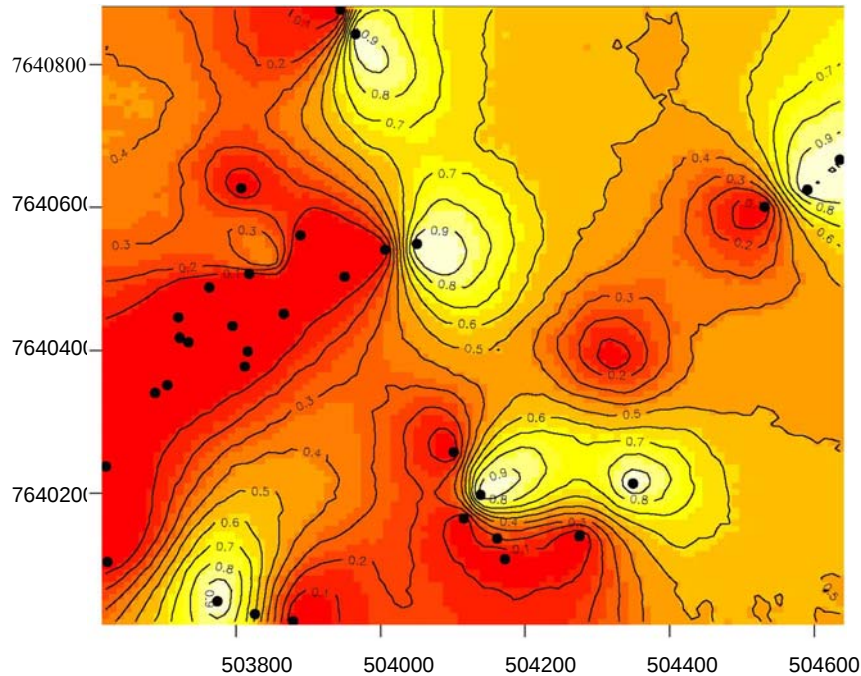


Figure 3 : Carte de répartition des échantillons associée aux probabilités d'appartenir à la sous-population n°2 (probabilité supérieure à 0.9 en blanc). Effet génotype et effet spatial associés selon un algorithme MCMC (Monte Carlo Markov Chain) avec 800000 itérations.

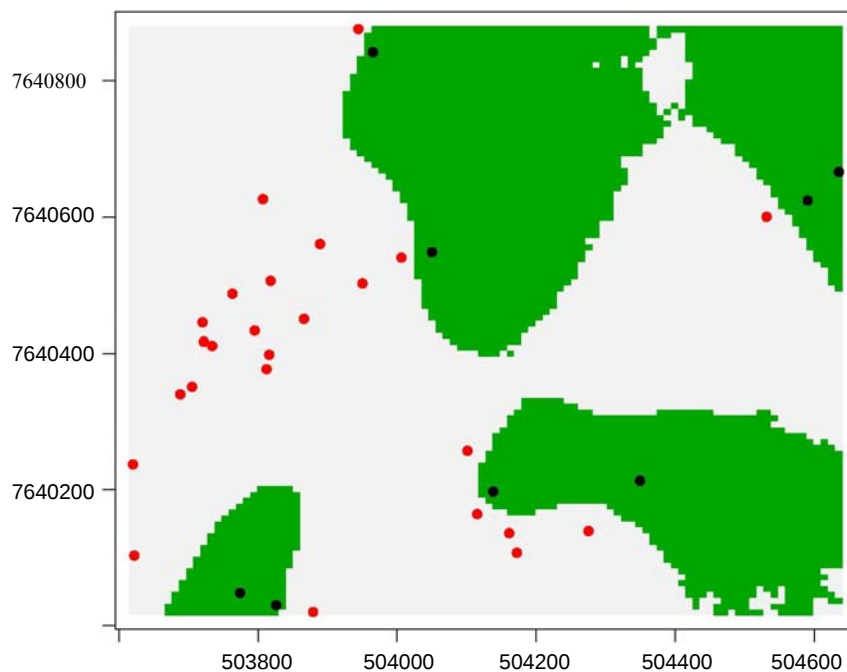


Figure 4 : Carte de limite des 2 sous-populations de *Captaincookkia margaretae* de Nékoro après analyse selon un algorithme MCMC (Monte Carlo Markov Chain) avec 800000 itérations.

L'individu identifié sous le n° : 43 (il se situe à une longitude de 503826 et une latitude de 7640030) a une probabilité voisine de 0.6 d'appartenir à la sous-population n°2. Pour Geneland et pour les distances génétiques de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) cet arbre fait donc parti de la sous-population n°2. Par contre, le logiciel Structure ne trouve qu'environ 15% du génome de cet individu n°43 commun à cette sous-population n°2.

4 Conclusions Discussions

Pour améliorer la qualité de l'ADN extrait à partir des feuilles séchées de *Captaincookia margaretae*, un nouveau protocole d'extraction d'ADN spécifique aux Rubiacées a été testé avec succès en 2006 (Annexe 2). Il permettra de compléter l'échantillonnage et étudier l'ensemble des arbres récoltés en Nouvelle Calédonie.

Avec le sous-échantillon de 113 arbres de *Captaincookia margaretae* analysé, les différentes méthodes d'analyses font apparaître un taux d'hétérozygotie et un nombre d'allèles par locus assez élevés. Ces paramètres génétiques sont supérieurs à ceux trouvés avec le *Santalum austrocaledonicum* qui est une espèce moins menacée. Le maintien d'une telle diversité génétique, malgré la réduction des effectifs peut s'expliquer par un taux élevé de régénération par reproduction sexuée et un effectif efficace suffisant pour maintenir cette diversité. Cependant la reproduction sexuée semble fortement perturbée par l'action des rats qui consomment l'ensemble des fruits mûrs et des chevreuils (à Nékoro, mais pas à Tiéa) qui broutent les jeunes plants. Dans ce cas, la diversité observée pourrait être simplement l'image d'une diversité génétique historiquement très élevée qui s'érode progressivement en fonction des différentes disparitions des individus de l'espèce. Les études de démographie de l'espèce permettront de vérifier ces hypothèses.

Les indices de fixation indiquent un déficit en hétérozygotes par rapport aux résultats attendus sous les hypothèses de Hardy Weinberg. Ce résultat peut trouver une explication par l'existence soit d'allèles nuls (probable avec les microsatellites et certain locus utilisés), soit d'une sous-structure (probable à Nékoro), soit d'un régime de reproduction favorisant le croisement entre apparentés (probable dans un rayon de 20 m).

Les différents paramètres d'analyse de la structuration spatiale du *Captaincookia margaretae* montrent que les arbres ne sont pas apparentés au-delà de 20 mètres autour de l'arbre et qu'il existe une faible structuration génétique entre les peuplements de Nékoro et Tiéa. L'analyse montre qu'il existe 3 sous-populations dans l'échantillon de 113 individus. Le peuplement de Nékoro révèle clairement 2 sous-populations. La forêt de Tiéa semble plus homogène, même si il est possible de révéler une sous-structure avec Geneland (Annexe 1, mais ce résultat devra être confirmé). Ces sous-structures peuvent, en partie, expliquer le déficit en hétérozygotes observé dans ces deux peuplements.

Dans différentes études, la faible structure spatiale a été expliquée soit par une dispersion limitée des graines et un important flux de gènes, soit pour des espèces qui ont pour pollinisateurs des insectes et qui dispersent leurs graines par des oiseaux, soit pour des espèces qui ont des flux de gène extensifs, une large dispersion des graines, une auto-incompatibilité et par le comportement des agents de dispersion. Pour *Captaincookia margaretae*, l'hypothèse de pollinisation par au moins 4 espèces d'oiseaux de la famille des *Melliphagidae* reste à vérifier. D'autre part, la dispersion des graines par le flux de l'eau le long des creeks sur plusieurs centaines de mètres pourrait expliquer cette faible structure spatiale. Ces hypothèses restent à vérifier sur un échantillon plus grand, car les analyses réalisées sont sensibles à l'effectif qui restait faible à Nékoro et Tiéa.

Il ne faut pas considérer les conclusions du rapport d'Aïchatou Assoumane Amadou, notamment le chapitre implications pour la gestion et la conservation (Annexe 1), comme définitives car d'une part l'échantillon analysé était incomplet et d'autre part des analyses plus fines montrent bien qu'il existe deux sous populations différentes à Nékoro et que les peuplements de Pindai et Nékoro se rattachent soit à l'une soit à l'autre. Pour préciser ce qu'a écrit Aïchatou Assoumane Amadou, l'enrichissement des forêts de Pindai et Metzdorf pourrait effectivement se faire à partir de la forêt de Nékoro, mais il faudra respecter les sous-populations présentes. En effet la forêt de Pindai apparait proche de la sous-population n°1 alors que la forêt Metzdorf est plus proche de la sous-population n°2.

En 2007, les résultats seront affinés avec la totalité de l'échantillon qui sera enrichi des nouvelles récoltes. Ils permettront de vérifier un certain nombre de résultats obtenus avec ce sous-échantillon et les hypothèses de diversité génétique au sein des agrégats et d'étudier la structuration temporelle du *Captaincookia margaretae*.

Références bibliographiques

Bousquet J., Simon L., Lalonde M. (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forestry Research* **20** : 254-257.

Cavalli-Sforza L.L. and Edwards A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**: 233-257.

Dieringer D. and Schlötterer C. (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* **3** :167-169.

Goldstein D.B. and Pollock D.D. (1997) A review of mutation processes and method of phylogenetic inference. *The Journal of Heredity* **88(5)**:335-342.

Guillot G., Mortier F., Estoup A. (2005) Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* **5** : 712-715.

Hardy O.J. and Vekemans X. (2002) SPAGeDi : a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**: 618-620.

Ky C.L., Barre P., Lorieux M., Trouslot P., Akaffou S., Louarn J., Charrier A., Hamon S., Noirot M. (2000) Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.) *Theoretical and Applied Genetics* **101(4)** : 669-676.

Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. (2006) DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>.

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155** : 945-959.

Takezaki N. and Nei M. (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* **144**:389-399.

Wright S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19** :395-420.



ETUDE GENETIQUE ET ECOLOGIQUE D'UNE ESPECE MENACEE DE FORET SECHE EN NOUVELLE-CALEDONIE : *Captaincookia margaretae*

IMPLICATIONS POUR SA CONSERVATION



MEMOIRE DE STAGE MASTER PROFESSIONNEL GENETIQUE ET GESTION DE LA BIODIVERSITE

Responsable de stage :
Daniel Verhaegen

Aïchatou Assoumane Amadou

Septembre 2006

Résumé

Cette étude comporte deux volets : l'étude de la diversité et de la structure génétiques de *Captaincookia margaretae*, une espèce endémique de la forêt sèche en Nouvelle-Calédonie, et l'étude floristique des forêts sclérophylles de Nékoro et Tiéa, les deux principaux sites d'échantillonnage de *Captaincookia margaretae*. La forêt sèche est menacée de disparition en Nouvelle-Calédonie où elle est réduite aujourd'hui à environ 2 % de sa surface d'origine. Le *C. margaretae* est une des espèces phares sur lesquelles portent des études en vue de la conservation de cet écosystème. L'analyse moléculaire à l'aide de 11 marqueurs microsatellites nucléaires a révélé une grande diversité génétique et une faible différenciation entre les populations. Ces résultats mettent en évidence un important flux de gène et une bonne dispersion par les graines. L'analyse écologique a révélé que le *Captaincookia margaretae* est une espèce qui est affine des milieux humide et fermé de la forêt sèche. Cette analyse a aussi révélé que la forêt de Tiéa a une composition floristique hétérogène de forêt sèche et de forêt humide et que la forêt de Nékoro a une composition floristique de forêt sèche.

La combinaison de ces résultats nous a permis de proposer des stratégies de conservation de l'espèce *Captaincookia margaretae* en forêt sclérophylle.

Mots Clés : conservation, diversité génétique, microsatellites nucléaires, *Captaincookia margaretae*, forêt sèche, étude floristique, structure génétique.

Abstract

This study comprises (1) the study of the diversity and the genetic structure of *Captaincookia margaretae*, plant specie commonly found in the dry forest of New Caledonia, (2) the study of the floral composition in the dry forests of Nékoro and Tiéa, the two main sampling sites for *Captaincookia margaretae*. The dry forest is threatened to disappear in New Caledonia. Today it is reduced to about 2% of its original surface size. *C. margaretae* is one of the principal species to which relate the studies attempting to conserve this ecosystem. The molecular analysis using 11 nuclear microsatellites markers revealed a wide genetic diversity and slight difference between the populations. These results highlight an important gene flow and a good dispersion by seeds. The ecological analysis indicates that *Captaincookia margaretae*, is a specie which has a great affinity to medium wet and closed dry forest. This analysis revealed that the forest of Tiéa has a heterogeneous floristic composition of dry forest and of wet forest than the forest of Nékoro which has a unique floristic composition of dry forest.

The combination of these results enabled us to propose strategies of conservation of the species *Captaincookia margaretae* in sclerophyllous forest

Key Words: Conservation, Genetic diversity, nuclear microsatellites, *Captaincookia margaretae*, Dry forest, Floristic study, Genetic structure.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement le responsable de ce projet Daniel Verhaegen de m'avoir encadrer lors de ce stage.

Un grand merci à Jean-Marc Bouvet, responsable de l'UPR 39 (Diversité génétique et Amélioration des espèces forestière) et à Jack Tassin pour leurs conseils et leurs disponibilités.

Merci à Bénédicte Favreau du laboratoire de génétique forestière pour son aide, sa bonne humeur et sa disponibilité.

Merci également à toutes les personnes qui m'ont entouré durant ce stage, pour leur soutien et leur bonne humeur : Zenor, François, Franck, Phillippe, Roselyne, Christelle et Alexandre.

En fin merci infiniment à mes parents, mes sœurs et frère, pour leur soutien moral à tout moment.

TABLE DES MATIERES

I – INTRODUCTION	3
II- CARACTERISTIQUES ETY DISTRIBUTION DE CAPTAINCOOKIA MARGARETAE ...	5
II.1- Description générale	5
II.2- Vulnérabilité de la forêt sèche néo-calédonienne et menaces exposant le <i>Captaincookia margaretae</i> à l’extinction.....	6
III- MATERIELS ET METHODES	10
III. 1- Matériel biologique.....	10
III.2 – Analyse moléculaire par microsatellites nucléaires.....	11
III.2.1 – Extraction de l’ADN.....	11
III.2.2 – Mise au point des amorces microsatellites nucléaires et amplification.....	11
III.3 – Analyses des données	12
III.3.1 – Analyse de la diversité et de la différenciation génétique.....	12
III.3.2 – Analyse de la structuration spatiale de la diversité génétique	14
III.3.3 – Analyse des données écologiques.....	15
IV – RESULTATS	16
IV.1 – Analyse de la diversité génétique	16
IV.2 – Analyse de la structuration spatiale de la diversité génétique	19
IV.2.1 – Spatialisation de l’apparentement	19
IV.3 – Répartition spatiale des géotypes.....	20
IV. 4 – Analyse des données écologiques.....	27
V – DISCUSSION	31
V.1 – La variabilité génétique à l’intérieur et entre les populations	31
V.2 – Spatialisation de la diversité génétique.....	33
V.2.1 – Spatialisation de l’apparentement.....	33
V.2.2 – Répartition spatiale des populations	34
V.3 – Analyse écologique.....	35
V.5 – Implications pour la gestion et la conservation.....	35
VI – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	37
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	38
ANNEXES.....	40

I – Introduction

Les forêts sèches constituent dans le monde l'écosystème terrestre tropical le plus menacé [5]. La Nouvelle-Calédonie qui est une île de la Mélanésie à l'ouest du Pacifique Sud détient une partie de ce patrimoine exceptionnel ; les forêts sèches se situent sur la côte Ouest et s'étendent du littoral jusqu'à 300m à 400m d'altitude, très souvent sur roches sédimentaires et plus rarement sur roches basaltiques.

Au sein de la végétation néo-calédonienne, mondialement reconnue pour l'exceptionnelle biodiversité qu'elle rassemble, la forêt sèche demeure aujourd'hui la formation végétale la plus directement menacée de disparition (figure 1). Il ne se trouve plus, à nos jours, en Nouvelle-Calédonie de forêts sèches intactes, telles qu'elles pouvaient exister il y a environ 4000 ans, à l'arrivée de l'homme sur la grande terre. A cette époque, la forêt sèche occupait 25% du territoire alors que maintenant elle occupe 0,2%.

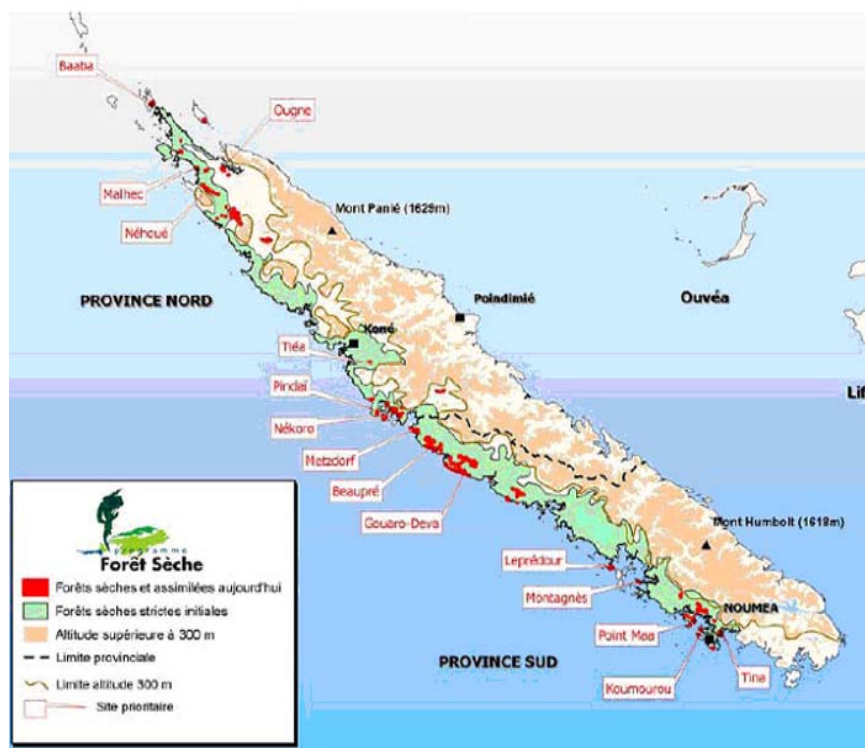


Figure 1 : carte de la Nouvelle-Calédonie représentant la régression de la forêt sèche

La réduction et la fragmentation des habitats de la forêt sèche entraînent la réduction du nombre de populations, ainsi que celle du nombre d'individus par population, pour les espèces les plus originales. De ce fait la diversité floristique et très probablement la biodiversité tout entière de la forêt sèche sont en péril alors que des espèces uniques au monde y sont représentées à l'état naturel. Cette situation reconnue depuis plusieurs années, a justifié dès 1987 les premières recherches ciblées sur ces forêts par l'ORSTOM

(actuel IRD), puis le lancement en 2001 d'un programme collectif "Forêt Sèche", ayant pour objectif le sauvetage et la régénération de l'écosystème Forêt sèche de Nouvelle-Calédonie. L'objectif global de ce programme est de conserver durablement les forêts sèches de Nouvelle-Calédonie à l'intérieur mais surtout hors des aires protégées, pour le bénéfice de tous. Cet objectif passe par l'élaboration d'un plan d'action répondant d'une part aux problématiques locales de conservation, et d'autre part à la gestion durable des ressources naturelles contribuant au développement socio-économique des communautés néo-calédoniennes.

Compte tenu de la situation de la forêt sclérophylle, le programme propose différents niveaux d'intervention sur cet écosystème, notamment sur les espèces phares. La stratégie d'intervention choisie repose sur l'amélioration des connaissances. Le bon déroulement de ce programme dans les années à venir ne peut s'envisager que si les phases expérimentales proposent des résultats concrets applicables à grande échelle.

Parmi les différentes espèces étudiées à travers ce programme, le *Captaincookia margaretae* ([FLORE](#)>[Tracheophytes](#)>[Angiospermes](#)>[Dicotyledones](#)>[Rubiaceae](#)>[Captaincookia](#)>) a été retenue pour son intérêt biologique, écologique et patrimonial. L'espèce présente des caractères très archaïques.

L'étude démographique, écologique, biologique et génétique du *Captaincookia margaretae* permettra de mieux comprendre le statut de cette espèce forestière rare, menacé d'extinction. Les résultats acquis permettront de définir des mesures de protection et de bâtir une stratégie de conservation et de restauration d'une espèce de forêt sèche. Ces premiers résultats permettront de mieux comprendre le mode de fonctionnement de la forêt sèche de Nouvelle-Calédonie.

Compte tenu de leur taux de mutations élevé et leur hérédité biparentale, les marqueurs microsatellites nucléaires ont été utilisés pour évaluer le mode de reproduction de l'espèce, la diversité génétique et les flux de gènes au sein et entre les populations. D'autre part, enfin de décrire la typologie des principales composantes écologiques de *Captaincookia margaretae* et des forêts de Nékoro et Tiéa (les 2 principaux sites d'échantillonnage), nous avons analysé l'ensemble des données écologiques récoltées dans ces lieux d'échantillonnage depuis mars 2004. En combinant les résultats de ces études, et après avoir fait un bilan des menaces auxquelles l'espèce est exposée, nous proposerons des recommandations pour la conservation, la gestion et la valorisation de la biodiversité en forêt sèche appréhendée au travers d'une espèce comme *Captaincookia margaretae*.

II- Caractéristiques et distribution de *Captaincookia margaretæ*

II.1- Description générale

Captaincookia margaretæ est la seule espèce du genre monotypique *Captaincookia*. C'est une espèce endémique de la Nouvelle Calédonie qui est très rare ; elle n'est connue que des communes de Poya et Pouembout. Découvert dans les années 1971 par H. S. MacKee (récolteur pour le Muséum d'histoire Naturelle de Paris), son nom lui a été donné en honneur du Capitaine James Cook (qui a découvert la Nouvelle-Calédonie) et de Madame Margareth Mackee qui travaillait toujours avec son mari. [1]

L'arbre est soit monocaule, soit très peu ramifié. Le tronc, bien droit, peut mesurer 7 à 8 m. de haut, mais le plus souvent entre 3 et 4 m. Le diamètre du tronc est de 10 à 25 cm. L'écorce est presque noire et sa surface est peu rugueuse. L'architecture de cette espèce est conforme au Modèle de Corner; des répétitions peuvent apparaître [2].

Les feuilles sont disposées à l'extrémité du tronc en bouquet de grandes feuilles verticillées par 3 ou 4 sur de courts entre-nœuds. Elles sont très grandes (30 à 40 cm de long) de couleur vert foncé dessus et vert clair dessous. La nervure médiane est jaune claire. Les feuilles sont bien lisses, épaisses et dures.

Les fleurs sont de belles clochettes rouge carmin ou fuchsia. Elles poussent directement sur le tronc. Elles mesurent 5 cm de long et 1,5 cm de large. Les étamines et le pistil sont jaune foncés et dépassent largement de la fleur. Avant son ouverture, la fleur ressemble à un piment. La floraison, abondante, a lieu de juillet à octobre [1]. Toutes les fleurs épanouies sont fendues sur 2-3 cm dans la partie moyenne et du côté le plus accessible du tube de la corolle. On peut supposer qu'au moment de l'anthèse se manifeste la visite d'un oiseau *Melliphagidae*. Des 6 espèces calédoniennes de cette famille, 4 au moins pourraient éventuellement être concernées [2].

Les fruits mesurent 8 mm de long. Ils sont mous et de couleur rouge foncé lorsqu'ils sont murs.

Les graines germent facilement, mais l'arbre pousse lentement. Des pieds d'âges variés permettaient de constater que la reproduction par graine était bonne *in situ*. Le biotope est une relique forestière de plaine basse, altitude 30 m, sur argile noire profonde sans apport serpentiniteux. [2] Le *Captaincookia* fait partie de l'étage inférieur de la forêt et ne pousse jamais sur des terrains en pente ; il est restreint aux zones les plus humides de la forêt sèche. [1]

II.2- Vulnérabilité de la forêt sèche néo-calédonienne et menaces exposant le *Captaincookia margaretae* à l'extinction

Les termes de forêt sèche (ou sclérophylle) de Nouvelle-Calédonie sont donnés à l'ensemble des formations forestières :

- . Se développant dans un climat sec et lumineux recevant moins de 1100 mm de pluie par an, en comparaison des 2500 mm sur le reste de la grande terre ; ces forêts sèches sont soumises aux alizés desséchants et à une saison sèche pendant 6 mois de l'année (Jaffré, 2003).
- . Croissant très souvent sur roches sédimentaires, et plus rarement sur roches basaltiques.
- . A la strate supérieure formée d'un couvert discontinu dont la taille n'excède pas 15 m de hauteur ; le sous-bois est dense, formé d'arbustes et de nombreuses lianes, la strate herbacée est composée de graminées et de quelques fougères éparses. Ceci a pour conséquence de rendre l'accès difficile.
- . Dont un grand nombre de plantes est caractérisé par des feuilles raides, coriaces, vernissées, à cuticule épaisse et à limbe souvent réduit ; ce caractère leur permet de supporter le déficit hydrique durant la longue saison sèche.
- . Ne comportant ni palmier ni conifères, 2 à 3 espèces d'orchidées au maximum, une espèce de fougère, très peu de représentants de familles ayant conservé des caractères archaïques dans les plantes présentes
- . Il s'agit aussi d'un milieu fragile et morcelé en 106 sites en Nouvelle-Calédonie de 1 à 100 hectares.
- . d'un réservoir de plantes à vocation horticole.
- . un refuge de faune variée. [3]

D'origine relativement récente, la forêt sèche apparaît constituée majoritairement d'apports floristiques de la fin du Tertiaire et Quaternaire, venus se superposer à quelques rares éléments anciens antéocènes ayant survécu au recouvrement péridotitique généralisé de la Nouvelle-Calédonie. [4]

D'après l'analyse géographique des genres de la forêt sèche, il y a des ressemblances entre la flore australienne et la flore de forêt sèche néo-calédonienne, qui par ce caractère ne se différencie pas des autres flores de l'ensemble de la Nouvelle-Calédonie, mais qui par contre s'en distingue par l'absence de nombreux éléments floristiques d'origine gondwanienne (Gymnospermes, Balanopaceae, Cunoniaceae, Proteaceae, Winteraceae) [3].

Bien qu'elle n'occupe plus que quelques dizaines de km², pour une surface initiale estimée à 4000-4500 km² (Bouchet et al. 1995) la forêt sèche de Nouvelle-Calédonie contient encore environ 435 espèces et une quinzaine de variétés, de plantes vasculaires (plantes à fleurs et fougères) autochtones. [3]

Plusieurs de ces espèces ont des floraisons spectaculaires, tels que le "*Captaincookia*" ([*Captaincookia margaretae*](#)), le "volubilis de Tiéa" ([*Turbina inopinata*](#)), ou encore l'[*Oxera sulfurea*](#), à floraison massive de couleur jaune soufre. Parmi les espèces caractéristiques de cette forêt se trouve aussi l'unique "riz calédonien" ([*Oryza neocaledonica*](#)), le "badamier de Poya" ([*Terminalia cherrieri*](#)), 9 espèces du genre [*Diospyros*](#) ("faux ébènes"), dont le remarquable [*Diospyros veillonii*](#) de Gadgi (Paita), 7 espèces du genre [*Pittosporum*](#), dont le très rare [*Pittosporum tanianum*](#) de l'Ilot Leprédour (ou Ilot Tania) ou encore [*P. Brevispinum*](#) de Tiéa (Pouembout). Par rapport à la flore totale de l'archipel certaines familles sont surreprésentées c'est notamment le cas des [*Euphorbiaceae*](#) (incluant le seul représentant du genre [*Trigonostemon*](#) en Nouvelle-Calédonie), [*Myrtaceae*](#), [*Sapindaceae*](#) et [*Rutaceae*](#). [1]

Les reliques de forêt sèche, se rencontrent aujourd'hui le plus souvent sous une forme plus ou moins dégradée, donnant des faciès diversement ouverts. [1]

Etant donné que les plantes et les arbres de la forêt sèche sont soumis à des conditions de vie extrêmement dures, ils ont développé des prodiges d'adaptations aussi variés qu'astucieux pour survivre au manque d'eau ; et d'adaptation en adaptation, les végétaux participent à un écosystème dont l'équilibre reste fragile. La raréfaction de ce milieu déjà fragile est due à plusieurs facteurs. En dehors des cyclones et des dépressions tropicales, tous les dommages sont d'origine humaine. En effet l'installation puis l'augmentation des troupeaux a demandé beaucoup de nouveaux espaces obtenus par un défrichage conséquent de la forêt sèche et d'autres formations végétales souvent considérées comme de la brousse. La réforme foncière a participé à la redistribution des terres en amoindrissant les surfaces des exploitations et, de ce fait, a augmenté le nombre d'agriculteurs et de bétail.

Les cerfs et les lapins qui ont été introduits vont dans le sens des bovins en broutant les jeunes plantes, détruisant progressivement la forêt.

L'existence de feux de brousse d'origines diverses amplifie la diminution de la surface de la forêt sèche. Malgré la mise en place des moyens de lutte et de campagne de sensibilisation, des milliers d'hectares brûlent encore chaque année, notamment sur la côte Ouest et le Nord calédonien. Les forêts sèches peu arrosées et enclavées au milieu de savane et de maquis très combustibles, sont des zones sensibles aux feux de brousse. [3]

L'introduction d'espèces invasives en Nouvelle-Calédonie comme *Leucaena leucocephala* ("faux mimosa"), *Acacia farnesiana* ("cassia"), graminées diverses, ou autochtones expansives : [*Casuarina collina*](#) ("bois de fer"), [*Acacia spirorbis*](#) ("gaïac"), [*Malaisia scandens*](#) ("liane feu") etc, peut avoir des conséquences désastreuses sur tout le système, en effet par leur prolifération, les espèces allochtones deviennent des prédateurs, des compétiteurs et des parasites, laissant peu de chances à la régénération naturelle des espèces de la forêt initiale (Jaffré et al.2001).

Les forêts sèches jouent un rôle important pour la protection des sols et le maintien des nappes phréatiques. La disparition de la forêt sèche peut avoir comme conséquences : l'extinction définitive d'espèces, l'appauvrissement des sols, l'accentuation de l'érosion, le changement du régime hydrique et du paysage de la côte ouest. Compte tenu de la diversité botanique et du micro endémisme qui caractérisent la forêt sèche, un seul hectare détruit peut entraîner la perte définitive d'une espèce unique au monde [4]. 57% des espèces présentes en forêt sèche sont endémiques de la Nouvelle-Calédonie et 60 d'entre elles dont le *Captaincookia margaretae*, sont de surcroît cantonnées à cette forêt. (Jaffré et al. 2002), ce qui revient à dire que si la forêt sèche disparaissait totalement en Nouvelle-Calédonie, c'est 60 espèces qui en feraient de même sur la planète. [3]

En forêt sèche, les réductions d'effectifs peuvent être dues aux conditions de vie extrêmement dures qui les conduisent par des processus adaptatifs à former un écosystème vulnérable. Mais le principal facteur de réduction des effectifs demeure l'action de l'Homme sur les milieux naturels. Pour le *Captaincookia margaretae*, la vulnérabilité due aux alizés desséchants est accentuée d'une part par les menaces d'origine anthropique et d'autre part par le syndrome d'insularité. La colonisation d'une île est inévitablement associée, durant sa phase d'établissement, à des périodes de populations de petite taille. Les forces stochastiques résultant des événements de fondation et de la dérive génétique jouent un rôle prédominant dans la détermination des caractéristiques de la variation génétique chez ces espèces. Ainsi, la perte de diversité consécutive au petit nombre de fondateurs et aux petits effectifs va inscrire les bases génétiques de l'insularité dans un régime de consanguinité. Les populations insulaires affichent souvent de forts taux de consanguinité ; cette dernière peut diminuer la résistance d'une population en réduisant son taux de reproduction et de survie, la population devient alors plus sensible aux facteurs non génétiques.

Par ailleurs, le *Captaincookia margaretae* étant endémique de la Nouvelle-Calédonie, cet état augmenterait son risque d'extinction. Les populations insulaires endémiques ont généralement existé sur les îles en petit effectif plus longtemps que les populations non-endémiques. Elles vivent isolées depuis si longtemps et dans des conditions tellement différentes de celles du continent d'origine qu'elles constituent des ensembles coadaptés, fortement structurés, résistants aux perturbations de leur milieu (Blondel, 1995). Mais cette résistance, acquise par des processus adaptatifs, comme nous l'avons déjà dit, les rend vulnérables aux colonisations et il semble que les introductions d'origine anthropique aient un impact encore plus important. Dans le cas du *Captaincookia margaretae*, il semble que l'effectif réduit des populations soit un élément particulièrement aggravant dans la vulnérabilité de l'espèce. En effet, la mutation, la migration, la sélection et le hasard sont les 4 forces qui déterminent l'évolution des populations quelque soit leur taille, mais l'impact du hasard sera plus important et celui de la sélection

moindre sur les petites populations. Les populations réduites ou déclinantes des espèces menacées ou en danger sont plus sensibles à l'extinction que les populations stables. De ce fait, l'effectif est le critère le plus influent des 5 critères donnés par le système IUCN pour détecter le niveau de menace qui pèse sur un taxon (UICN, 2001).

Les aires occupées par le *Captaincookia margaretae* en forêt sèche sont donc aujourd'hui beaucoup plus restreintes et fragmentées. L'étude génétique par des marqueurs microsatellites pourrait permettre d'évaluer la diversité génétique et la structuration des populations et l'étude écologique pourrait permettre de comprendre la typologie des forêts sèches.

III- MATÉRIELS ET MÉTHODES

III. 1- Matériel biologique

La récolte des feuilles pour l'analyse moléculaire a été effectuée sur 2 peuplements existants de *Captaincookia margaretae* dans les forêts de Nékoro et Tiéa où des fragments de feuilles ont été récoltés sur environ 200 arbres (rapport de mission, Verhaegen 2005). Cet échantillonnage a été accompagné d'une description écologique précise de chaque récolte. Des échantillons complémentaires ont été prélevés dans les forêts sèches de Pindai et de Metzdorf. Quelques individus ont également été récoltés en zone de forêt humide à Nassirah, sur une espèce qui ne semblait pas différente de *Captaincookia margaretae*. (Description de l'échantillonnage, voir figure 2).

Figure 2 : Localisation des Forêts échantillonnées



Le *Captaincookia margaretae* est une espèce à répartition agrégative qui se distribue le long des creeks. En forêt naturelle, il est fréquent de rencontrer jusqu'à plus d'une dizaine d'arbres sur quelques mètres carrés. Initialement, le plan d'échantillonnage a été réalisé en vue d'étudier :

- la diversité génétique au sein des agrégats
- et la structuration temporelle et spatiale de la diversité génétique de l'espèce.

Les spécimens échantillonnés ont été géoréférencés par GPS, et les feuilles collectées ont été séchées à l'aide de silica gel.

Après l'extraction de l'ADN et amplification par PCR, de nombreux échantillons n'amplifiaient pas (voir annexe la représentation des échantillons suivant les coordonnées géographiques). Ceci a causé un grand

déséquilibre dans le système d'échantillonnage et nous avons été amenés à réorienter notre étude. Nous avons alors considéré Nékoro et Tiea comme deux grandes populations distinctes et panmictiques à l'intérieur desquelles nous avons mis en évidence les paramètres de diversités génétiques et les structures spatiales des sous populations. Dans la population de Tiéa où nous avons pu amplifier autant d'échantillons de jeune arbre que d'arbre adulte, une structuration temporelle a été étudiée.

Pour l'analyse écologique du *Captaincockia margaretae*, l'échantillonnage de ce dernier a été accompagné de relevés phyto-sociologiques sur l'ensemble des espèces végétales avoisinantes. A chaque prélèvement sur un échantillon de *C. margaretae*, les espèces présentes dans un rayon de 4 mètre ont été également notées. Ces données ont été utilisées dans le cadre d'une étude floristique plus large afin de caractériser les assemblages floristiques des forêts de Nékoro et Tiéa, et les principaux traits écologiques de *Captaincockia margaretae*.

III.2 – Analyse moléculaire par microsatellites nucléaires

III.2.1 – Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir de 400 mg de feuilles séchées selon le protocole donné en annexe, obtenu par modification du protocole d'extraction d'ADN du *Santalum insulare* qui est établi d'après une méthode décrite par Bousquet *et al.* (1990). La qualité de l'ADN extrait a été évaluée sur gels d'agarose 1% et la quantification a été faite par le logiciel Image J. Des solutions de travail ont alors été réalisées à une concentration de 5 ng/μl.

III.2.2 – Mise au point des amorces microsatellites nucléaires et amplification

La banque génomique a été construite à partir de l'ADN d'un individu appartenant à la population de Nékoro. 6 microgrammes de l'ADN total purifié ont été utilisés pour construire une banque génomique enrichie en répétitions (GT) n et (CT) n , selon le protocole de Billote *et al.* (1999). Les clones sélectionnés ont été séquencés à l'aide du BigDye Terminator Cycle Sequencing Chemistry (Applied Biosystems), et les séquences ont été détectées sur un séquenceur ABI 3700. Parmi les clones séquencés, les doublons, les clones hybrides et ceux contenant des séquences inexploitable ou avec une région microsatellite trop en marge de la séquence, ont été éliminés. Au final, les clones contenant au moins une région microsatellite, avec au moins 4 répétitions de motifs ininterrompues, ont été sélectionnés. Un design d'amorces a été réalisé sur les séquences à l'aide du logiciel OLIGO EXPLORERTM et 30 couples d'amorces présentant un design satisfaisant ont été testés pour différentes conditions d'amplification (température d'hybridation, nature du tampon, concentrations en MgCl₂, Taq Polymérase, dNTPs, amorces). Ces tests ont été effectués sur gel d'agarose 1% pour 2 individus.

Les tests de polymorphisme ont été conduits sur un panel de 11 individus de provenances différentes (3 de Nékoro, 3 de Tiéa, 2 de Metzdorf, 2 de Pindaï et 1 de Nassirah) afin d'écarter les locus à profil non variable ou non interprétable, et les locus absents pour certaines provenances. 11 locus ont finalement été retenus pour l'étude : mCIRCmA02, mCIRCmB10, mCIRCmB11, mCIRCmC02, mCIRCmC03, mCIRCmD02, mCIRCmD10, mCIRCmF04, mCIRCmF10, mCIRCmG06, mCIRCmH09. Leurs caractéristiques sont données dans le tableau A.

Tableau A : Caractéristiques des locus microsatellites utilisés

Locus	Séquence des amorces (5'→3')	Motifs répétés	Taille du fragment (pb)	Température d'hybridation
mCIRCmC03	*TGTCTGTATGTTTCTGTGCG	(AG) ₈ (CA) ₁₁	202 + 19	52°C
mCIRCmD02	*GATTCAGTCTTTCCCTTCTAAC	(AC) ₁₆	191 + 19	50°C
mCIRCmF10	*AATTGTTTCTCCCTCAC	(CT) ₁₇ (CA) ₁₁	261 + 19	52°C
mCIRCmA02	*ATTAGTGATAAGCCAGCC	(AC) ₈	183 + 19	52°C
mCIRCmB11	*CCTTTTGGTTTGGGATG	(TG) ₉	251 + 19	52°C
mCIRCmC02	*AGGTTCTCAATGCTGATGG	(TG) ₅ (TA) ₂ (CA) ₂ (TA) ₅ (CATA) ₂ (TG) ₈	257 + 19	52°C
mCIRCmD10	*GTGCTCTGAAGACCAATCC	(TG) ₂₂	156 + 19	52°C
mCIRCmF04	*AATCTTGTGTAGGGGGTTC	(CA) ₇	241 + 19	52°C
mCIRCmG06	*TCATCAAAATCCTAACATCTTCA	(GA) ₁₁	213 + 19	50°C
mCIRCmH09	*TTCAGACCCATCCAAAACACTCAC	(AC) ₁₅	90 + 19	52°C
mCIRCmB10	*TTGTCCTTTAGCAGAACTTG	(GA) ₁₂	161 + 19	52°C

*Séquence de l'oligo M13 (19pb) : 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'

Les amplifications par PCR ont été réalisées sur le thermocycleur "Mastercycler gradient" (Eppendorf) dans les conditions indiquées en annexe. Les tailles des produits d'amplification ont été évaluées par migration sur séquenceur Licor IR2 54 (détails en annexe) et à l'aide du logiciel SAGA 2.0.

III.3 – Analyses des données

III.3.1 – Analyse de la diversité et de la différenciation génétique

Différents paramètres de diversité ont été utilisés pour quantifier la variabilité génétique au sein et entre les deux populations. Ces paramètres ont été calculés grâce au logiciel Genetix version 4.05 mis au point par Belkhir k. et al. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier. Nous avons ainsi pu déterminer le taux d'hétérozygotie attendu sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg (He), le taux d'hétérozygotie observée (Ho), le nombre d'allèles observé par locus (Na).

Les Fstat : Fst et Fis ont été estimés d'après les formules de Weir & Cockerham (1984).

$$Fis = 1 - C/(B+C)$$

$$Fst \theta = A/(A+B+C)$$

La signification des paramètres pour un allèle donné i est la suivante:

A_i = composante inter-population de la variance des fréquences alléliques,

B_i = composante, entre individus à l'intérieur de chaque population, de la variance des fréquences alléliques,

C_i = composante, entre gamètes à l'intérieur de chaque individu, de la variance des fréquences alléliques.

L'estimation de θ pour un locus tous allèle i confondus est donnée selon Weir & Cockerham :

$$F_{ST} = \frac{\sum(A_i)}{\sum_i (A_i + B_i + C_i)}$$

Le F_{is} (indice de fixation F de Wright (1969)) calculé pour chaque locus, estime la corrélation de deux gènes à l'intérieur d'un individu par rapport à deux gènes pris au hasard dans la population. Il mesure la réduction éventuelle d'hétérozygotie des individus à l'intérieur de leur sous population qui est due à un mode de croisement non panmictique. A l'équilibre de Hardy-Weinberg le F_{is} est égal à 0. Ainsi une valeur de F_{is} significativement positive pourra indiquer un déficit en hétérozygotes, et une valeur négative traduit en revanche un excès d'hétérozygotes.

Un test de permutation des allèles à l'intérieur de la population est effectué. Pour chaque locus, une "urne gamétique" est construite à partir des allèles des individus de la population. Le tirage aléatoire dans cette urne permet de reconstruire les génotypes monolocus en simulant la panmixie. Cette procédure est effectuée pour chaque locus. Elle est utilisée pour tester l'hypothèse nulle $F_{is} = 0$.

Le F_{st} estime la corrélation des gènes entre individus dans une population par rapport à l'ensemble des populations. Le F_{st} mesure la réduction d'hétérozygotie dans les sous populations, cette réduction est due à une différence des fréquences alléliques moyennes des sous populations ; une valeur de F_{st} nul veut dire que toutes les sous populations ont la même fréquence allélique ; une valeur significativement supérieur à 0 traduit un effet Wahlund qui fait que H_t (diversité génétique totale si les sous populations sont mélangées) est supérieur à H_s (diversité génétique moyenne intrapopulation).

Pour la population de Tiéa, le F_{st} a été calculé par l'approche ANOVA grâce au logiciel SPAGeDi.

Une Analyse Factorielle des Correspondances a été effectuée sur les données génotypiques des deux populations (Nékoro et Tiéa) et des individus associés de Pindaï, Metzdorf et Nassirah ; grâce au logiciel Genetix. Quand les « objets » analysés sont des populations représentées par le vecteur de leur fréquences alléliques, Long (1986), Smouse et Long (1988) ont montré que la « trace » de l'AFC (c'est à dire la somme des valeurs propres) pouvait être assimilée à l'estimateur du F_{st} de Robertson et Hill et Guinand

(1996) a montré que dans ce cas les valeurs d'inertie le long de chaque axe pouvaient être assimilées à des combinaisons linéaires de valeurs de Fst.

III.3.2 – Analyse de la structuration spatiale de la diversité génétique

La structuration spatiale de la diversité génétique a été analysée par deux approches : une première approche utilisant le logiciel SPAGeDi a permis de calculer les coefficients de simple et de double parenté à l'intérieur des populations de Nékoro et de Tiéa et une deuxième approche a permis avec le logiciel GENELAND de définir les sous populations qui existent dans les deux populations. Des dendrogrammes (de type Neighbor-Joining) de distance génétique entre ont été construits à l'aide du logiciel DARWIN afin d'observer si les distances entre génotypes peuvent correspondre aux groupes géographiques déterminés par GENELAND.

III.3.2.1 - Coefficients de parenté (Ritland (1996) ; Wang (2002))

Le coefficient de simple parenté entre deux individus, i et j , est égal à la probabilité pour qu'un gène, tiré au hasard, soit identique chez i et j par descendance (F_{ij}). Ce coefficient de simple parenté a été estimé par l'indice Kinship de Ritland & Lynch (1996).

Le logiciel SPAGeDi 1.2 (Hardy & Vekemans 2002), propose de calculer le coefficient de kinship à partir de l'équation suivante :

$$F_{ij} = \frac{\sum_l \left(\frac{\sum_a \sum_{ci} \sum_{cj} \left(\chi_{lci} \chi_{lca} / p_{la} \right)}{\sum_{ci} \sum_{cj} 1} - 1 \right)}{\sum_l (m_l - 1)}$$

où χ_{lci} est une variable indicative ($\chi_{lci} = 1$ si l'allèle sur le chromosome c au locus l pour l'individu i est a , si non $\chi_{lci} = 0$), p_{la} est la fréquence de l'allèle a au locus l dans l'échantillon de référence, m_l est le nombre des différents allèles trouvés dans l'échantillon au locus l , et $\sum_{ci}$ tient pour la somme sur les chromosomes homologues de l'individu i .

Les valeurs de F_{ij} calculées par cet estimateur peuvent prendre des valeurs négatives pour des paires d'individus non apparentés.

Le coefficient de « fraternité » ou double-parenté, entre deux individus, i et j , est égal à la probabilité pour que deux gènes tirés au hasard, soient identiques chez i et j par descendance (Δ_{ij}). Ce coefficient est calculé par l'estimateur de Wang 2002.

III.3.2.2 – Répartition spatiale des populations

GENELAND est un logiciel développé pour détecter la structure des populations à partir d'individus géoréférencés et géotypés. Le logiciel estime le nombre de sous populations présentes dans les données, produit des cartes de répartition des individus dans les populations et calcule des valeurs de F statistique pour les sous populations trouvées. Ce logiciel estime les différents paramètres des populations en utilisant le MCMC (Markov Chain Monte Carlo) algorithme.

Le logiciel DARWIN 5.0.84 (Perrier et al., 2003) permet de calculer un indice de dissimilarité d_{ij} entre les géotypes ; cet indice est dérivé de l'indice de similarité ("simple matching") de Sokal & Michener (1958) et est calculé par la formule suivante :

$$d_{ij} = 1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{ml}{\pi}$$

où : d_{ij} est l'indice de dissimilarité entre 2 géotypes i et j ; L est le nombre de locus ; π est la ploïdie ; ml est le nombre d'allèles identiques au locus l .

Des arbres utilisant la méthode de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) ont été dessinés à partir des matrices de dissimilarité entre géotypes pour chacune des populations de Tiéa et Nékoro et pour l'ensemble des échantillons (les 2 populations de Tiéa et Nékoro plus les individus associés de Pindaï, Metzendorf et Nassirah).

III.3.3 – Analyse des données écologiques

ADE-4 est un logiciel d'analyse multivariée et de représentation graphique qui nous a permis de réaliser les analyses phyto-sociologiques et de représenter les résultats. Nous avons ainsi pu représenter sur le plan factoriel principal d'une AFC toutes les espèces qui ont été échantillonnées. Sur le même plan principal, les sites d'échantillonnage ont également été représentés et enfin nous avons obtenu un dendrogramme qui découle d'une Classification Ascendante Hiérarchique établie selon une distance euclidienne entre colonnes (espèces), et en utilisant le moment de Ward. Ce dendrogramme rapproche les espèces selon leur co-occurrence, et donc également selon l'affinité entre celles-ci.

IV – RÉSULTAT

IV.1 – Analyse de la diversité génétique

Les résultats obtenus pour le calcul des différents paramètres de diversité pour Nékoro et Tiéa sont consignés dans les tableaux B et C.

Tableau B : paramètres de la diversité génétique obtenus par l'analyse de marqueurs microsatellites

	NEKORO (N = 47)				TIEA (N = 57)			
Locus	Na	Ho	He	Fis (W&C)	Na	Ho	He	Fis (W&C)
mCIRCmC03	7	0.613	0.701	0.127*	5	0.551	0.619	0.111 ^{ns}
mCIRCmD02	13	0.872	0.889	0.019 ^{ns}	8	0.830	0.803	-0.034 ^{ns}
mCIRCmF10	19	0.571	0.883	0.356**	18	0.700	0.897	0.221**
mCIRCmA02	9	0.681	0.768	0.115*	8	0.508	0.786	0.355**
mCIRCmB11	5	0.454	0.519	0.126 ^{ns}	5	0.637	0.697	0.086 ^{ns}
mCIRCmC02	6	0.674	0.735	0.085 ^{ns}	6	0.559	0.737	0.243**
mCIRCmD10	13	0.782	0.848	0.078 ^{ns}	12	0.824	0.797	-0.034 ^{ns}
mCIRCmF04	2	0.200	0.217	0.079 ^{ns}	3	0.272	0.467	0.419**
mCIRCmG06	8	0.288	0.731	0.608**	10	0.584	0.831	0.299**
mCIRCmH09	10	0.804	0.788	-0.021 ^{ns}	9	0.678	0.693	0.022 ^{ns}
mCIRCmB10	10	0.659	0.773	0.149*	12	0.810	0.837	0.032 ^{ns}
Valeurs multilocus	9.27	0.600	0.714	0.161**	8.82	0.632	0.742	0.149**
Ecart type		0.210	0.193			0.165	0.120	
Niveau de signification : *P< 0,05 ; **P< 0,01 et ns non significatif N :nombre d'échantillon, Na : nombre d'allèle par locus, Ho : taux hétérozygotie observé, He : taux d'hétérozygotie attendu Fis w&C : indice de fixation estimé par Weir et Cockerham (1984)								

Le tableau B représente les valeurs du Fis pour chaque locus pour chaque sous population, ainsi que les valeurs des paramètres de polymorphisme. Les valeurs des indices de fixations (Fis) calculées, au regard du test de permutation des allèles dans les populations, ne sont pas toutes significativement différentes de zéro au seuil P<0,05.

Pour la population de Nékoro six valeurs sont non significatives (locus mCIRCmD02, mCIRCmB11, mCIRCmC02, mCIRCmD10, mCIRCmF04 et mCIRCmB10). En revanche, certains Fis (pour les loci mCIRCmF10 et mCIRCmG06) sont très positifs (valeurs en gras). Enfin, la valeur globale du Fis (0,161) est significativement différente de zéro au seuil P < 0,01. Le Fis pour le locus G06 étant significatif et beaucoup trop élevé par rapport aux Fis des autres locus (0.608), nous avons suspecté la présence d'allèles

nuls pour ce locus et les analyses ont été reprises en éliminant ce locus, la valeur alors trouvée $F_{is} = 0.11$, bien que plus faible que la première, reste toujours différente de zéro au seuil $P < 0.01$.

Pour la population de Tiéa, six valeurs sont non significatives (locus mCIRCmC03, mCIRCmD02, mCIRCmB11, mCIRCmD10, mCIRCmH09 et mCIRCmB10) et toutes les autres F_{is} sont très positives (valeurs en gras). La valeur globale du F_{is} (0,15) est aussi significativement différent de zéro au seuil $P < 0,01$. Après élimination de G06, le $F_{is} = 0.13$.

Pour la population de Nékoro, le nombre d'allèles par locus (N_a) est très variable en fonction des loci (de 2 à 19). Le taux d'hétérozygotie observé H_o , varie entre 0, 20 et 0,87 avec un taux multilocus à 0,60. Le taux d'hétérozygotie attendu H_e , varie entre 0,21 et 0,89 avec un taux multilocus à 0,71. Pour la population de Tiéa, le nombre d'allèle par locus varie de 3 à 18, Le taux d'hétérozygotie observé H_o , varie entre 0,27 et 0,83 avec un taux multilocus à 0,63. Le taux d'hétérozygotie attendu H_e , varie entre 0,46 et 0,83 avec un taux multilocus à 0,74

Ces résultats suggèrent donc d'une part un apparent déficit en hétérozygotes du fait d'un F_{is} global sur les loci positif et d'autre part une forte diversité génétique (au regard des paramètres N_a , H_o , et H_e).

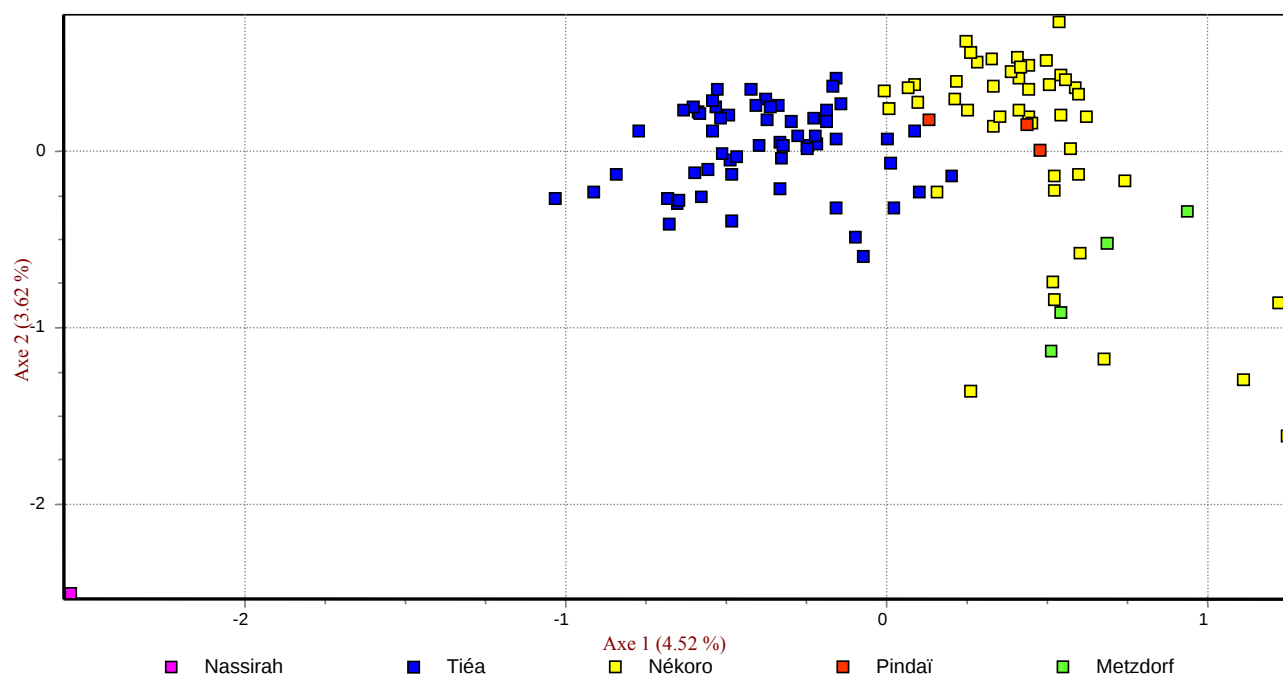
Tableau C : paramètre de F selon la méthode de Weir et Cockerham

Locus	F_{is}	F_{it}	F_{st}
mCIRCmC03	0.11801	0.15601	0.04309
mCIRCmD02	-0.00912	0.04266	0.05131
mCIRCmF10	0.28214	0.33163	0.06895
mCIRCmA02	0.25033	0.26288	0.01674
mCIRCmB11	0.10055	0.22208	0.13512
mCIRCmC02	0.17426	0.17444	0.00022
mCIRCmD10	0.01768	0.05978	0.04285
mCIRCmF04	0.32602	0.38789	0.09179
mCIRCmG06	0.43128	0.47913	0.08414
mCIRCmH09	0.00192	0.03110	0.02923
mCIRCmB10	0.08227	0.15972	0.08439
valeurs multilocus	0.15513	0.20400	0.05785
Estimation de l'intervalle de confiance à 95% par 1000 bootstraps sur les locus			
F_{IS}	(0.07777 - 0.24025)		
F_{IT}	(0.12513 - 0.28582)		
F_{ST}	(0.03727 - 0.07980)		

Le tableau C résume l'estimation du Fis moyen sur l'ensemble des populations, du Fst et du Fit tels qu'ils sont calculés dans le cadre d'un modèle en îles, où toutes les populations sont équivalentes et représentent une réalisation particulière de l'équilibre migration/dérive.

La valeur trouvée pour le Fst calculé à Tiéa ($F_{st} = 0,0053$) est faible.

Figure n°4 : AFC sur les données génétiques des populations de Nékoro et Tiéa avec adjonction des individus récoltés à Metzdorf, Pindaï et Nassirah.



La figure n°4 représente l'AFC réalisée sur l'ensemble des échantillons ; nous remarquons que les populations sont nettement séparées. Le seul individu de Nassirah qui a amplifié s'écarte largement des autres, les populations de Tiéa et de Nékoro forment 2 groupes bien séparés, les 3 individus de Pindaï se noient dans la population de Nékoro et les quelques individus de la propriété de Metzdorf s'écartent un peu de Nékoro et complètement de Tiéa.

IV.2 – Analyse de la structuration spatiale de la diversité génétique

IV.2.1 – Spatialisation de l'apparentement

La variation de l'indice de simple parenté (Fij) dit coefficient « kinship » de Ritland pour la population de Nékoro est représentée par le graphique de la figure n°5. On voit que la courbe ne sort pas de l'intervalle de confiance au seuil $P < 0,05$. Nous voyons donc qu'aucune relation de partage d'allèle identique (par état ou par descendance) n'apparaît même pour des distances de 20 mètres même si la valeur du coefficient est la plus forte à ce niveau.

Figure n°5 : Coefficient de simple parenté (Nékoro)

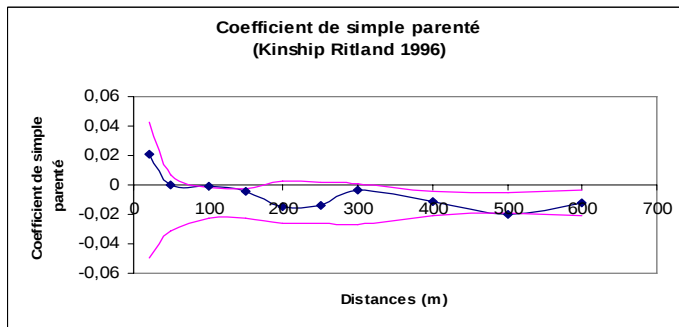


Figure n° 6 : Coefficient de double parenté (Nékoro)

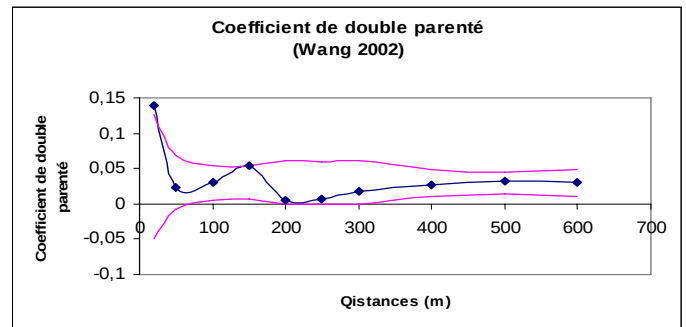


Figure n°8 : Coefficient de simple parenté (Tiéa)

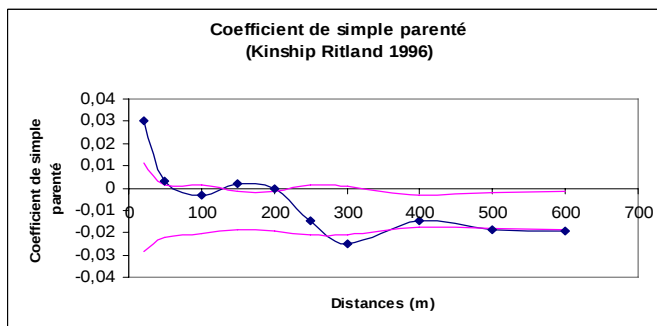
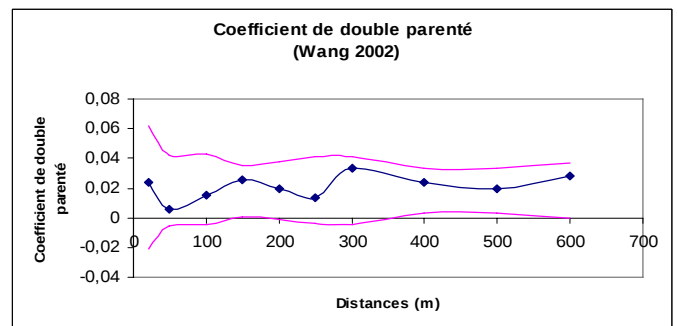


Figure n° 9 : Coefficient de double parenté (Tiéa)



La figure n° 6 représente la variation du Δ_{ij} le coefficient de double parenté de Wang. Ici la courbe sort de l'intervalle de confiance au seuil $P < 0,05$ pour les distances de 20 mètres et les valeurs de Δ_{ij} sont les plus fortes (0.15) pour ces mêmes distances.

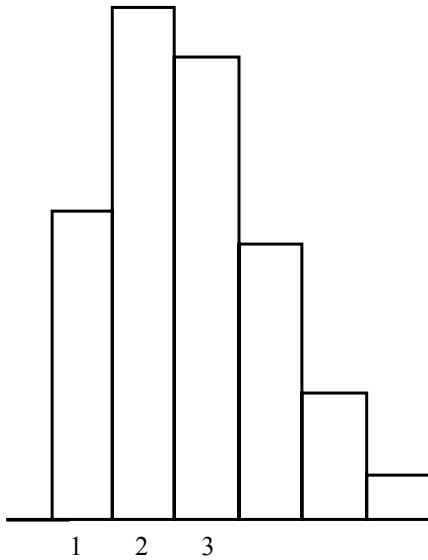
L'indice de Wang montre donc que les individus les plus fortement ressemblants se trouvent dans un rayon de 20 mètres.

Pour la population de Tiéa, l'indice de simple parenté est représenté sur le graphique de la figure n°8. On voit que la courbe sort de l'intervalle de confiance au seuil $P < 0.05$ pour les distances inférieures à 50 mètres et pour les distances comprises entre 150 et 200 mètres. Les plus fortes valeurs sont observées pour des distances inférieures à 20 mètres. La courbe du coefficient de double parenté (figure n°9) reste dans l'intervalle de confiance au seuil $P < 0.05$

IV.3 – Répartition spatiale des génotypes

Les résultats suivants ont été obtenus pour l'analyse spatiale par GENELAND : la première analyse en fonction de coordonnées réelles et des génotypes et après 40000 itérations estime qu'il existe 2 sous populations à Nékoro comme le montre la figure n°10.

Figure n° 10: Histogramme du nombre de sous populations à Nékoro



L'analyse a été reprise en fixant le nombre de population à 2 et les figures n°11 et n°12 montrent la répartition spatiale des 47 arbres et des 2 sous populations.

Figure 11 : Carte des probabilités pour les individus d'appartenir à la sous population 1 de Nékoro

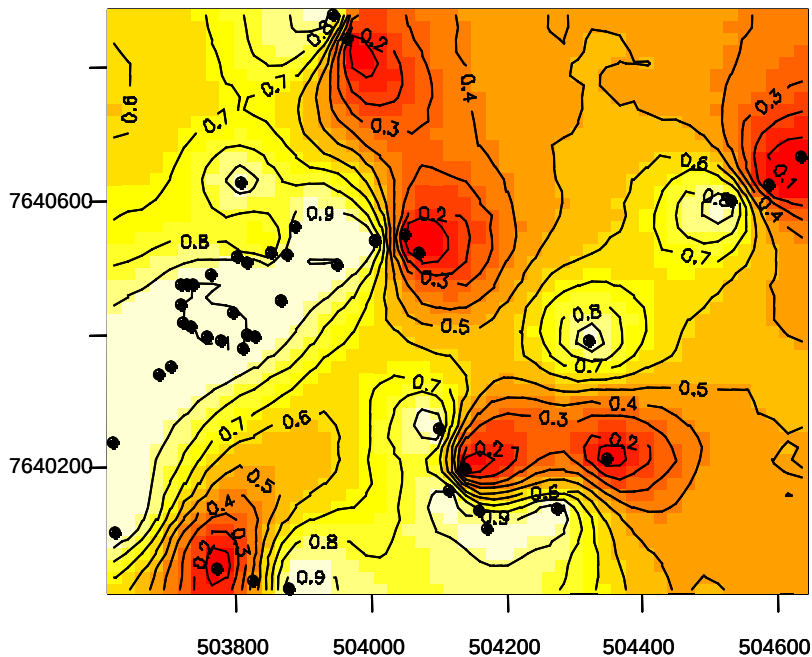
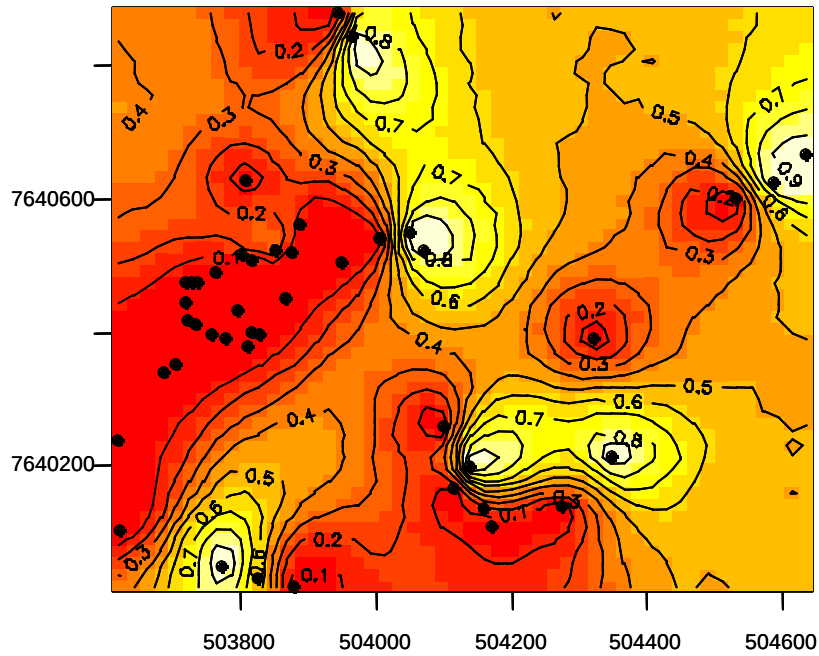
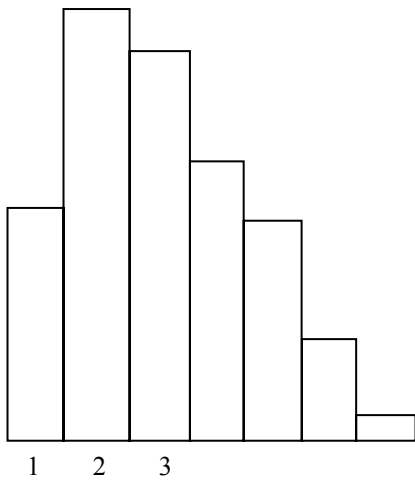


Figure12 : Carte des probabilités pour les individus d'appartenir à la sous population 2 de Nékoro

Pour Tiéa, il existe une structuration spatiale de la population de *C. margaretae* en 2 sous populations, mais l'algorithme de calcul de GENELAND nécessite un très grand nombre d'itération (400000) pour estimer correctement l'affectation des individus aux sous populations et les paramètres de diversité génétique. L'histogramme de la figure n° 13 montre la présence des 2 sous populations.

Figure n° 13: Histogramme du nombre de sous populations à Tiéa

Les figures n°14 et n°15 donnent la répartition spatiale des 57 arbres et des 2 sous populations.

Figure 14 : Carte des probabilités pour les individus d'appartenir à la sous population 2 de Tiéa

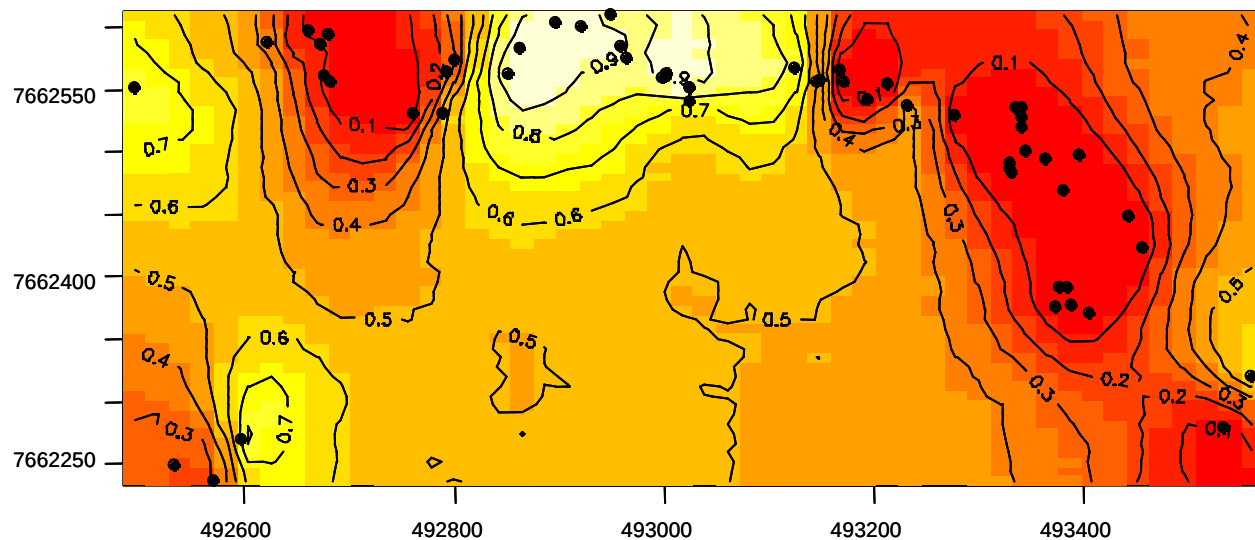
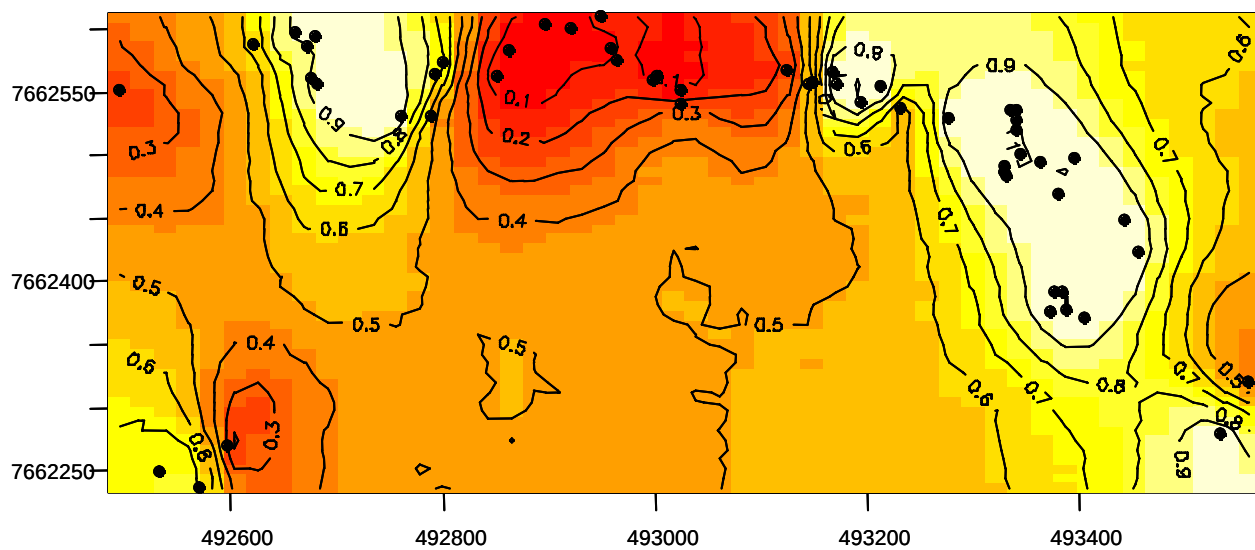


Figure 15 : Carte des probabilités pour les individus d'appartenir à la sous population 1 de Tiéa



Les figures n°16 et n°17 représentent respectivement pour Nékoro et Tiéa la limite des sous populations avec les individus.

Figure 16 : Carte de représentation des limites des sous populations à Nékoro

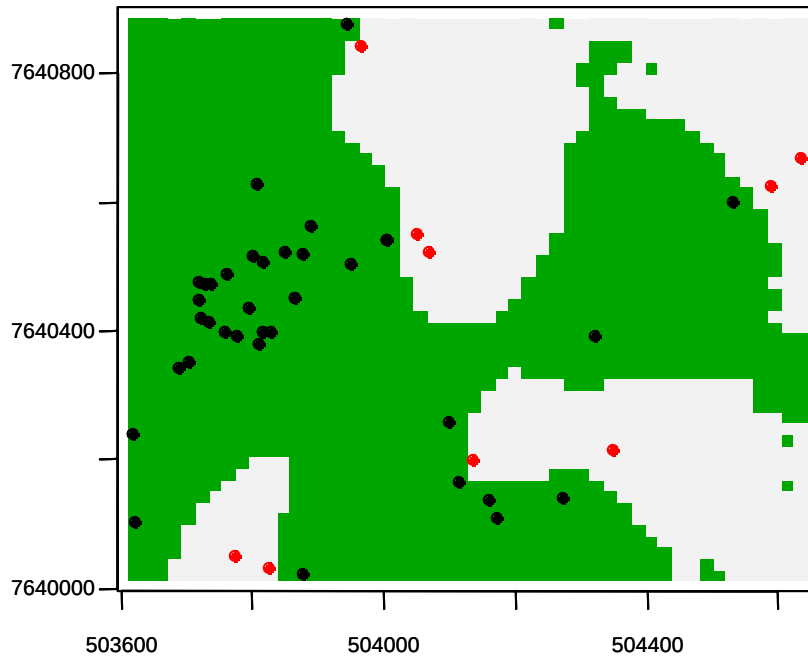
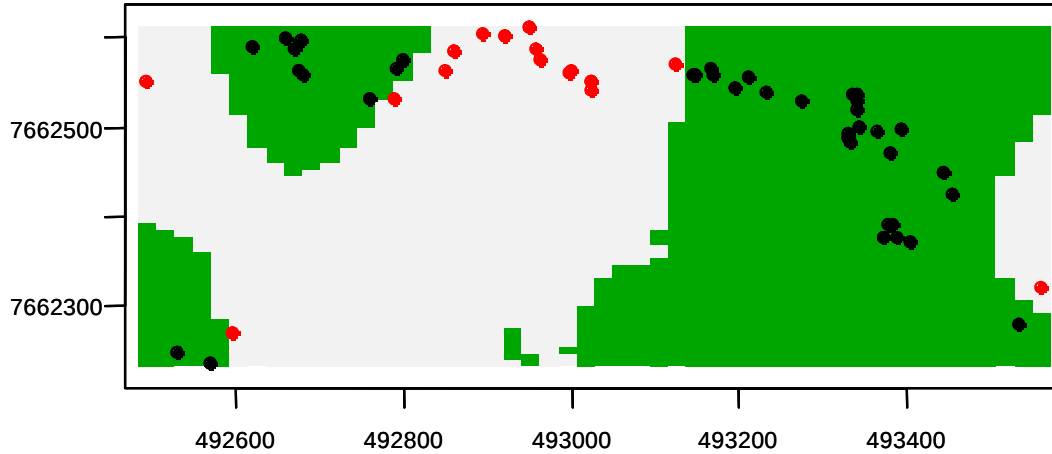


Figure 17 : Carte de représentation des limites des sous populations à Tiéa

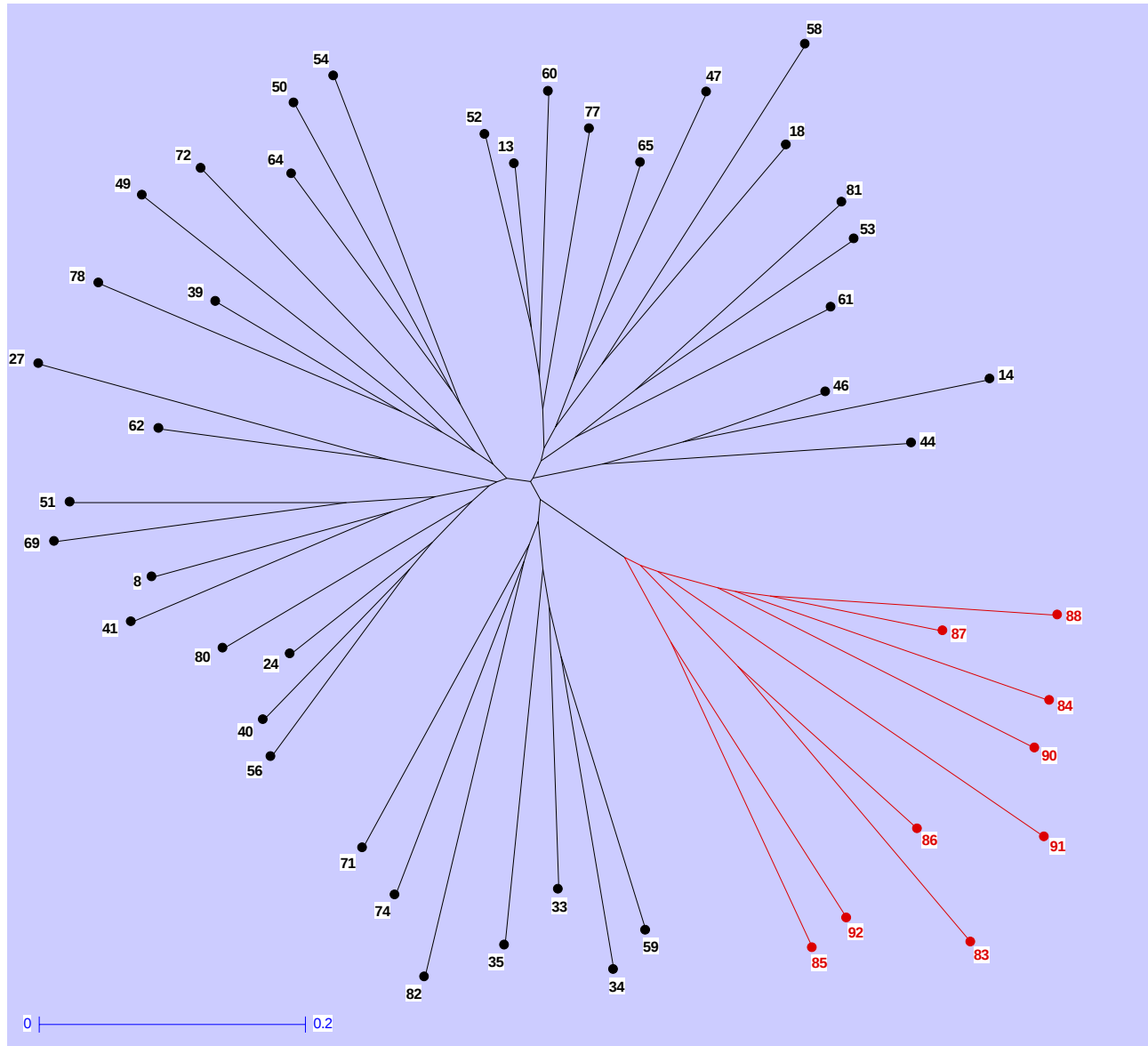


Les valeurs de F_{st} calculées entre les sous populations trouvées sont $F_{st} = 0,088$ pour Nékoro et $F_{st} = 0,036$ pour Tiéa et le F_{is} est différent de zéro et positif, $F_{is} = 0,143$ pour Nékoro et $F_{is} = 0,144$ Pour Tiéa.

ANNEXE 1

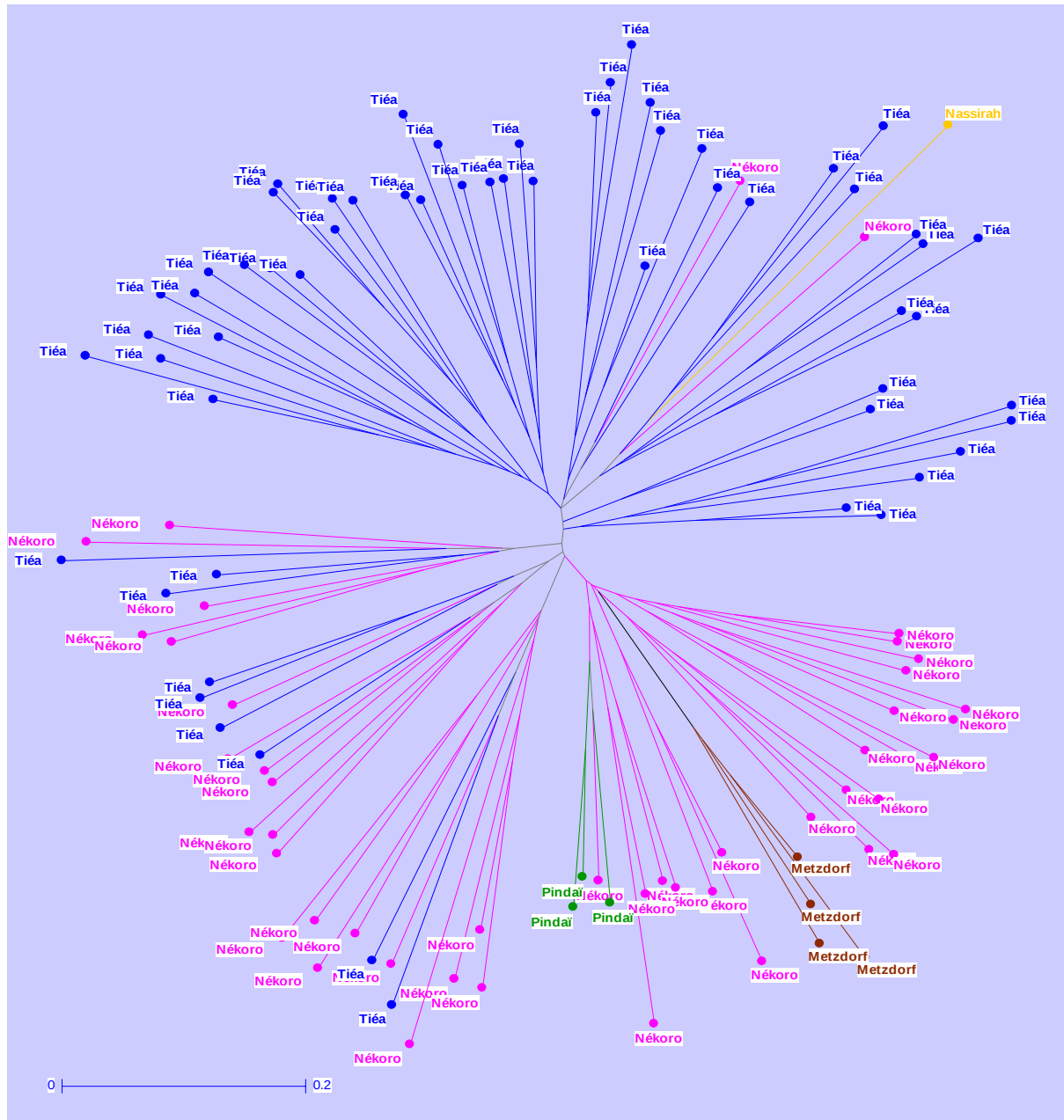
La sous population 2 de Nékoro se retrouve sur une branche à part dans l'arbre de distance génétique construit à l'aide de DARWIN (Figure n° 18).

Figure n° 18 : Arbre de Neighbor-Joining sur les génotypes multilocus de *C. margaretae* à Nékoro.
La branche en rouge correspond à la sous population 2 délimitée par GENELAND



Ce même groupe est retrouvé sur le dendrogramme dessiné à partir de tous les échantillons (Figure n° 19) avec cette fois-ci 2 arbres de Tiéa..

Figure n° 19 : Arbre de Neighbor-Joining sur les génotypes multilocus de *C. margaretae* sur tous les échantillons provenant de Nékoro, Tiéa, Pindaï, Metzdorf et Nassirah.



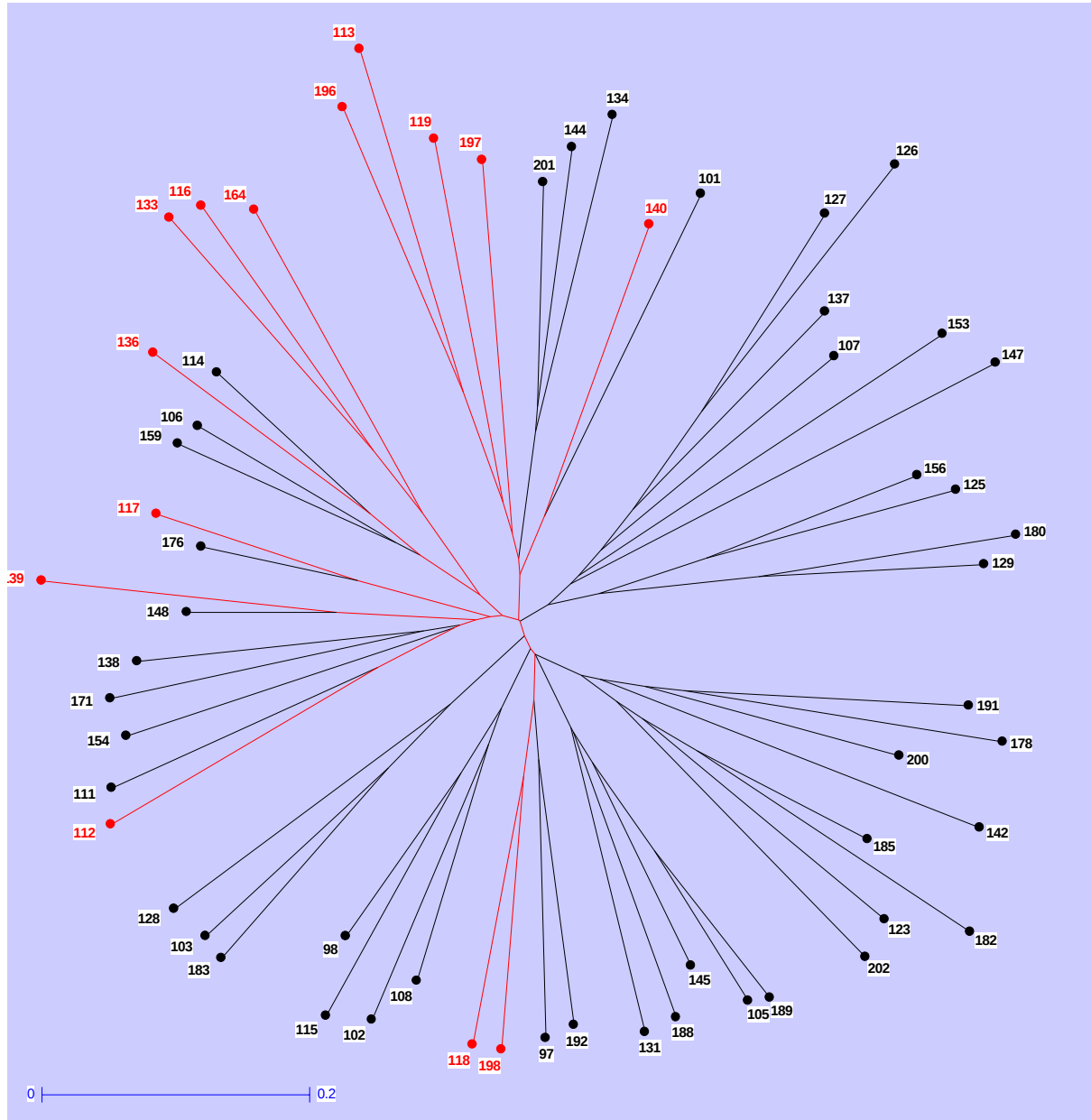
Sur ce dendrogramme, nous retrouvons la même répartition obtenue sur l'AFC réalisée avec Génétix sur les données génotypiques. En effet les 2 grands groupes de Nékoro et Tiéa se séparent nettement avec le groupe de Pindaï et celui de Metzdorf qui sont des sous groupes de Nékoro. Nous remarquons aussi qu'il y a plus de présence d'individus de Tiéa à Nékoro que le contraire.

ANNEXE 1

La Figure n° 20 représente l'arbre construit à partir des échantillons de Tiéa.

Figure n° 20 : Arbre de Neighbor-Joining sur les génotypes multilocus de *C. margaretae* à Tiéa

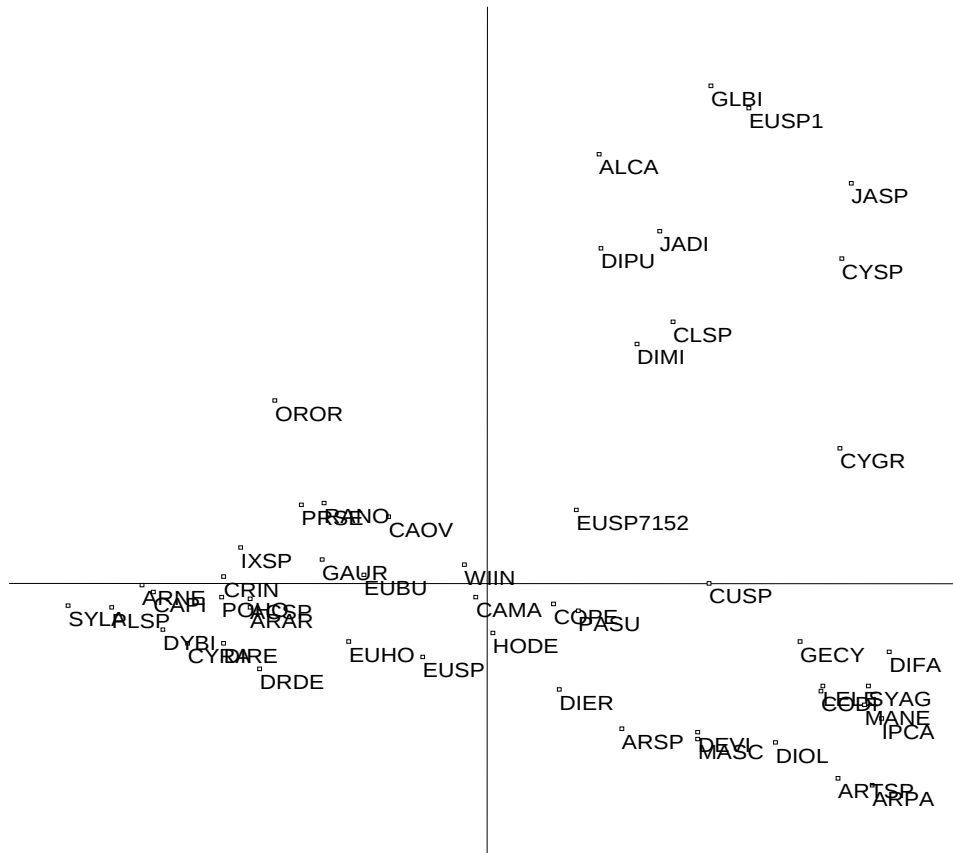
(Individus en rouge correspondent à la sous population 2 délimitée par GENELAND)



IV. 4 – Analyse des données écologiques

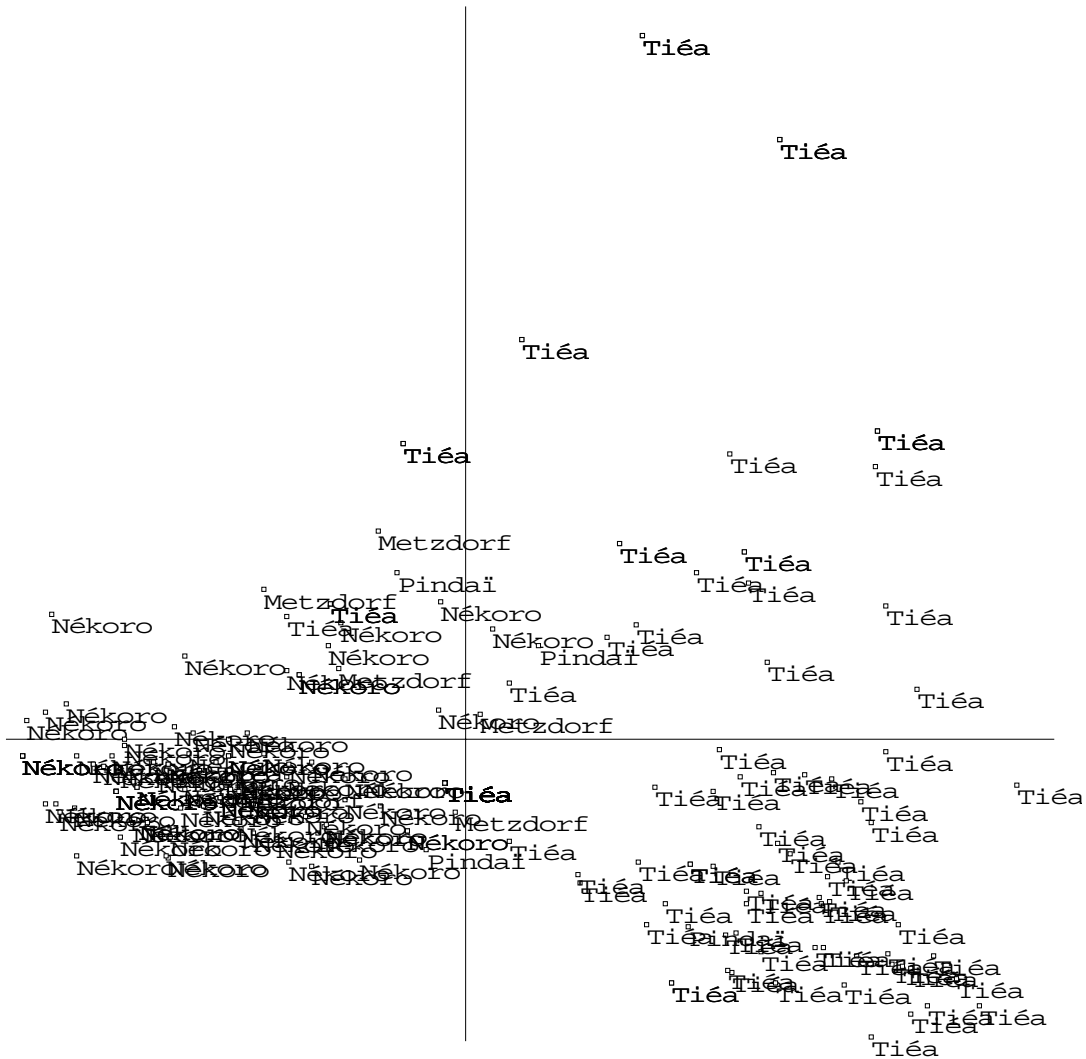
La représentation des espèces sur le plan factoriel principal de l'AFC (figure n° 21) fait apparaître un gradient d'ouverture du milieu de gauche vers la droite selon le premier axe, avec des exotiques héliophiles à droite et des espèces de milieu fermé à gauche. *Captaincookia margaretae* est noyé dans la masse, tout près de l'origine (ce qui est normal étant donné que les autres espèces ont été échantillonnées en fonction de l'échantillonnage de *Captaincookia margaretae*).

Figure n° 21 : Représentation des espèces sur le plan factoriel principal de l'Analyse Factorielle des Correspondants



La représentation des sites figure n° 22 sépare très nettement Tiéa du reste.

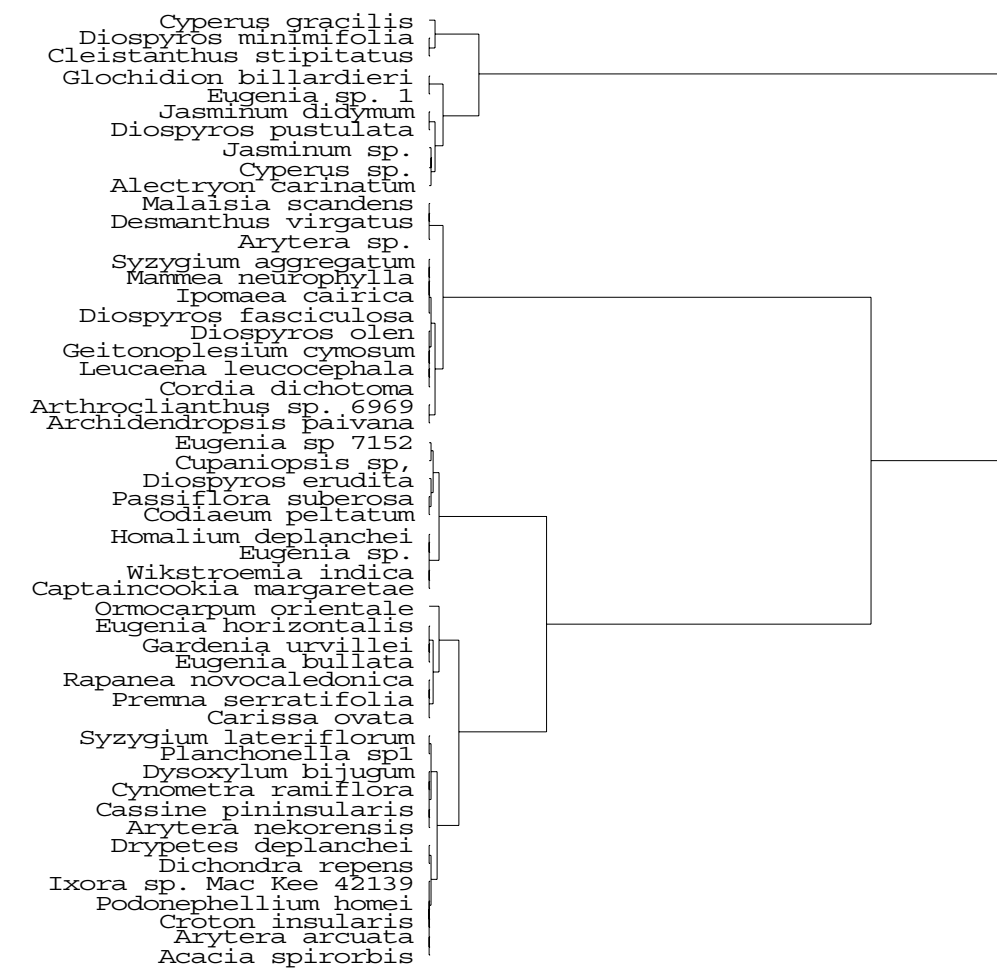
Figure n° 22 : Représentation des sites d'échantillonnage sur le plan factoriel principal de l'Analyse Factorielle des Correspondants



Cela montre que Tiéa a une composition floristique différente des autres, ce qui est expliqué par la typologie de la végétation de Tiéa qui est à tendance mésophylle, c'est-à-dire du côté de la transition entre la forêt sèche et la forêt humide.

Le dendrogramme de la Figure n° 23 permet de distinguer clairement plusieurs ensembles floristiques et permet aussi de voir que *Captaincookia margaretae* est très proche de *Wikstroemia indica*, de *Eugenia SP.* Et de *Homalium deplanchei* ; et il est assez proche des espèces comme *Codiaeum peltatum* et *Passiflora suberosa*.

Figure n° 23 : Dendrogramme représentant les espèces selon l'affinité entre celles-ci



ANNEXE 1

La Figure n° 24 représente sur le plan factoriel principal, les espèces de la forêt de Tiéa dans une étude floristique effectuée par l'IRD. En nous basant sur l'affinité des espèces avec le milieu, nous remarquons que l'axe 1 est lié à la nature du milieu (milieu ouvert à gauche et milieu fermé à droite) et l'axe 2 apparaît lié au microclimat (milieu sec vers le bas et milieu humide vers le haut). Cette étude confirme le positionnement de *C. margaretae* en milieu fermé et humide (le long des cours d'eau).

Figure n° 24 : Plan factoriel principal de l'analyse factorielle des correspondances des relevés phytosociologiques de la parcelle de Tiéa (source des données : IRD)



V – Discussion

V.1 – La variabilité génétique à l'intérieur et entre les populations

Pour les deux populations de Nékoro et Tiéa, la valeur globale de l'indice de fixation obtenue ($F_{is} = 0,11$ et $F_{is} = 0,13$) est significativement différente de zéro au seuil $P < 0,01$ et positive. Elle indique un « déficit » en hétérozygotes par rapport aux résultats attendus sous les hypothèses de Hardy Weinberg. Un déficit en hétérozygotes peut avoir plusieurs explications :

- La présence d'allèles nuls (allèles qui n'amplifient pas pour cause de mutation dans la région flanquante de l'amorce) à certains locus qui fait que les individus qui ont ces allèles sont considérés comme homozygotes pour ces locus alors qu'ils ne le sont pas ;
- Un effet Wahlund lorsque des sous populations panmictiques avec des fréquences alléliques différents sont présentes dans la population considérée ;
- Un système de croisement qui n'est pas panmictique : consanguinité et/ou homogamie.

Pour le *C. margaretae* le déficit en hétérozygote serait plutôt expliqué par :

- La présence d'allèles nuls car en éliminant déjà un locus suspect (mCIRCmG06) le F_{is} est passé de 0,16 à 0,11 à Nékoro et de 0,15 à 0,13 à Tiéa,
- Un effet Wahlund car comme nous l'avons vu dans l'analyse de la structure spatiale, il existe 2 sous populations à l'intérieur de chacune des populations de Nékoro et de Tiéa.

Le F_{st} mesure la différenciation entre populations, la valeur trouvée (0,057) en considérant les deux populations comme une seule, reste à l'intérieur de l'intervalle de confiance traduisant un important flux de gènes entre la forêt de Nékoro et celle de Tiéa.

Par ailleurs, nous trouvons pour les loci étudiés et pour les 2 populations une assez bonne diversité. Nékoro : 9 allèles par locus en moyenne, un taux d'hétérozygotes observé H_o à 60% et un taux d'hétérozygotes attendu H_e à plus de 71%. Tiéa : 9 allèles par locus en moyenne, un taux d'hétérozygotes observé H_o à 63% et un taux d'hétérozygotes attendu H_e à plus de 74%. Les taux d'hétérozygotie attendus et observés sont légèrement plus élevés à Tiéa qu'à Nékoro, ceci peut être expliqué par l'effectif des échantillons amplifiés qui est plus élevé à Tiéa (57) qu'à Nékoro (47).

ANNEXE 1

Dans les deux cas (Nékoro et Tiéa), l'hétérozygotie attendue reste élevée (0.71). Ces résultats contrastent avec les résultats attendus car, il est généralement admis que les espèces insulaires présentent une diversité génétique plus faible que leurs homologues continentales (Blondel, 1995 ; Barrett, 1998 ; Frankham, 2002). L'effet de fondation à l'origine de la colonisation d'une île entraîne en effet souvent une perte importante de la diversité par rapport à celle présente sur le "continent-mère". Or, les paramètres de diversité trouvés sont semblables à ceux d'espèces forestières continentales analysés par la même méthode (microsatellites nucléaires) comme le confirme le tableau ci-dessous de quelques valeurs comparatives :

Espèce	type	menaces	NA (moyen)	He (moyen)	Référence
<i>Melaleuca alternifolia</i>	continentale		9 - 19,4	0,50 - 0,76	Rosetto <i>et al.</i> , 1999
<i>Symphonia globulifera</i>	continentale		3,7 - 16	0,67 - 0,85	Aldrich <i>et al.</i> , 1998
<i>Vitellaria paradoxa</i>	continentale	+	3,4 - 4,2	0,38 - 0,44	Kelly <i>et al.</i> , 2004
<i>Grevillea macleayana</i>	continentale	++	3,2 - 4,2	0,42 - 0,53	England <i>et al.</i> , 2002
<i>Santalum austrocaledonicum</i>	insulaire	++	2 - 16 (7,28)	0,14 - 0,79 (0,49)	Bottin <i>et al.</i> , 2005
<i>Captaincookia margaretae</i>	insulaire	+++	2 - 19 (9,27)	0,71 - 0,74 (0,72)	

les paramètres de diversité sont semblables à ceux de *Melaleuca alternifolia* et de *Symphonia globulifera* qui sont tous les deux des espèces continentales et qui ne subissent pas de menaces.

Une autre espèce insulaire, *Santalum austrocaledonicum*, qui est aussi endémique de Nouvelle-Calédonie et qui subit moins de menaces que le *Captaincookia margaretae* présente des niveaux de diversité inférieurs à ceux de ce dernier.

Deux facteurs peuvent être à l'origine de la diversité particulièrement élevée chez *C. margaretae* : un effectif efficace assez important pour permettre de maintenir une telle diversité génétique malgré la réduction des effectifs des populations dues aux différentes menaces auxquelles l'espèce est exposée, et un taux élevé de régénération par reproduction sexuée.

Parmi les quatre forêts échantillonnées, Nassirah est la seule forêt humide et elle est géographiquement plus éloignée des autres sites d'échantillonnage, nous comprenons donc aisément l'écartement sur l'AFC

de l'échantillon de Nassirah des autres échantillons. Nous remarquons aussi sur l'AFC que les individus de la forêt de Tiéa apparaissent intermédiaires aux autres échantillons, ce qui est normal car la forêt de Tiéa est en transition entre la forêt sèche et la forêt humide. Les forêts de Meztdorf et surtout de Pindaï ont les mêmes caractéristiques de forêts sèches que Nékoro et sont géographiquement plus proches de ce dernier, ce qui explique leur distribution dans le même groupe sur l'AFC.

V.2 – Spatialisation de la diversité génétique

V.2.1 – Spatialisation de l'apparentement

Il est nécessaire de connaître le niveau de fiabilité des estimateurs que nous avons utilisés pour caractériser la spatialisation de l'apparentement. Pour le coefficient de parenté (Kinship) (Ritland 1996), on peut se référer à une étude comparative, menée par T. Van De Castele et *al.* (2001). Elle met en parallèle les performances des différents estimateurs. Il ressort d'une manière générale que :

- L'utilisation de locus spécifiques améliore la performance des estimateurs quand les allèles sont très variables et de fréquences variables.
- Le polymorphisme et le nombre de locus utilisés déterminent la qualité des estimations.

En conclusion de cette étude, il ressort que pour des populations constituées au moins de 60 ou 70% de couples "ij" non apparentés, l'estimateur de Ritland est le plus performant. Enfin, Van De Castele donne les conditions nécessaires à l'utilisation des estimateurs de l'apparentement. Ainsi, ils nécessitent des erreurs de génotypage négligeables, l'absence d'allèles nuls, un apparentement au hasard (panmixie) et une fréquence des allèles dans la population connue. Afin dans un article publié par P. Oliehoek et *al.* (2006), il ressort que, si l'indice de Wang (2002) n'est pas le meilleur estimateur, en revanche, il prend en compte les incertitudes d'estimation des fréquences d'allèles.

Dans notre étude, nous avons trouvé très peu de résultats significatifs pour l'analyse de la spatialisation de l'apparentement. Ceci peut être expliqué par : (i) le système de croisement qui n'est pas panmictique, (ii) l'effectif des échantillons qui est très faible pour une telle analyse (47 individus pour Nékoro et 57 pour Tiéa), (iii) les difficultés à mettre en évidence une structure génétique spatiale d'une espèce (cela dépend en effet du type de marqueur utilisé, du système d'échantillonnage et des tests mis en application).

V.2.2 – Répartition spatiale des populations

Dans la forêt de Nékoro à la partie ouest du site d'échantillonnage est très dégradée et il ne reste que quelques individus de *Captaincookia margaretae*. La sous population 2 (figure n°12) obtenue par le logiciel GENELAND et retrouvée dans l'arbre de Neighbor-Joining élaboré à partir de la matrice de distance génétique entre les individus à Nékoro, serait une partie de cette forêt dégradée.

La sous population 2 délimitée à Tiéa à l'aide de GENELAND n'est pas observée dans l'arbre de Neighbor-Joining dessiné sur les individus de Tiéa. Ceci serait expliqué par la faible différenciation entre les sous populations de Tiéa, ($F_{st} = 0,035$) par rapport à la valeur du F_{st} (0,088) trouvée entre les sous populations de Nékoro. Nous pourrions aussi expliquer la difficulté rencontrée avec le logiciel GENELAND pour délimiter les sous populations de Tiéa par cette faible différenciation.

De l'étude de la spatialisation génétique de *Captaincookia margaretae*, il ressort que structure génétique spatiale de l'espèce est assez faible (pas de partage d'allèle entre les individus dans les intervalles de distances, F_{st} pas significatif entre Tiéa et Nékoro et $F_{st} = 0.036$ entre les sous populations de Tiéa). Dans des études antérieures de structure génétique spatiale, plusieurs auteurs ont rapporté une faible voire même une absence totale de structure spatiale pour de variables espèces tropicales ; exemple : *Quercus spp.* (Bergé Hamrick 1994 ; Streiff *et al.* 1998), *Psychotria officinalis* (Loiselle *et al.* 1995), *Rhus spp.* (Chung *et al.* 1999). Ces résultats ont été expliqués par une dispersion limitée des graines et un important flux de gènes. D'autres auteurs (Dewey & Heywood 1988 ; Loiselle *et al.* 1995 ; Chung *et al.* 1999, 2000) ont rapporté qu'on observe une faible structure génétique spatiale pour les espèces qui ont pour pollinisateurs des insectes et qui dispersent leur graine par des oiseaux.

D'autres auteurs tels que Sokal & Oden (1978), Waser (1987), Dewey & Heywood (1988), Doligez & Joly (1997) et Chung *et al.* (2000) expliquent l'absence d'une structure génétique spatiale dans leur étude par un flux de gène extensif, une large dispersion des graines, une auto-incompatibilité et les comportements des agents de dispersion.

Nous avons supposé que la pollinisation pour *C. margaretae* se fait par au moins 4 espèces d'oiseau de la famille des *Melliphagidae*. Cette faible structure génétique spatiale s'explique alors par une large dispersion du pollen par ces oiseaux. Comme *C. margaretae* est une espèce qui pousse particulièrement le long des creeks, un autre facteur possible qui augmenterait la dispersion des graines est le flux de l'eau qui emporte les graines et les disperse sur plusieurs centaines de mètres.

Une valeur de F_{st} significativement positive serait attendue entre les niveaux d'âge différents si :

- les jeunes ont des gènes venant de différentes populations,
- et/ou si les jeunes montrent une réduction marquée dans la diversité génétique relativement à la population parentale. L'absence d'une claire différenciation dans la population de Tiéa est alors cohérent avec la faible différenciation observée entre les populations.

V.3 – Analyse écologique

La structure spatiale d'un écosystème, c'est-à-dire la manière dont sont organisés dans l'espace les individus qui le composent, joue souvent un rôle essentiel dans son fonctionnement. Pour un peuplement forestier, par exemple, la structure spatiale détermine l'environnement local autour de chaque arbre (en particulier le nombre de voisins) et donc influence les processus naturels comme la croissance et la mortalité (Delvaux 1981, Barot et al. 1999), voire détermine le choix d'un scénario d'éclaircies pour les peuplements faisant l'objet d'une gestion sylvicole. La structure spatiale influence également le développement des graines et donc la régénération du peuplement. Inversement, les processus naturels ou les actions anthropiques modifient à leur tour la structure spatiale de ce peuplement.

D'après notre étude et l'étude floristique réalisée par l'IRD, il ressort que *C. margaretae* a une forte affinité pour les milieux humides et fermés de la forêt sclérophylle ; il a aussi une affinité pour les espèces *Wikstroemia indica*, *Eugenia SP.*, *Homalium deplanchei*, *Codiaeum peltatum* et *Passiflora suberosa*, *Diospyros erudita*, *Cupaniopsis Sp.*, et *eugenia sp 7152*.

D'après l'AFC sur les sites, il ressort que la forêt de Tiéa a une composition floristique hétérogène de forêt sèche et de forêt humide alors que Nékoro présente moins de variance floristique et a plutôt une composition floristique essentiellement de forêt sèche.

V.5 – Implications pour la gestion et la conservation

Une stratégie de réduction du risque d'extinction d'une espèce peut être bâtie en se basant sur les facteurs génétiques intra-spécifiques (Frankham *et al.*, 2002). La préservation de la diversité génétique intra-spécifique, considérée comme l'un des trois niveaux de la biodiversité, est ainsi recommandée par l'UICN

pour la conservation des espèces. L'évaluation de cette diversité est alors devenue un critère essentiel pour la gestion des espèces et le développement de plans de conservation efficaces (Newton *et al.*, 1999).

La conservation du *Captaincookia margaretae* s'avère assez simple pour deux raisons : 1) D'après notre étude, il ressort que l'espèce arrive encore à maintenir un niveau de diversité génétique assez élevé et une faible structure génétique spatiale. 2) Les conditions néo-calédoniennes sont favorables à la réussite d'un programme de conservation. En effet, malgré la situation d'urgence et la sérieuse dégradation des forêts sèches, ces dernières ne subissent pas certaines pressions fortes – notamment démographiques et économiques (hormis l'élevage) – connues dans d'autres parties du monde.

Il ressort de notre étude que les individus associés de Pindaï et de Metzdorf ressemblent génétiquement aux individus de la forêt de Nékoro. En cas disparition ou de forte réduction des forêts de Pindaï et de Metzdorf, une réintroduction à partir d'individus venant de Nékoro peut être envisagée sans crainte de perte de diversité génétique ni de pollution génétique.

Dans l'état actuel où le flux de gène semble satisfaisant *in situ* (importante dissémination du pollen et bonne reproduction sexuée), la conservation de *C. margaretae* est imputable à la protection de la forêt sèche. En effet un plan de gestion de la forêt sèche approprié et représentatif écologiquement, serait suffisant pour permettre une régénération naturelle de l'espèce.

Pour le *Captaincookia margaretae*, le Programme pluridisciplinaire de Conservation de Forêts tropicales sèches de la Nouvelle-Calédonie élaboré par les acteurs locaux et le WWF (World Wildlife Fund) semble adéquat pour répondre à terme à la problématique de conservation de cette espèce (Voir ci-jointe la présentation de la stratégie du programme).

VI – Conclusions et perspectives

La nature des menaces mettant en danger les forêts tropicales sèches de la Nouvelle-Calédonie sont d'origine anthropique (défriche agricole et feux) et biologique (espèces introduites envahissantes). L'étude écologique et génétique à l'aide de marqueurs microsatellites nucléaires du *Captaincookia margaretae* qui est une espèce caractéristique des forêts sclérophylles, contribue à l'amélioration des connaissances sur cet écosystème. Les résultats de cette étude peuvent être pris en compte dans la conservation et la gestion durable des forêts sèches.

Il a été mis en évidence que le *Captaincookia margaretae* révèle une forte diversité et une faible structuration génétiques. Ceci a permis de rendre compte de l'importance de l'effectif efficace des populations et de l'importance du flux de gène au sein et entre les populations. Nous concluons alors que les menaces d'extinction de cette espèce ne sont pas d'origine génétique mais viennent plutôt des menaces qui pèsent sur la forêt sclérophylle qui l'abrite.

Au cours de cette étude, il a été parallèlement mis en évidence que le *Captaincookia margaretae* est une espèce qui est affine des milieux humide et fermé de la forêt sclérophylle. Il a été mis en évidence aussi que la forêt de Tiéa a une composition floristique hétérogène de forêt sèche et de forêt humide, et que la forêt de Nékoro a composition floristique de forêt sèche.

L'association des résultats obtenus à l'aide des marqueurs microsatellites nucléaires et de l'analyse floristique des forêts de Tiéa et de Nékoro a permis de conclure les stratégies de gestion adaptées à la situation de *Captaincookia margaretae*.

Néanmoins, la mise en place d'un protocole d'extraction d'ADN propre au *Captaincookia margaretae* permettrait d'améliorer la qualité de l'ADN extrait et de là de pouvoir analyser tous les individus échantillonnés selon le plan précis de l'étude. Il serait en effet judicieux de poursuivre les travaux en intégrant tous les échantillons cela permettrait d'une part de consolider nos hypothèses et d'autre part de pouvoir mener certaines analyses (étude de la clonalité et de la structuration temporelle entre cohortes jeune et adulte) qui devaient être menées dans cette étude mais qui ne l'ont pas été à cause des problèmes rencontrés au cours de l'extraction et qui ont causé un déséquilibre dans les échantillons.

Références bibliographiques

- ADRAF (2000-2004), Centre d'initiation à l'Environnement, Etat, Institut Agronomique néo-calédonien, IRD, Université de la Nouvelle-Calédonie, WWF-France. Programme de Conservation Forêts tropicales sèche de la Nouvelle-Calédonie.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A and Bouvet JM (2005) Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Molecular Ecology*, **14**, 1979-1989.
- Bousquet J., Simon L., Lalonde M. (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forestry Research*, **20**, 254-257.
- Hallé N. (1973), Captaincookia, genre nouveau monotypique néocalédonien de Rubiaceae-ixoreae. *Adansonia ser.* **2**, **13** (2) 195-202. [2]
- Henry J.-P., Gouyon P.-H. (2003) Précis de Génétique des populations. DUNOD, Paris.
- Kelly B. A., Hardy J.O. & Bouvet J.-M. (2004) Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. *Molecular Ecology*, **13**, 1231 – 1240.
- Greth A. (1997) Emergency conservation measures for a critically endangered Global 200 Ecoregion : tropical dry forest on New Caledonia, Rapport WWF, France.
- Gillespie, T. W. & Jaffré (2003) Tropical dry forests in New Caledonia. *Biodiversity and Conservation*, **12**, 1687-1697.
- Guillot G., Mortier F. & Estoup A., (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology*, **5**, 712 – 715.
- Guillot G., Mortier F., Gosson J.-F. & Estoup A. (2005) A Spatial Statistical Model for Landscape Genetics. *Genetics* **170**, 1261 – 1280.
- Goreaud F. et Pélissier R. (2000) Analyse de la structure spatiale de semis de points hétérogènes : exemples d'application à des peuplements forestiers
- Frankham R. (1998) Inbreeding and Extinction: Island Populations. *Conservation Biology*, **12**, 665-675.
- Frankham R., Ballou J.D. & Briscoe D.A. (2002). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.
- Hardy, O. J. & Vekemans X. (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**, 618-620.
- Janzen D.H. (1988) Tropical dry forest. The most endangered major tropical ecosystem. *Biodiversity*, 130-137, in E. O. Wilson, editor, Washington: National Academy Press.
- Muriénne J. et al. (2005) Evolution on a shaky piece of Gondwana ; is local endemism recent in New Caledonia ?. *Cladistics* **21**, 2-7.
- Sanou H, Lovett PN, Bouvet JM (2005) Comparison of quantitative and molecular variation in agroforestry populations of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn) in Mali. *Molecular Ecology*, **14**, 2601-2610.

ANNEXE 1

- Serre J.-L. (1997) Génétique des populations, Modèles de base et applications, Editions Nathan.
- Sokal R.R. and Michener C.D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.*, **38**, 1409-1438.
- Tassin J. (2002) Rapport annuel. Multiplication d'espèces de forêt sèche en pépinière à des fins de restauration écologique.
- Vekemans X. & Hardy O. J. (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* **13**, 921 – 935.
- Verhaegen D. (2005) Rapport de mission en Nouvelle-Calédonie. Identification des peuplements existants et échantillonnage génétique de *Captaincookia margaretae*.

Pour des informations générales sur la Nouvelle-Calédonie et le *Captaincookia margaretae* consulter :

http://goutte.a.goutte.free.fr/rubrique/projets/caledofragile/dossier_forets_seches.htm

<http://www.endemia.nc/plante/fiche.php?code=610> [1]

<ftp://pbil.univ-lyon1.fr/pub/mac/ADE/ADE4/DocThemPDF/Thema81.pdf>

<http://www.foretseche.nc> [4]

Annexe 1-1

PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN DE CAPTAINCOOKIA MARGARETAETampon d'extraction :

Produits	Concentrations finales	Quantité pour un litre
Tris	100 mM	12.114 g
NaCl	1.4 M	81.82 g
EDTA	20 mM	40 ml de solution à 0.5 M
MATAB	2 %	20 g
PEG 6000	1 %	10 g

Dissoudre ces produits dans 800 ml d'eau pure

Ajuster à pH 8 avec de l'HCl 37 %

Compléter à un litre avec de l'eau pure

Autoclaver et conserver à température ambiante.

Préparation du tampon :

Extemporaneément préparer le volume de tampon nécessaire pour le nombre d'échantillons prévus et y ajouter du Sulfite de Na pour une concentration finale de 0.5 % .

Préchauffer + 7 ml du tampon d'extraction + sulfite de Na/400 mg feuilles à 65 °C

A partir d'une pesée de 400 mg de feuilles sèches

- 1) Broyage des feuilles dans des mortiers avec de l'azote liquide + 1 pointe de spatule de sable de fontainebleau
- 2) + 1 pointe de spatule de polyvidone 25
- 3) Rajouter 7 ml de Tp d'extraction 65°C dans le mortier
- 4) Transférer dans 1 tube de 13 ml
- 5) Incubation 1 h avec agitation au bain marie à 65 °C (les tubes sont immergés et couchés à l'horizontale)
- 6) Sortir les tubes du bain marie et laisser refroidir sur la paillasse quelques minutes (le chloroforme bout à 60-62°C)
- 7) + 5 ml de chloroforme / alcool isoamylique 24:1
- 8) Agitation douce à la main par inversion des tubes pendant environ 5 minutes
- 9) Centrifugation 15 minutes à 5000 rpm (Sigma 3-10, soit 4500 g)
- 10) Récupération des surnageants à la pipette à serum stérile et transvasement dans une nouvelle série de tubes de 13 ml stériles
- 11) + 5 ml de chloroforme / alcool isoamylique 24 :1
- 12) agitation douce à la main par inversion des tubes pendant environ 5 minutes
- 13) centrifugation 15 minutes à 5000 rpm (Sigma 3-10, soit 4500 g)
- 14) récupération des surnageants à la pipette à serum stérile et transvasement dans une nouvelle série de tubes de 13 ml stériles
- 15) + 1/10^{ème} du volume d'acétate de sodium 3 M pH=5 soit environ 650 µl
- 16) ajout de 5 ml d'isopropanol -4°C => agitation douce
- 17) Centrifugation 15 minutes à 5000 rpm (Sigma 3-10, soit 4500 g)
- 18) élimination du surnageant
- 19) + de 1 ml d'éthanol 70 % 4°C - Les ADN du même échantillon sont poolés
- 20) Transvasement dans 1 tube stérile de 1.5 ml
- 21) Centrifugation 5 minutes à 5000 rpm (Sigma 2K15, soit 1956 g) pour attacher les culots au fond des tubes
- 22) Elimination de l'éthanol en versant
- 23) 5 minutes au speed vac à température moyenne
- 24) + 200 µl d'eau pure stérile total (ne pas vortexer)
- 25) passage au bain marie à 65 °C pendant 30 minutes

Annexe 1-2

PCR MICROSATELLITES NUCLEAIRES
Captaincookia Margaretæ

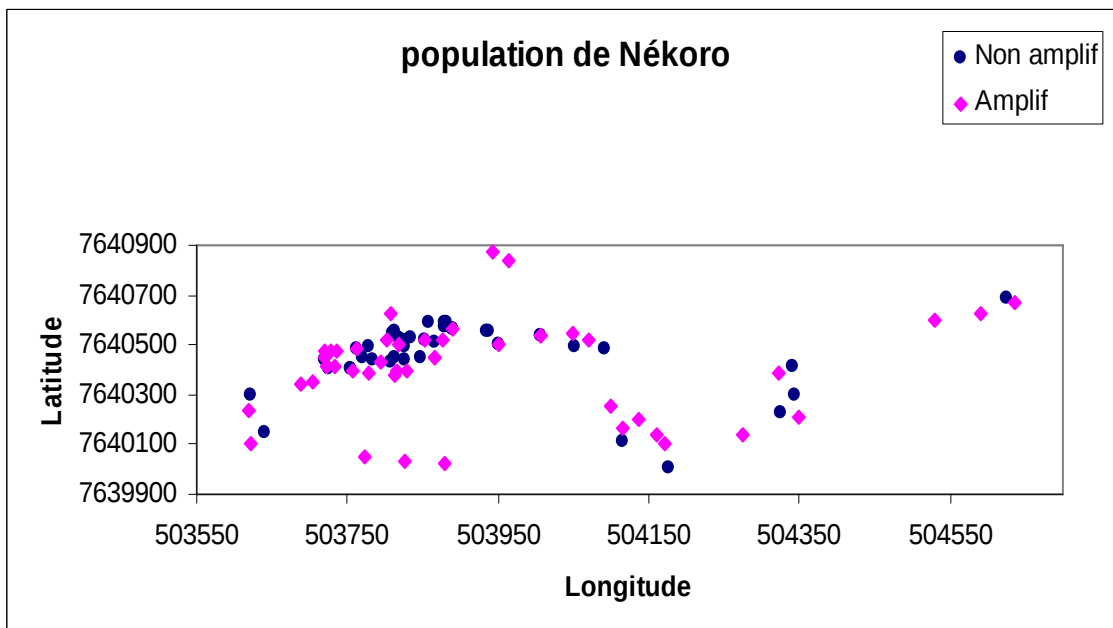
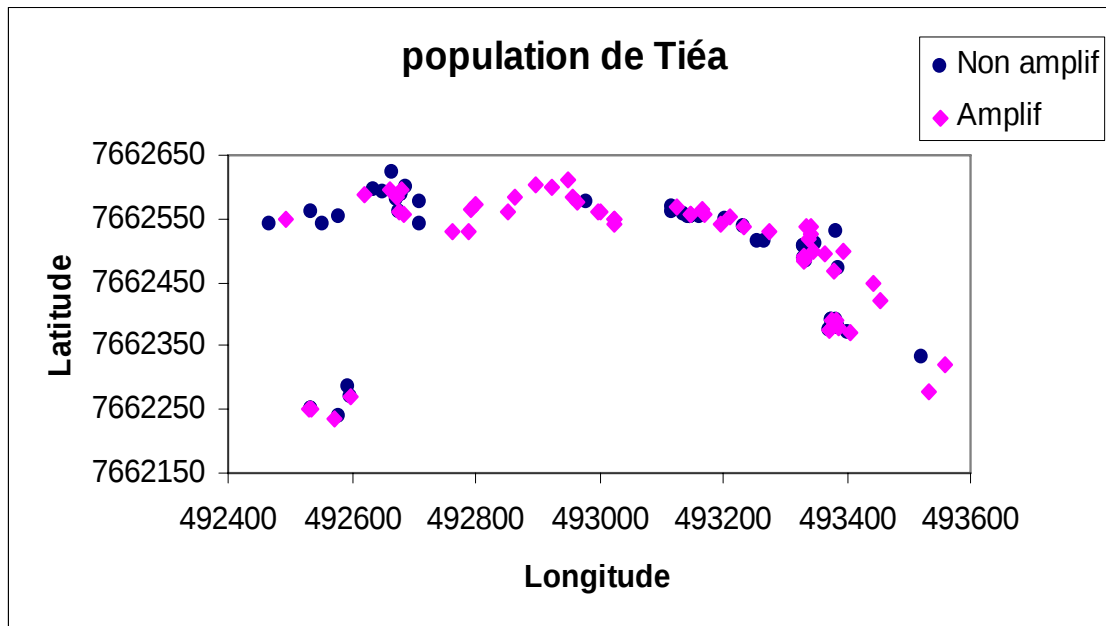
PREPARATION DES MELANGES REACTIONNELS
(VOLUME FINAL : 20 µL)

	µl pour 1 puit	µl pour 13 puits+2
Tampon 10 X CORE Kit Q-Biogene +MgCl₂ 1.5 mM	2	26
dNTPs Core Kit Q-Biogene 25 mM chaque (0,2 mM final)	0,16	2.08
Amorce Upper + queue M13, 10 µM (0,06 µM final)	0,12	1.56
Amorce Lower 10 µM (0,10 µM final)	0.2	2.6
Oligo M13 marqué 1µM (0,10 µM final)	2	26
Eau	9.28	120.64
Taq polymérase 5U/µL (1.2U total)	0,24	3.12
Total	14	182
ADN matrice 5ng/µL (30 ng total)	6	

CONDITIONS D'AMPLIFICATION

Appareil :	Eppendorf Mastercycler Gradient	Dénaturation	4 min	94 °C	30 cycles
		dénaturation	30 sec	92 °C	
		hybridation	30 sec	52 °C	
		élongation	1 min	72 °C	
Méthode :	MICROGRD	Inactivation	5 min	72 °C	

Annexe 1-3



Annexe 1-4

Préparation du gel d'Acrylamide

Démontage et nettoyage des plaques

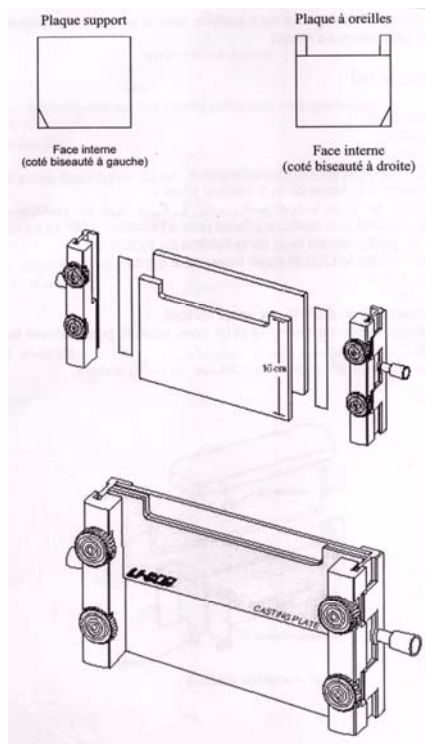
Il est d'usage de nettoyer le gel de la personne précédente

- Soulever le capot du séquenceur et démonter le gel en soulevant les plaques par les 2 oreilles
- Nettoyer le système dans la salle de coulage
- Dévisser les serre-joints, enlever les plaques, séparer les plaques en introduisant un coin entre les 2 plaques, dans la partie inférieure du gel et non pas supérieure plus fragile
- Retirer le gel en appliquant un papier absorbant sur la surface
- Nettoyer les plaques avec une éponge imbibée de NaOH 0.5M et laisser agir quelques min
- Rincer à l'eau du robinet, nettoyer au détergent, rincer à l'eau du robinet, puis à l'ED
- Sécher avec du papier absorbant
- Rincer à l'eau du robinet puis à l'ED tous les autres éléments : cuve supérieure, 2 serre-joints, les spacers

Montage des plaques

- Mettre un morceau de buvard bleu sur la paillasse, coté plastique contre la paillasse
 - Choisir une paire de plaques de 25 cm (plaques à oreilles+support portant le même numéro)
 - Nettoyer les 2 plaques à l'EtOH 90° (les plaques doivent être parfaitement propres, sans trace de polyacrylamide pour éviter un problème de lecture du laser du séquenceur)
 - Poser la plaque support sur une boîte à cône, repérer la face intérieure gravée INT en bas à droite
 - Poser les 2 spacers transparents (les blancs sont plus fins=>difficulté à insérer le peigne) de chaque coté, préalablement humectés avec un peu d'eau pour faciliter l'adhérence
 - Appliquer la plaque à oreilles
 - Insérer les 2 serre-joints **identiques** de chaque coté, s'assurer **que les oreilles du serre-joints sont au même niveau**, et serrer les vis de façon symétrique.
- On peut également utiliser des pinces. Dans ce cas, clipper 3 pinces de chaque coté.

ANNEXE 1



Préparation et coulage du gel

Les solutions stocks sont conservées à 4°C.

- Dans un bêcher, préparer un gel à 6.5% : 20 ml d'acrylamide/bisacrylamide (faire couler le long la paroi pour éviter la formation de bulles) + 25 µl de Temed + 175 µl d'APS 10%
- Agiter la solution en faisant lentement tourner le bêcher
- Desserrer légèrement les vis du haut du serre-joints, et incliner légèrement les plaques
- Couler le gel lentement mais sans interruption pour éviter la formation de bulles
- Arrêter dès que le gel atteint le bord inférieur des plaques et replacer rapidement les plaques à l'horizontal
- Placer un «surface former» pour former le puit
- Enlever l'excès de polyacrylamide autour du «surface former» avec du papier absorbant
- Si les plaques sont fixées avec des serre-joints, placer le « casting plate » et serrer les vis supérieures du serre-joints
- Si le gel est préparé la veille de la migration, couler le gel, laisser polymériser 45 min puis emballer chaque bord inférieur et supérieur avec du papier absorbant humidifié et envelopper le gel dans du parafilm. Laisser le gel sur la paillasse jusqu'au lendemain.

Installation du gel dans le séquenceur

- Desserrer les vis du serre-joints
- Enlever la « casting plate » et le « surface former »
- Enlever l'excès de polyacrylamide au niveau du puits
- Monter la cuve supérieure du séquenceur à la place de la casting plate
- Nettoyer les plaques à l'éthanol
- Placer les plaques dans la cuve inférieure du séquenceur (le bord inférieur du gel doit être à environ 0.5 cm du bord de la cuve)
- Préparer 1 litre de TBE 1X
- Remplir la cuve supérieure avec du TBE jusqu'à l'immersion du puit
- Nettoyer la zone de dépôt : mettre quelques gouttes de bleu dans le puit pour visualiser les déchets d'acrylamide restant et les enlever à l'aide d'une seringue et d'un cône spatulé
- Remplir la cuve inférieure avec du TBE1X jusqu'à l'inscription « fill in »
- Disposer le couvercle sur la cuve supérieure et brancher l'électrode

ANNEXE 1

- Fermer le capot du Licor

Lancer la prémigration : d'une durée de 45 min, elle sert à chauffer le gel et à aligner les lasers et la caméra qui coulissent sur un axe.

Conditions de migration

Dilution des produits PCR dans du bleu dénaturant :

- 1/15 pour les produits marqués avec l'oligonucléotide 700 nm ;
- Dénaturation 3 minutes à 94°C des produits et du marqueur de taille.

Paramètres de migration : 1500 V ; 35 mA ; 40 W ; pré-migration : 45 minutes sur séquenceur.

ANNEXE 2

Protocole d'extraction de l'ADN de <i>Captaincookia margaretae</i> par DOLEZEL-MATAB avec broyage à l'azote liquide
--

1. Peser environ 0,2g de feuilles lyophilisées et dénervurées, puis les déchirer en petits morceaux
2. **Broyer les feuilles** dans un mortier et de l'azote liquide + 1 pointe de spatule de sable (nettoyer le mortier et le pilon entre chaque échantillon avec du liquide vaisselle et une gratounette, rincer et sécher avec de l'alcool)
3. Transférer la poudre dans un tube Falcon de 13 ml
4. Ajouter 8 ml de tampon E (Dolezel), incuber 2h à T° ambiante avec agitation à 140 rpm
5. Centrifugation 20 min 4 000g et élimination du surnageant
6. Le culot est repris dans 6ml de tampon de lyse F (MATAB, frais : mélange du MATAB dans son tampon maximum deux jours avant).
- ⇒ A cette étape, on peut congeler les culots à - 20°C (prochaines étapes longues donc difficile de tout faire en une journée)
7. Réaliser la **lyse des noyaux** au bain-marie 65°C, 4h avec agitation manuelle toutes les heures
8. Ajouter 6 ml de chloroforme isoamylique (24/1 v/v) et agiter doucement par retournement pendant 5 min
9. Centrifuger 10min à 3000g et récupérer le surnageant
10. Ajouter 6 ml de chloroforme isoamylique (24/1 v/v) et agiter doucement par retournement pendant 5 min
11. Centrifuger 10min à 3000g et récupérer le surnageant
12. Ajouter 6 ml d'isopropanol à 4°C ($V_{\text{isoprop}} \geq 0,6 \text{ Vol}$) pour précipiter l'ADN
13. Centrifuger 5 000g, 15min. Eliminer le surnageant avec précaution et laisser le culot sécher en retournant les tubes sur du papier absorbant pendant quelques minutes
14. Reprise du culot dans 233 µl de solution D (= TE) et transférer le tout dans un tube Eppendorf de 1.5 ml
15. Purification par précipitation avec 23 µl de solution G (acétate de sodium 3M, pH 5,2) et 200 µl d'isopropanol
16. Centrifuger 2min à 14 000 g, et éliminer le surnageant
17. Ajouter 1ml d'éthanol 70 %
18. Centrifuger à 14 000, 2 min et éliminer le surnageant (attention au surnageant)
19. Séchage du culot 5 à 10min au speed-vac, puis reprise du culot dans 50 µl d'H₂O

MATERIEL :

Mortier et pilon

Tube Falcon 50 ml
Etuve 37°C

ANNEXE 2

SOLUTIONS :

Solution A : TRIS-HCl 1M pH 8

Produit	Conc	Fw/Stock	10 ml	500 ml	1 l
Tris-HCl	1 M				121,1 g
H ₂ O					qsp 950ml
HCl	PH 8	1 N			+/- 42 ml
H ₂ O					
PH 8, Autoclaver					

Solution C : EDTA 0,5M pH8

Produit	Conc	Fw/Stock	10 ml	500 ml	1 l
Na ₂ EDTA	0,5 M	372,24g/mol			186,12 g
H ₂ O					qsp 800ml
NaOH	PH 8	10 N			+/- 45 ml
H ₂ O					
PH 8, Autoclaver					

- Ajouter 45ml de soude à 10N, à ce stade, la solution est très laiteuse
- Laisser sous agitation magnétique 2 hr
- Ajuster le pH en ajoutant de la soude 10N progressivement (les temps de stabilisation du pH sont très lent et donc le pH peut varier brutalement sans aucun ajout de soude si vous allez trop vite)
- Quand tout l'EDTA est dissout et le pH ajusté, qsp 1 000ml avec de l'eau distillée
- Autoclaver

Solution D : 1 X TE

Produit	Conc	Fw/Stock	10 ml	500 ml	1 l
Tris-HCl pH 8	10 mM	1 M		5 ml	10 ml
Na ₂ EDTA pH 8	1 mM	0,5 M		1 ml	2 ml
H ₂ O					
PH 8, Autoclaver					

Solution E : Tampon DOLEZEL

Produit	Conc	Fw/Stock	10 ml	500 ml	1 l
Tris	15 mM				1,81 g
Na ₂ EDTA	2 mM				0,74 g
KCl	80 mM				5,96 g
NaCl	20 mM				1,17 g
H ₂ O					
PH 9, Autoclaver					
Avant utilisation :					
b-mercaptoethanol	0,2 %			1 ml	2 ml
Triton-X 100	0,5 %			2,5 ml	5 ml

Solution F : Tampon de lyse pH 8

Produit	Conc	Fw/Stock	10 ml	500 ml	1 l
Tris-HCl pH 8	0,1 M	1 M			100 ml
Na ₂ EDTA pH 8	0,02 M	0,5 M			40 ml
NaCl	1,25 M				73 g
H ₂ O					
PH 8, Autoclaver					
Avant utilisation :					
MATAB	4 %			20 g	40 g
b-mercaptoethanol	0,2 %			1 ml	2 ml

ANNEXE 2

Remarque : on ajoute le MATAB en premier dans le tampon chauffé et on le met sous agitation magnétique car il est difficile à dissoudre ; une fois la solution refroidie, on rajoute le Béta-mercaptoéthanol

chloroforme isoamylique (24/1 v/v)

- 240 ml de chloroforme
- 10 ml d'alcool isoamyl

RNASE A (10mg / ml)

2000 U/ml, 10 mg / ml dans 0,12 M NaCl, 0,015 M trisodium citrate

chauffer à 100°C pendant 15 min avant utilisation pour éliminer toute activité de DNase résiduelle

isopropanol à 4°C

Solution G : Tampon d'acétate de sodium 3M pH 5.2

Produit	Conc	Fw/Stock	10 ml	500 ml	1 l
acétate de sodium	3 M				408,1 g
H ₂ O					Qsp 700 ml
Acide acétique glacial	PH 5,2				
H ₂ O					
Autoclaver					