

TABLE DES MATIERES

Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	7
INTRODUCTION	11
1- CADRES CONCEPTUELS ET OBJECTIFS	15
1.1 Le CIRAD : un organisme de recherche au service du développement durable	15
1.1.1 Objectifs.....	15
1.1.2 Organisation	15
1.1.3 L'UMR PVBMT.....	17
1.2 L'île de la Réunion : un cadre d'étude adapté au suivi des processus évolutifs des espèces.....	17
1.3 Apport des marqueurs microsatellites dans l'étude de la dynamique spatio-temporelle de la végétation	21
1.3.1 Définition	21
1.3.2 Utilisation des marqueurs microsatellites.....	21
1.3.3 Intérêt des microsatellites chloroplastiques	23
1.4 La phylogéographie en milieu insulaire : état de l'art scientifique	25
1.4.1 Notions sur les processus évolutifs	25
1.4.2 Diversité et structuration génétique	29
1.4.3 Phylogéographie des arbres tropicaux.....	31
1.5 Objectifs de l'étude	33
2- MATERIEL ET METHODES.....	37
2.1 Matériel biologique et site d'étude	37
2.1.1 Les forêts de l'île de la réunion	37
2.1.2 Les Sapotacées, espèces structurantes des forêts réunionnaises	39
2.2 Echantillonnage.....	45
2.3 Méthodes d'analyses moléculaires et marqueurs microsatellites chloroplastiques	45
2.3.1 Extraction de l'ADN.....	45
2.3.2 Marqueurs microsatellites chloroplastiques.....	47

2.3 Analyse des données.....	49
2.3.1 Détermination des haplotypes.....	49
2.3.2 Distribution géographique des haplotypes.....	49
2.3.3 Réseau haplotypique	49
2.3.4 Structuration spatiale de la diversité génétique et phylogéographie.....	51
3 – RESULTATS.....	57
3.1 Génotypes et détermination des haplotypes	57
3.2 Structuration spatiale des haplotypes	59
3.3 Diversité génétique, structures génétiques et phylogéographique.....	65
3.4 Isolement et structure génétique spatiale : l'étude du coefficient d'apparentement de Loiselle.....	65
3.5 Visualisation de la structure génétique spatiale : définition de nouveaux groupes de population.....	67
3.6 Isolement et différenciation génétique entre régions : résultats des amova	69
4- DISCUSSION	71
4.1 Généralités sur les diversités génétiques et haplotypique.....	71
4.2 Remise en cause de l'hypothèse effet fondateur sur le massif récent du Piton de la Fournaise.....	73
4.2.1 Différenciation entre régions	73
4.2.2 Structure génétique et patron phylogéographique / Isolement et différenciation génétique.....	75
4.2.3 Hypothèse d'un patron de colonisation de l'île par <i>S. majus</i>	75
Conclusion	87
Perspectives.....	91
Bibliographie	91
Annexes	101
Glossaire et abréviations.....	137

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Contexte géodynamique de l'île de la Réunion	18
Figure 2 : Modèle numérique de terrain à 25m de la partie émergée de l'île de la Réunion.	20
Figure 3 : Carte de la végétation de l'île de la Réunion	20
Figure 4 : Modèle de glissement de la polymérase lors de la réplication d'une séquence microsatellite.....	22
Figure 5 : Schémas de spéciation sympatrique et allopatrique	28
Figure 6 : Cartes de la végétation indigène avant la colonisation humaine et aujourd'hui	36
Figure 7 : Arbre et fruits de <i>S. majus</i> et <i>M. balata</i>	40
Figure 8 : Arbre et fruits de <i>L. calophylloides</i> et <i>S. borbonicum</i>	42
Figure 9 : Carte des sites échantillonnés.....	44
Figure 10 : Illustration de la correspondance entre les phylogénies des haplotypes et leur distribution géographique.....	54
Figure 11 : Distribution spatiale des fréquences haplotypiques de <i>S. majus</i> par population.	60
Figure 12 : Réseau d'haplotypes réalisé en appliquant l'algorithme median-joining du logiciel Network.....	61
Figure 13: Coefficient d'apparement de Loiselle pour les quatre espèces de Sapotacées. <i>S. majus</i> <i>M. balata</i> : <i>L. calophylloides</i> et <i>S. borbonicum</i>	64
Figure 14 : Carte de répartition spatiale des populations de <i>S. majus</i> détectées par Geneland en fonction des ressemblances entre haplotypes.	66
Figure 15 : Identification des éléments majeurs du relief matérialisés par des traits noirs ...	78
Figure 16 : Carte des zones définies en fonction du relief et du réseau hydrographique.....	78
Figure 17 : Hypothèse de zones d'aires de répartition des populations de <i>S. majus</i>	80
Figure 18 : Cartographie des populations hypothétiques de <i>S. majus</i> et <i>M. balata</i>	81
Figure 19 : Barrières naturelles principales au flux de gènes pour <i>S. majus</i>	80
Figure 20 : Réseau hydrographique de l'île de la Réunion.....	80
Figure 21 : Schéma de l'hypothèse de la colonisation de l'île de la réunion par <i>S. majus</i>	86
Figure 22 : Répartition des centres de diversité chez <i>S. majus</i>	87

La significativité des résultats est donnée par des astérisques * dans les figures, avec la convention suivante :

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Echantillonnage

Tableau 2 : Description des trois mix d'amorces

Tableau 3 : Conditions des réactions de l'amplification des régions micro satellites

Tableau 4 : Caractéristiques des 15 amorces chloroplastiques utilisées

Tableau 5 : Polymorphisme des loci retenus selon les espèces

Tableau 6 : Diversité et différenciation génétique

Tableau 7 : Différenciation génétique à différentes échelles de populations

Rapport-Gratuit.com

INTRODUCTION

Dans le contexte actuel de la crise de la biodiversité, (pertes de biodiversité comparables à celles que la Terre a connues au cours des cinq extinctions majeures du Phanérozoïque d'après Leakey & Levin (1995), les scientifiques s'attachent à étudier les facteurs responsables de l'origine, du maintien et de la diminution de la diversité biologique. Détecter l'origine de la diversification du vivant pourrait en effet s'avérer capital pour la mise en œuvre des plans de conservation de la biodiversité, car à défaut d'une conservation intégrale de la biodiversité, on pourrait protéger en priorité certains centres de diversification, considérés comme essentiels aux écosystèmes, d'un point de vue patrimonial, fonctionnel ou économique, selon les objectifs des gestionnaires.

En étudiant la diversité du vivant à l'échelle moléculaire, l'analyse des processus évolutifs des espèces devient plus fine et plus complexe. En effet, le développement des techniques de biologie moléculaire (marqueurs microsatellites notamment) utilisées en génétique des populations, permet aujourd'hui d'étudier l'évolution de la variation génétique dans le temps et dans l'espace, pour mieux comprendre la dynamique des espèces. Il est alors possible de mettre en évidence une structuration génétique au sein des aires de répartition des espèces et d'inférer les processus de dispersion ayant conduit à la diversité inter et intra spécifique observée actuellement. En bref, l'étude de la génétique des populations dans la conservation a pour intérêt de définir de manière objective des unités de gestion et des unités évolutives significatives pour une meilleure survie des populations et de proposer des plans d'aménagement à court et long terme (Brooks et al. 2006).

C'est dans cette optique que s'inscrit la thèse de Stéphanie Dafreville « **Dynamique de dispersion d'espèces structurantes des écosystèmes forestiers, les Sapotacées, à différentes échelles spatiales et temporelles** » intégrée au projet GECOVA financé par la région Réunion. Stéphanie poursuit sa deuxième année de thèse au CIRAD de St Pierre (Réunion) sous la direction de Marie Hélène Chevallier, chercheuse en génétique. La thèse comporte 2 axes principaux de réflexion :

- l'étude des relations phylogénétiques entre les espèces de Sapotacées de l'archipel des Mascareignes dans le but de retracer l'histoire de la colonisation des Sapotacées dans ces îles. Existe-t-il des connections intra ou inter spécifiques entre les îles, résultant de processus évolutifs passés (différenciation et/ou spéciation) et pouvant expliquer la distribution actuelle des Sapotacées de l'archipel des Mascareignes ?

- l'étude de la diversité génétique des Sapotacées à l'échelle de la Réunion afin de dégager d'éventuelles structurations spatiales, résultant des différentes voies de colonisation empruntées par l'espèce

L'île de la Réunion est un site particulièrement bien adapté à l'étude de l'évolution des espèces de par son caractère insulaire et son appartenance à l'archipel des Mascareignes, formations volcaniques relativement récentes (datées du Pliocène i.e. quelques millions d'années). En outre, Madagascar et les archipels des Comores, Seychelles et Mascareignes, dont fait partie la Réunion, sont considérées comme un des 34 hotspots de biodiversité mondiale (cf. annexe 1) Myers et al. (2000), ce qui explique l'intérêt écologique qu'elles suscitent. Un hot spot est un centre de fort endémisme très menacé.

L'objet de mon stage, centré sur le deuxième axe de la thèse, concerne **la phylogéographie de *Sideroxylon majus* à l'échelle de la Réunion**, espèce structurante des forêts de la Réunion, menacée d'extinction. Afin d'apporter des éléments complémentaires nécessaires à l'étude de la dynamique de *S. majus*, l'analyse de la structuration spatiale des trois autres espèces de Sapotacées de l'île, *Mimusops balata*, *Sideroxylon borbonicum* et *Labourdonnaisia calophylloides* sera également abordée, mais de manière plus succincte. La phylogéographie se définit comme l'étude des relations entre la phylogénie de variants (déterminés à l'aide de marqueurs moléculaires, de types microsatellites dans notre cas) et leur distribution géographique, afin de vérifier si les populations les plus proches géographiquement le sont aussi phylogénétiquement (Avice, 1987). Ces informations servent à délimiter des foyers d'individus semblables d'un point de vue génétique, à partir desquels il est possible d'envisager des scénarios de colonisation de l'espace par les Sapotacées et de mettre en évidence les différenciations intra et inter spécifiques qui en découlent. En résumé, la phylogéographie intègre l'information géographique et génétique pour inférer l'histoire démographique et les processus évolutifs des espèces.

Les premières études phylogénétiques menées sur l'espèce *S. majus* et basées sur le polymorphisme du marqueur microsatellite chloroplastique NTCP3, ont suggéré que cette espèce s'est installée en deux temps sur l'ensemble de l'île, avec probablement un effet fondateur sur le massif récent du Piton de la Fournaise (Dafreville, 2010). Les données appuyant cette hypothèse sont en annexe 2. L'objectif principal de mon stage est de confirmer ou non cette hypothèse, en augmentant le nombre d'amorces microsatellites chloroplastiques utilisées et en comparant la variabilité génétique chez trois autres espèces de Sapotacées : *M. balata*, *L. calophylloides* et *S. borbonicum* (*borbonicum* et *capuronii*). Cette étude soulève plusieurs questions :

- Comment le patrimoine génétique est-il distribué au sein de l'île ? Existe-t-il une structure génétique spatiale inter et intra spécifique ?
- Quels sont les facteurs environnementaux pouvant expliquer la diversité génétique ?

1- CADRES CONCEPTUELS ET OBJECTIFS

1.1 LE CIRAD : UN ORGANISME DE RECHERCHE AU SERVICE DU DEVELOPPEMENT DURABLE

1.1.1 OBJECTIFS

Le CIRAD est le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. C'est un établissement public à caractère industriel et commercial, placé sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du ministère des Affaires étrangères et européennes.

La mission première du CIRAD est de « contribuer au développement rural des régions chaudes, par des recherches et des réalisations expérimentales, principalement dans les secteurs agricoles, forestiers et agroalimentaires », conformément à son statut défini par le décret du 5 juin 1984.

Le CIRAD a le statut d'établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) c'est-à-dire que la comptabilité et la gestion du personnel dépendent du droit privé bien qu'il soit sous le contrôle de l'Etat. Une partie de ses budgets provient directement de fonds publics (les deux tiers) et le reste des financements doit être trouvé par le CIRAD. Le budget annuel est de 208 millions d'euros (chiffre de 2010). Ses activités s'inscrivent dans le programme « Recherche dans le domaine de la gestion des milieux et des ressources » de la loi de finances de l'Etat.

1.1.2 ORGANISATION

Le CIRAD a son siège social à Paris. Le plus grand centre de recherche se trouve à Montpellier où travaillent 1100 personnes dont 600 chercheurs. Ce centre est en plus incorporé dans un ensemble scientifique plus vaste : Agropolis International. Le CIRAD est également présent dans les DOM (Guadeloupe, Martinique, Guyane, Réunion, Mayotte qui deviendra un DOM en 2011), et dans une cinquantaine de pays au total. Il a des activités en partenariat avec plus de 90 pays. En tout, il y a 1800 agents, dont 800 chercheurs.

Le fait que le CIRAD possède des centres de recherche dans de nombreux pays lui permet d'être au plus près des acteurs locaux et des administrations des pays concernés. Néanmoins, cela entraîne aussi des lourdeurs et des délais pour toutes les démarches administratives qui doivent bien souvent repasser par le centre de Montpellier.

Le CIRAD-Réunion est organisé en trois pôles de recherche :

- Le **pôle de protection des plantes (3P)**, composé de quatre partenaires : l'Université de la Réunion, le Service de la Protection des Végétaux, la Direction de l'Agriculture et de la Forêt (responsable des contrôles phytosanitaires aux frontières), et la Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles

(syndicat professionnel agricole). Le CIRAD et l'Université sont regroupés au sein de l'UMR « **Peuplements végétaux et bio-agresseurs en milieu tropical** » (PVBMT). C'est au sein de cette UMR que j'ai effectué mon stage.

- Le pôle qualité des productions agricoles et alimentaires tropicales (KAPPA), qui a pour but de construire des itinéraires techniques garantissant la qualité et la traçabilité des produits, du producteur au consommateur.

- Le pôle risque environnemental, agriculture et gestion intégrée des ressources (REAGIR) qui étudie les interactions entre développement agricole et milieu naturel et le contexte social dans lequel elles s'insèrent.

1.1.3 L'UMR PVBMT

L'UMR est structurée en cinq équipes de recherche au sein de trois champs thématiques : génomique et épidémiologie des agents pathogènes émergents, complexe d'espèces et gènes d'intérêt, **dynamiques écologiques en milieux insulaires** (c'est le champ thématique qui nous concerne).

Le service qui m'accueille est constitué d'une chercheuse en génétique, Marie-Hélène Chevallier, d'un maître de conférences, Olivier Flores, de deux techniciens, Éric Rivière et Gérard Lebreton et d'une thésarde, Stéphanie Dafreville, qui a supervisé mon stage. Le responsable de l'équipe, Thierry Pailler, est maître de conférences à l'Université de la Réunion.

Lors des sorties terrain pour la collecte d'échantillons, j'étais accompagné de Gérard et/ou Eric. Stéphanie m'a initié aux manipulations en laboratoire (PCR, électrophorèses, génotypage) et m'a aidé à analyser et interpréter les résultats. Enfin, Marie Hélène, en tant que chef d'équipe, a veillé au bon déroulement global de mon stage (cadre des objectifs, suivi de l'état d'avancement, ambiance générale au sein de l'équipe...)

1.2 L'ILE DE LA REUNION : UN CADRE D'ETUDE ADAPTE AU SUIVI DES PROCESSUS EVOLUTIFS DES ESPECES

La Réunion est une **île volcanique** du Sud-Ouest de l'Océan Indien, située à 21°10'S – 53°30'W, à environ 700 km à l'Est des côtes malgaches. Elle est le dernier maillon des séries volcaniques du Nord de l'Inde (séries les plus récentes à 99 et 83.5 Ma) des Trapps du Deccan (66-65 Ma), des Lacadives, des Maldives (60 Ma), de Chagos (50-40 Ma) et du plateau des Mascareignes (30 Ma). (Fig. 1) (Duncan, 1981 ; Morgan, 1981 ; Courtillot et al., 1986).

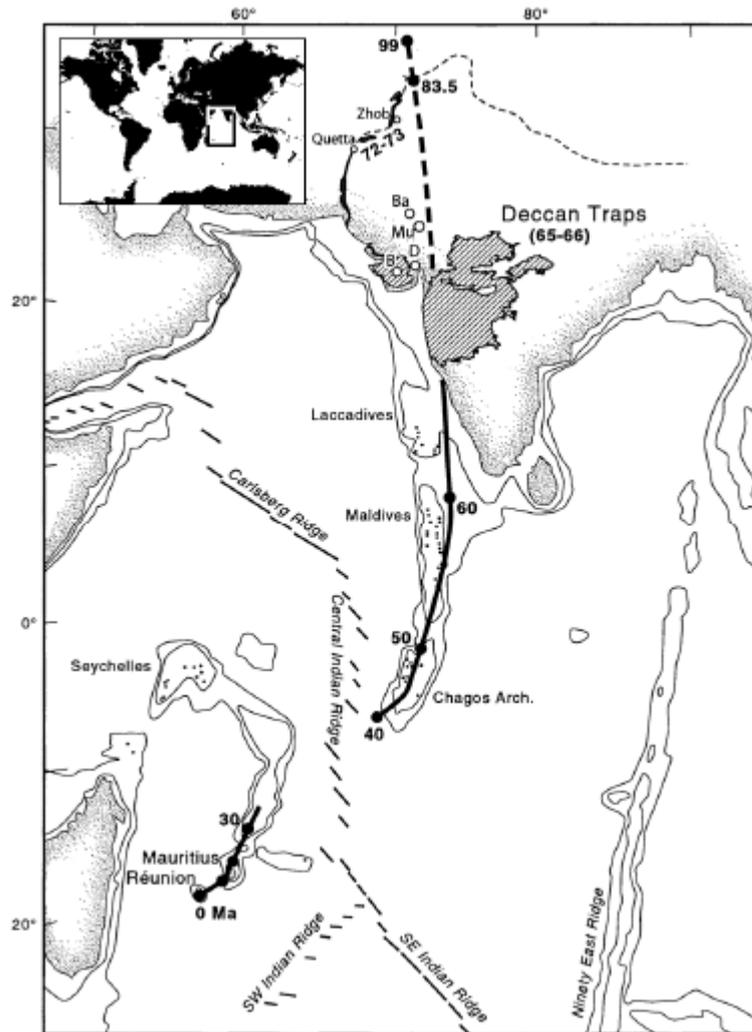


FIGURE 1: CONTEXTE GEODYNAMIQUE DE L'ILE DE LA REUNION (LES AGES DONNES SONT EN MILLIONS D'ANNEES)

L'île est constituée de deux volcans, le Piton de la Fournaise encore en activité, et le Piton des Neiges. A ces deux édifices, s'ajoute un troisième volcan ; le volcan des Alizés. (cf. fig. 2). De **profondes ravines et des cours d'eau** cisailent les versants de ces formations géologiques, et des lignes de crêtes se dessinent à partir des cratères des volcans.

Le fort gradient altitudinal et les conditions climatiques variées ont favorisé la formation de **nombreuses niches écologiques** et par conséquent le développement d'une multitude d'espèces, formant des écosystèmes uniques (cf. fig. 3). Ainsi, avec encore 30% d'habitats indigènes peu ou pas perturbés par l'homme (contre seulement 5% à l'île Maurice) (Strasberg et al., 2005), la Réunion représente l'île la mieux conservée de l'archipel des Mascareignes. On y dénombre 836 taxons indigènes dont 232 espèces végétales sont connues uniquement dans l'île, ce qui représente un taux d'endémisme strict de 28 % pour la flore vasculaire (CBNM, 2008).

Le **caractère insulaire** de la Réunion offre des perspectives intéressantes en biologie évolutive dans le sens où il nous est plus aisé d'observer et interpréter les processus écologiques ayant conduit à la mise en place d'une telle biodiversité sur un territoire d'une taille relativement réduite, et dont les histoires écologique et géologique sont fortement imbriquées avec celles des autres formations géologiques de l'archipel des Mascareignes.

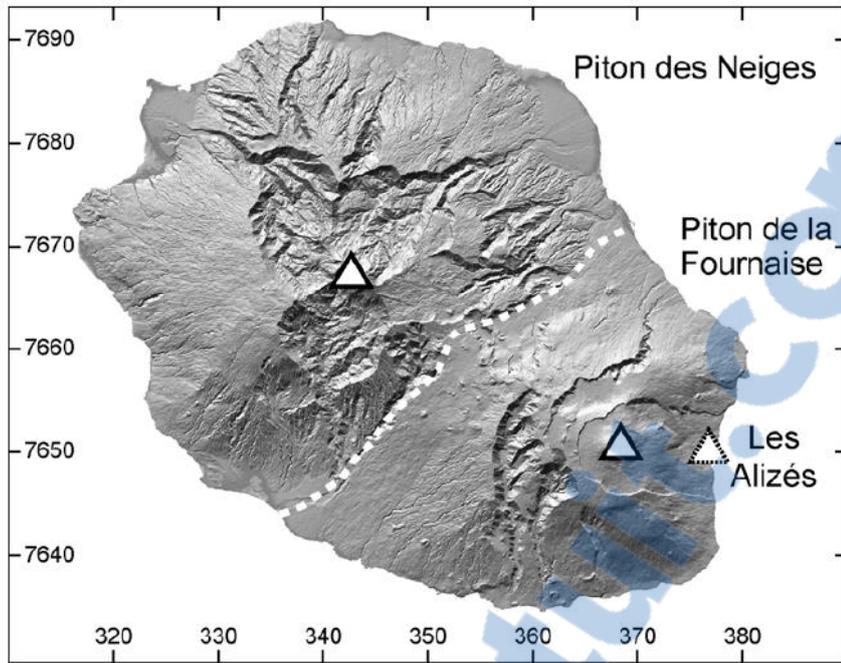


FIGURE 2 : MODELE NUMERIQUE DE TERRAIN A 25M DE LA PARTIE EMERGEE DE L'ILE DE LA REUNION. UNITES KILOMETRIQUES EN UTM 40. LA LIGNE BLANCHE POINTILLEE MARQUE LA FRONTIERE ENTRE LES DEUX GROUPES GEOLOGIQUES MODELES PAR LE PITON DES NEIGES ET LE PITON DE LA FOURNAISE. DONNEES IGN

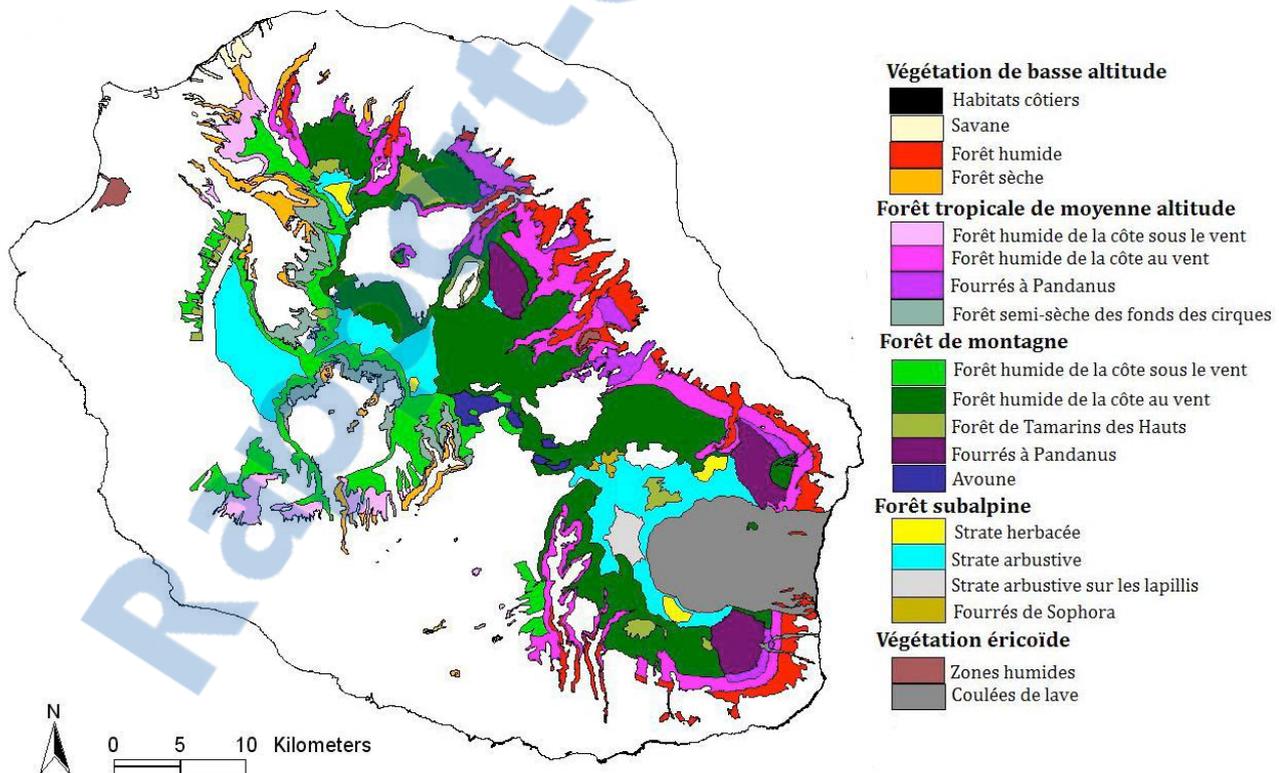


FIGURE 3 : CARTE DE LA VEGETATION DE L'ILE DE LA REUNION (TIREE DE STRASBERG ET AL., 2005)

1.3 APPORT DES MARQUEURS MICROSATELLITES DANS L'ETUDE DE LA DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DE LA VEGETATION

1.3.1 DEFINITION

Les microsatellites (ou SSR: Simple Sequence Repeats) sont des segments d'ADN constitués de nombreuses répétitions en tandem d'une séquence de 2 à 10 paires de bases à « motif » court. Ils sont abondants dans le génome et souvent rencontrés dans les régions non codantes. Les microsatellites appartiennent à la classe de marqueurs VNTR (Variable Number of Tandem Repeat). En effet, ils présentent un degré de polymorphisme très élevé, basé sur le nombre d'unités de répétitions, ce qui en fait de très bons marqueurs moléculaires.

1.3.2 UTILISATION DES MARQUEURS MICROSATELLITES

Actuellement, l'étude des marqueurs microsatellites constitue une des méthodes les plus performantes en génétique des populations du fait de trois de leurs propriétés, essentielles au suivi de l'évolution d'une espèce. En effet, ils sont :

- **neutres** vis-à-vis de la sélection (1)
- très **polymorphes** (2)
- **codominants** (3)

(Zane *et al.*,2002).

(1) Les marqueurs situés dans des régions codantes vont être soumis à la sélection de par le fait que les gènes vont conférer ou non un avantage sélectif à l'individu considéré. L'utilisation de marqueurs sous effets de la sélection pourrait alors masquer la structure des populations, puisque seuls les allèles* ayant été sélectionnés seront conservés (Kaeuffer, 2008). Les microsatellites, étant retrouvés au niveau des régions non codantes du génome, échappent aux contraintes sélectives, le polymorphisme de leurs séquences est alors retrouvé à la descendance, ce qui permet une bonne appréciation de l'évolution des microsatellites.

(2) La variabilité élevée des séquences microsatellites (i.e. le polymorphisme) peut s'expliquer par un mécanisme intervenant lors de la réplication de l'ADN : le glissement de la polymérase provoquerait un ré appariement décalé des brins du fait du caractère répété des séquences nucléotidiques. Cf. fig. 4

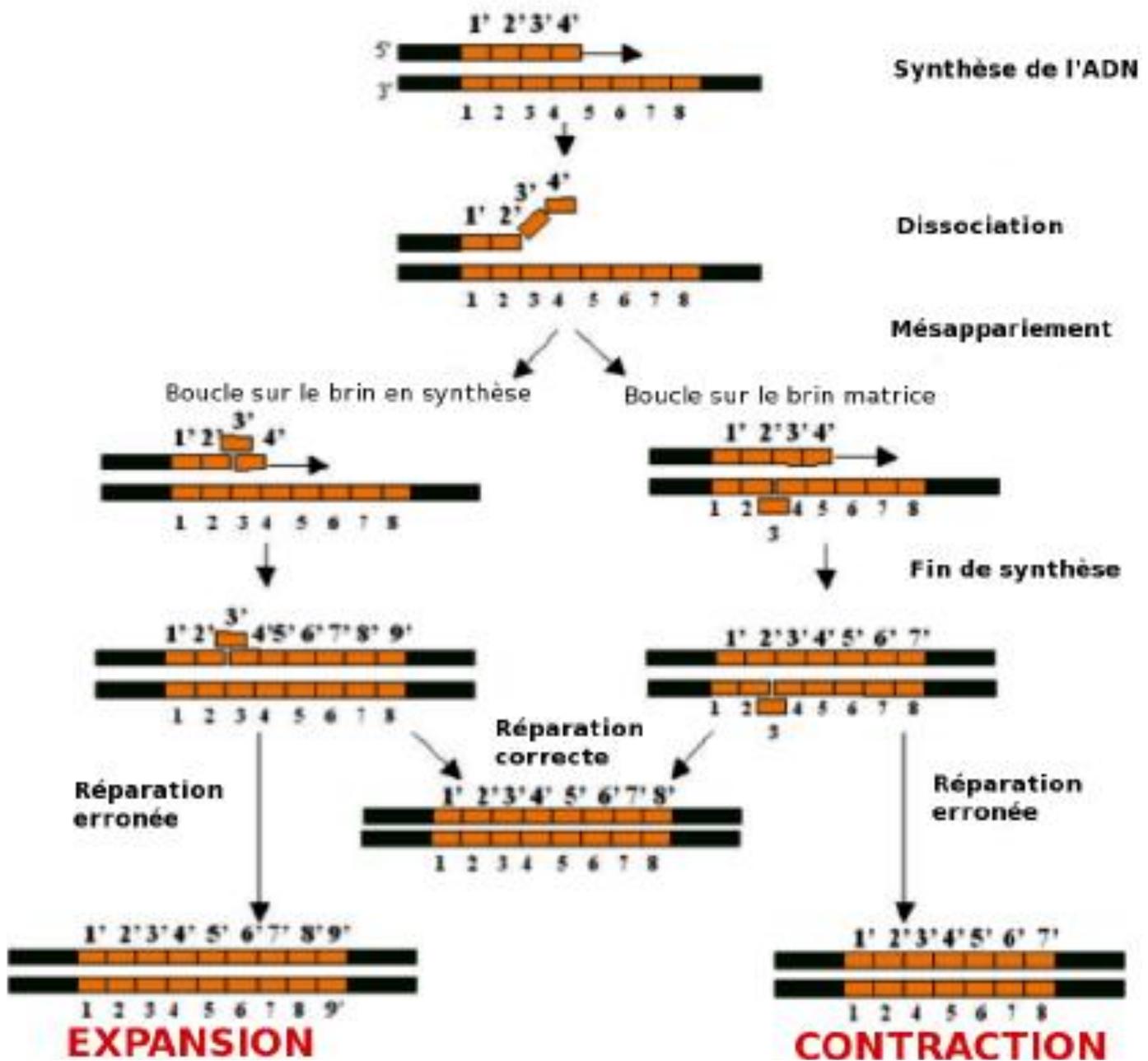


FIGURE 4 : MODELE DE GLISSEMENT DE LA POLYMERASE LORS DE LA REPLICATION D'UNE SEQUENCE MICROSATELLITE. CHAQUE NUMERO CORRESPOND A UNE REPETITION D'UN MOTIF MICROSATELLITE. D'APRES LECLERC, 2007.

(3) La codominance d'un marqueur est intéressante lorsque la population étudiée est diploïde puisqu'on peut alors distinguer les hétérozygotes des homozygotes, et donc approfondir les analyses. Dans notre cas, cette propriété n'est pas utile puisque notre étude se porte sur l'ADN chloroplastique qui ne possède qu'un seul brin.

Le polymorphisme de taille des microsatellites apporte différentes informations : Outre le fait de déterminer les différents génotypes dans une même population, il est possible d'avoir un aperçu des événements mutationnels passés en comparant deux séquences microsatellites ; plus la différence de taille est grande entre les allèles, plus il devrait y avoir d'évènements de mutations depuis l'ancêtre commun, ce qui correspond à une mémorisation des mutations antérieures (Hardy et al., 2003).

En résumé, la précision apportée par ces marqueurs permet de détecter s'il existe des populations en cours de différenciation et isolées géographiquement ou écologiquement (Cosson et al. 2006), d'où leur utilisation en biologie évolutive.

1.3.3 INTERET DES MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES

Les marqueurs chloroplastiques constituent donc un outil idéal dans les études de génétique des populations et en particulier pour la phylogéographie. En effet, contrairement aux marqueurs nucléaires, les marqueurs chloroplastiques montrent généralement une forte structuration géographique chez les plantes (Petit et al., 1993).

En effet, les génomes chloroplastiques sont à **hérédité maternelle chez les angiospermes**, ce qui facilite l'étude des voies de colonisations de l'espèce, puisque les flux de gènes, limités à la dispersion des graines, sont par conséquent réduits (i.e. les flux de pollen n'interviennent pas dans l'étude). L'analyse du polymorphisme dans les génomes transmis uniquement par les graines nous autorise ainsi à retracer les voies de recolonisation suivies par les "lignées" représentant différents centres de diversité génétique.

En outre, contrairement au génome nucléaire et mitochondrial, l'ADN chloroplastique (ADNcp) ne subit **pas de recombinaison** lors de la méiose facilitant ainsi la reconstruction de la généalogie des différents variants génétiques. Malgré un **taux de mutation beaucoup plus faible que l'ADNnc**, et donc une évolution plus lente que le génome nucléaire, l'ADNcp permet d'effectuer des études de phylogéographie intra spécifique chez les arbres forestiers. Enfin d'un point de vue pratique, l'ADNcp est abondant dans les cellules, ce qui facilite l'optimisation de la réaction d'amplification des séquences chloroplastiques.

Ces propriétés font de l'ADNcp le marqueur de prédilection pour la phylogéographie surtout pour les espèces à dispersion de graines limitée en raison de la faible mobilité de l'agent de dispersion (gravité, petits oiseaux ou mammifères...) telles que les Sapotacées (Koffi, 2010).

Cependant, comme le précise Guillaume Koffi, 2010, dans sa thèse, il peut y avoir des obstacles à l'exploitation des séquences d'ADNcp. En effet, des études basées sur le polymorphisme de longueur des microsatellites de l'ADNcp ont révélé des réseaux avec des **haplotypes homoplasiques**. L'homoplasie se définit par des haplotypes identiques par état mais non issues d'ascendants communs.

1.4 LA PHYLOGEOGRAPHIE EN MILIEU INSULAIRE : ETAT DE L'ART SCIENTIFIQUE

La phylogéographie se définit par l'étude de la distribution géographique des populations d'une espèce, ou d'espèces proches, par la reconstitution de leur phylogénie. Par suite, cette approche permet de décrire l'évolution des espèces et déceler d'éventuels processus de spéciation en cours. Il semble donc nécessaire auparavant de faire le point sur les définitions du concept d'espèce et les mécanismes de différenciation et spéciation.

1.4.1 NOTIONS SUR LES PROCESSUS EVOLUTIFS

LA SPECIATION

La notion de spéciation n'est pas encore clairement définie du fait de la difficulté à délimiter le concept d'espèce et donc à identifier l'émergence de nouvelles espèces.

NOTION D'ESPECE

La définition d'espèce ne peut être absolue puisqu'il existe un continuum de degrés de séparation du vivant en entités distinctes (Kobmoo, 2009). Cette ambiguïté a amené les scientifiques à considérer le concept de l'espèce en trois sous notions : la notion d'espèce taxonomique, d'espèce évolutive et d'espèce biologique.

L'espèce taxonomique (ou morphologique) est la plus intuitive puisqu'elle réunit tous les individus possédant des caractères morphologiques semblables (Bray, 2009).

L'espèce évolutive se base aussi sur les caractères morphologiques mais inclue la notion d'histoire évolutive commune à un ensemble de populations fossiles. Il s'agit alors ici de classer le « vivant » des temps passés.

C'est la troisième définition de l'espèce qui intègre le mieux les processus de spéciation. En effet, l'espèce biologique définit les espèces comme des «groupes de populations reproductivement isolées les unes des autres par des mécanismes d'isolement » (Kobmoo, 2009).

Le concept de spéciation est intimement lié à celui d'évolution des espèces. L'un des fondements de la théorie moderne de l'évolution est la théorie de la sélection naturelle introduite par Darwin en 1859. Cependant, cette théorie a fait l'objet de nombreuses controverses. Les critiques sont portées sur le fait que la sélection naturelle ne peut expliquer à elle seule l'évolution des espèces puisque les espèces constituent souvent des unités biologiques discrètes alors que la sélection naturelle est censée conduire l'évolution de manière graduelle. La spéciation pourrait donc être découplée de la sélection naturelle et comportait des étapes non adaptatives.

Afin d'affiner la théorie darwinienne, les recherches sur la spéciation se basent maintenant sur la notion d'**espèce biologique** et portent donc sur les mécanismes à l'origine de l'**isolement reproducteur**. La spéciation pourrait alors se définir comme «le processus évolutif par lequel des espèces biologiques distinctes apparaissent à partir d'un ancêtre commun» (Kobmoo, 2009).

LA DIVERSIFICATION

On définit une diversification comme tout processus contribuant à générer la diversité du vivant quel que soit le niveau (morphologique, moléculaire, taxonomique, etc.). En ce sens, la spéciation en elle-même est un processus de diversification aboutissant à l'apparition de nouvelles espèces.

LES MECANISMES DE SPECIATION

Il existe deux principaux types de spéciation, tous deux liés au phénomène d'isolement reproducteur. Les mécanismes à l'origine de l'isolement reproducteur sont multiples et pourraient être classés en deux catégories majeures : ceux évoluant par sélection (naturelle et sexuelle) et ceux évoluant par dérive * (Kobmoo, 2009).

SPECIATION ALLOPATRIQUE

La spéciation allopatrique est probablement la plus courante. Elle se produit entre des populations qui ont été isolées dans l'espace, par fragmentation de l'habitat ou migration, et qui du fait de ces obstacles ne peuvent plus échanger de matériel génétique. Cet isolement reproductif dû à des circonstances externes permet une évolution indépendante et une divergence des populations, qui finissent par acquérir un isolement reproductif.

Les barrières géographiques responsables de la fragmentation des aires de répartition des espèces ont diverses origines : mouvements des plaques ou modification du cours d'un fleuve, assèchement d'un lac, apparition d'une mer, une faille, une montagne, glissements de terrain... (cf. fig. 5)

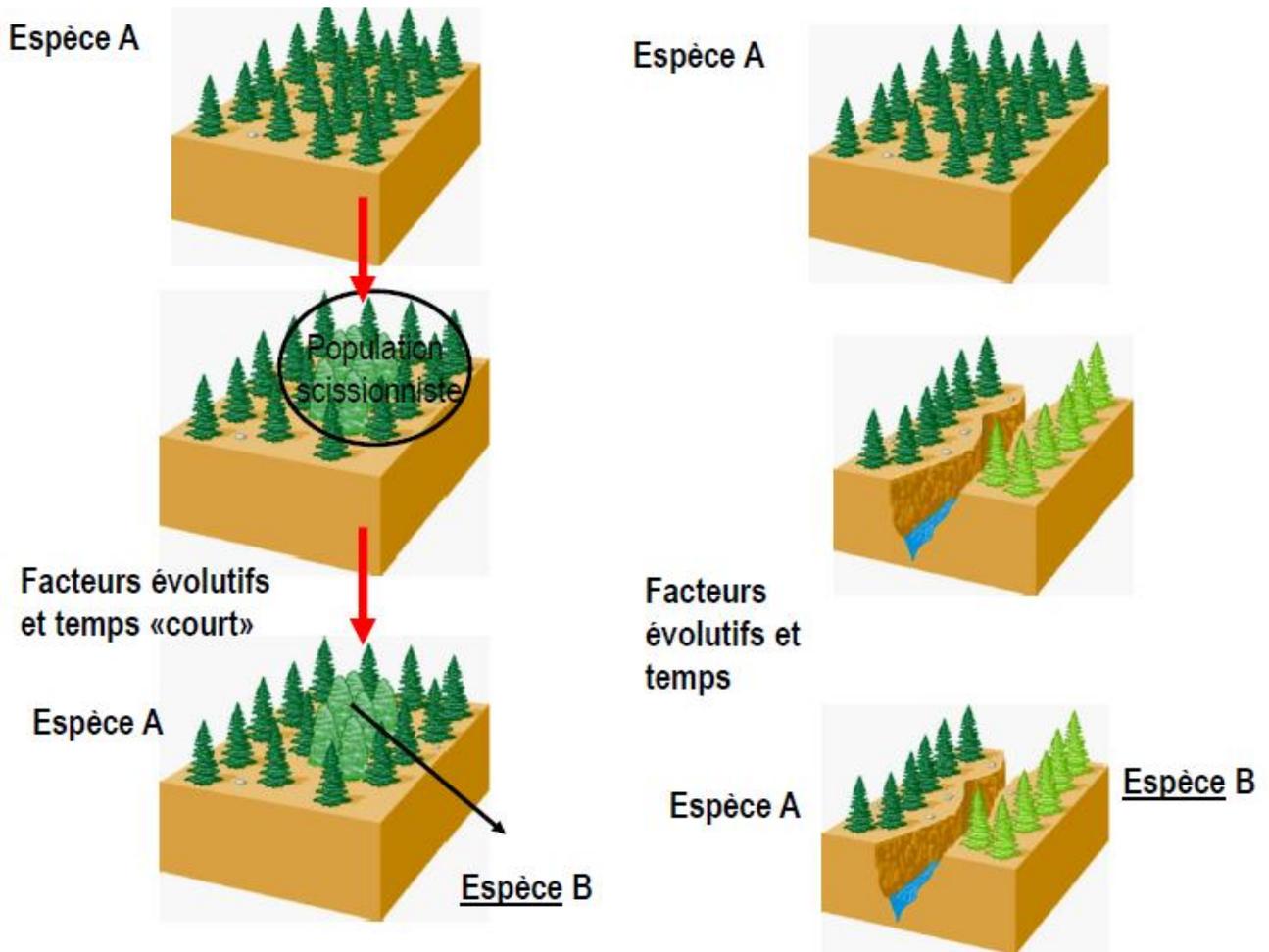


FIGURE 5 : SCHEMAS DE SPECIATION SYMPATRIQUE ET ALLOPATRIQUE (SOURCE : WWW.ECOFOG.GF/DOCS/LICENCEBGS/SPECIATION.PDF)

Ce mode de spéciation est moins facile à intégrer puisqu'il suggère que le processus amenant à la création de deux espèces à partir d'une même population se fait avec d'autres facteurs que la barrière géographique.

Les changements de ploïdie, par exemple, peuvent servir de telles barrières (un tétraploïde qui apparaît dans une population diploïde, par exemple). L'un des problèmes rencontrés par les polyploïdes nouvellement formés est le manque de partenaires pour la reproduction : un croisement entre un individu diploïde et un individu tétraploïde donnera des triploïdes, qui ont généralement une fécondité très réduite. Cependant, de tels individus peuvent contourner ce problème s'ils sont capables de se reproduire en autofécondation. (cf. fig. 5)

1.4.2 DIVERSITE ET STRUCTURATION GENETIQUE

Le processus de spéciation peut être considéré comme l'émergence de nouvelles espèces suite à l'action des forces évolutives (dérive, mutation, sélection diversifiante) sur un long terme à partir d'un taxon ancien. D'où les mécanismes à l'origine de la diversification des espèces sont de même nature que ceux qui gouvernent la diversité génétique intra-spécifique (Dyer & Nason, 2004). Ces mécanismes opèrent à une échelle de temps plus longue pour aboutir à une spéciation que pour engendrer la diversité intra-spécifique.

Rapport-Gratuit.com

1.4.3 PHYLOGEOGRAPHIE DES ARBRES TROPICAUX

Chez les arbres, la distribution des gènes n'est possible que par **la dispersion de pollen et de graines**. Lorsque les populations sont démographiquement stables, elles échangent des gènes de façon constante, différents modèles théoriques permettent de prédire leur structure génétique spatiale.

Les estimations de la diversité génétique des populations d'arbres et de leur structure spatiale fournissent des informations clés sur l'existence ou non de flux de gènes entre ces populations (Ouborg et al., 2006; Pertoldi et al., 2007). Dans le cas où les flux de gènes sont limités, les arbres forestiers peuvent être caractérisés par les modèles **d'isolement par la distance** (IBD) (Vekemans & Hardy, 2004). Les structures génétiques spatiales sont souvent le résultat d'agrégation d'individus apparentés, conséquences d'un équilibre entre flux de gènes limités et dérive génétique locale (Wright, 1943). Dans ce cas le taux d'apparement entre individus diminue avec la distance géographique séparant les individus (Hardy and Vekemans, 1999; Rousset, 2000).

Les avancées récentes de nos connaissances sur l'histoire des forêts sont basées sur l'intégration toujours plus poussée des données fossiles et génétiques disponibles pour les arbres. Les informations concernant la rapidité de colonisation de la forêt ou sa capacité à se maintenir quand les conditions deviennent défavorables sont particulièrement importantes pour modéliser la distribution future des forêts.

Grâce à des approches interdisciplinaires, la capacité à reconstruire l'histoire des forêts a beaucoup progressé. De nombreux travaux de recherche se sont penchés sur la phylogéographie des forêts en milieu tempéré ; par exemple les travaux de Petit et al. 2008, sur la caractérisation de la structure génétique de populations d'épicéas, ont montré que ces arbres avaient survécu à des latitudes plus importantes qu'on ne l'imaginait jusqu'ici lors du dernier maximum glaciaire, il y a 18000 ans. Magri et al., 2006 ont abordé l'histoire européenne du hêtre en retraçant l'expansion postglaciaire des hêtraies à travers l'Europe.

Cependant, il y a évidemment des limites à ces « leçons du passé ». En particulier, il n'est pas possible de retrouver, dans l'histoire de la planète, des climats et des conditions rigoureusement analogues à celles qu'on connaît aujourd'hui ou qu'on subira demain. Néanmoins, l'intérêt de valider les modèles de dynamique des forêts avec les climats du passé reste entier car ils couvrent une gamme très large de conditions, dont certaines très différentes de celles trouvées aujourd'hui.

Actuellement, quelques études concernant la dynamique de structuration de la diversité chez les arbres tropicaux africains sont en cours (Dauby & Koffi et al., 2010). Il n'y a à ce jour pas de travaux de phylogéographie centrés sur les forêts de l'archipel des Mascareignes.

En conclusion de cette présentation de la phylogéographie, il ressort que les études de phylogéographie végétale portent surtout sur l'évaluation des impacts d'évènements climatiques majeurs (les glaciations essentiellement) sur la distribution de la biodiversité. En revanche, la phylogéographie des arbres tropicaux en milieu insulaire (ce qui concerne le sujet du stage) n'en est qu'à ses débuts. Seules quelques publications abordent la phylogéographie des arbres ou espèces ligneuses en milieu tropical.

1.5 OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de ce mémoire est d'estimer la diversité génétique intra île chez *S. majus* et étudier sa structure dans l'espace et le temps, afin **d'identifier les facteurs évolutifs responsables de la répartition de la diversité observée actuellement**. L'espèce *S. majus* fait l'objet d'un intérêt écologique majeur puisqu'il s'agit d'une **espèce structurante de l'écosystème forestier**, qui, par l'exploitation massive de son bois est en voie de disparition. L'ensemble des analyses réalisées sur les trois autres espèces serviront donc principalement à appuyer l'étude de la dynamique de *S. majus*. C'est pourquoi en parallèle de l'étude, une approche interspécifique sera faite en tentant d'établir des relations entre les processus évolutifs propres à chaque espèce.

L'hypothèse de départ explique la répartition de la diversité génétique observée chez *S. majus* en fonction des formations géologiques majeures de la Réunion : le Piton de la Fournaise et le Piton des Neiges. Le caractère singulier des conditions du milieu de l'île apparaît comme déterminant dans l'élaboration des scénarios de colonisation du territoire par *S. majus*. C'est pourquoi les analyses de la structuration spatiale génétique vont être corrélées à une analyse du milieu naturel.

Il va donc s'agir ici d'utiliser les différents outils de la génétique des paysages dans le but d'identifier les discontinuités génétiques qui correspondent soit à des zones de rupture de flux de gènes dont les causes sont à déterminer, soit à des zones de contact entre deux populations initialement isolées. La mise en évidence de ces discontinuités génétiques est le

plus souvent obtenue par des approches bayésiennes de regroupement. Les barrières géographiques se matérialisent généralement par des mers, des fleuves, des montagnes, et des zones ouvertes ou perturbées. La présence de barrières reproductives pourrait résulter d'adaptations divergentes à des variations des conditions environnementales. Ainsi, la superposition des groupes obtenus par Geneland avec des données géographiques et climatiques complétée par des analyses statistiques spatialisées permet de choisir l'hypothèse expliquant au mieux les résultats obtenus et ainsi de comprendre les facteurs influençant la structure de la diversité génétique. Ces dernières approches rendent compte de l'impact des conditions environnementales passées et contemporaines sur la structure de la diversité génétique à l'échelle de régions. Dans une population donnée, les processus de colonisation sont liés aux traits d'histoire de vie des espèces dont certains assurent un rôle majeur dans le maintien de la diversité génétique. En effet, étant donné le statut précaire de chaque population, la survie des espèces est en partie assurée par la migration et la colonisation de nouveaux habitats. La colonisation désigne ici l'établissement d'une population dans un site vierge de cette espèce (Born C., 2007).

- Savane et forêt semi-sèche
- Forêt humide de basse et moyenne altitude
- Forêt d'altitude
- Landes de haute altitude

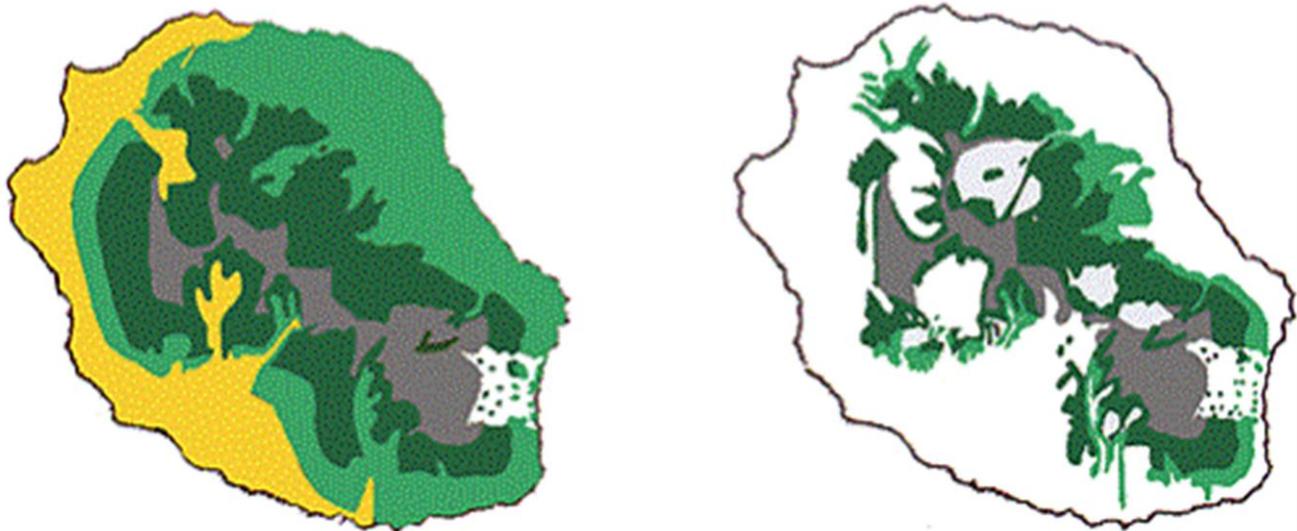


FIGURE 6 : CARTES DE LA VEGETATION INDIGENE AVANT LA COLONISATION HUMAINE ET AUJOURD'HUI (D'APRES CADET, 1980)

2- MATERIEL ET METHODES

2.1 MATERIEL BIOLOGIQUE ET SITE D'ETUDE

2.1.1 LES FORETS DE L'ILE DE LA REUNION : ETAT DES LIEUX ET DIVERSITE GENETIQUE DE LA STRATE SUPERIEURE DE LA VEGETATION

Depuis les années 1990, une part importante des forêts tropicales restantes n'est représentée que par des forêts secondaires ou des vestiges de forêts (Wright and Muller-Landau, 2006). L'un des principaux impacts humains sur les forêts tropicales est la suppression de la couverture végétale originale et son remplacement par un autre type d'occupation du sol (Bogaert et al., 2008).

Sur l'île de la Réunion, le développement des champs de caféiers à partir du milieu du 18^{ème} siècle, puis la culture de la canne à sucre encore très intense aujourd'hui, ont largement contribué à la dégradation des forêts primaires comme le montre le recul de la végétation dû à l'activité anthropique illustré en figure 6. Cette déforestation a eu pour effet **la fragmentation du paysage forestier**, processus défini comme une rupture dans la continuité des habitats, entraînant la perte d'habitat, l'isolation des taches et l'effet de lisière (Bogaert, 2000). Par l'augmentation de la densité relative des lisières, la fragmentation peut amener une modification de la composition en espèces de chaque fragment, en général au détriment des espèces les plus spécialisées (Pereboom, 2006). Or, dans un milieu insulaire isolé tel que la Réunion, ce sont les espèces indigènes qui sont les plus sensibles à ces perturbations, du fait de leur capacité d'adaptation relativement réduite, et de leur compétitivité moindre comparée à celle des espèces exotiques.

D'un point de vue génétique, les effets de la fragmentation de la forêt réunionnaise ont été abordés pour l'espèce *S. majus*, lors du stage M1 de Guillaume Payet au CIRAD, en 2010. Son mémoire présente les conclusions suivantes :

- la fragmentation n'affecte pas la variabilité et la différenciation génétique entre les populations, car malgré la perte d'individus mères, la reproduction est assurée. Il semblerait que les insectes pollinisateurs soient capables de prospecter sur de plus grandes distances.

- cependant, il semblerait qu'à l'échelle des cohortes, on ait une différenciation génétique et une augmentation du taux de consanguinité dans la descendance des populations fortement exploitées, comme dans la forêt des Makes.

Ces résultats montrent que l'évolution génétique de *S. majus* des Sapotacées tend progressivement vers une diminution de sa diversité. L'écart important observé entre les adultes et les régénérations laisse entrevoir un danger pour les générations futures, qui seront alors moins aptes à s'adapter à un changement des conditions du milieu.

Aux effets de la fragmentation du couvert forestier, s'ajoutent deux autres menaces pour la végétation indigène de l'île ;

- la prolifération des **espèces envahissantes** (résultant de l'introduction d'espèces exotiques invasives). Le raisin marron (*Rubus alceifolius*), la liane papillon (*Hiptage benghalensis*), le goyavier (*Psidium cattleianum*) et le longose (*Hedychium gardnerianum*) sont les principales pestes végétales causant des dégâts importants sur l'île de la Réunion. (sur les flancs de ravines en particulier, on voit très nettement se dessiner des « tapis » de végétation formés par ces espèces.) cf. annexe 3

- la **perte des disséminateurs indigènes** (oiseaux, tortues...).

2.1.2 LES SAPOTACEES, ESPECES STRUCTURANTES DES FORETS REUNIONNAISES

PRESENTATION GENERALE

Les Sapotacées constituent une famille de plantes dicotylédones comprenant plus de 1200 espèces réparties en 53 genres (Govaerts et al., 2001, dans Bartish et al., 2005). Ce sont des arbres ou arbustes à feuilles persistantes que l'on retrouve essentiellement en milieu tropical (cf. annexe 4)

Les plus populaires sont le karité (*Vitellaria paradoxa*) et l'arganier (*Argania spinosa*) puisqu'ils font l'objet d'une forte utilisation commerciale : respectivement le beurre de karité et l'huile d'argan.

On dénombre aujourd'hui 3 sous familles : Sarcospermatoidées ; Chrysophyloïdées ; Sapotoïdées. Aux Mascareignes, 3 genres de la sous-famille des Sapotoïdées sont représentés par des espèces indigènes : ***Mimusops***, ***Labourdonnaisia*** et ***Sideroxylon***.

Certaines de ces espèces (celles possédant des gros fruits, comme *S. majus* ou *M. balata*) sont des **espèces structurantes** (ou « **dryades** ») de la forêt réunionnaise, lui conférant son aspect organisé. Elles forment un couvert forestier, constituent une source de nourriture (leurs fruits pour les oiseaux frugivores, ou bien leur nectar pour des oiseaux et des insectes pollinisateurs), et servent de support à des espèces épiphytes.

Pour replacer la présentation des Sapotacées dans le contexte de l'étude de leur dispersion au moyen de microsatellites à **hérédité maternelle**, il semble intéressant de regrouper les espèces en fonction de la taille de leurs fruits. En effet, les modes et facteurs de dispersion des graines sont directement liés au type de fruits produits par l'arbre.



A



B

FIGURE 7 : ARBRE ET FRUITS DE *S. MAJUS* (A) ET *M. BALATA* (B). CREDITS PHOTOS : JEAN-MICHEL SARRAILH

S. majus :

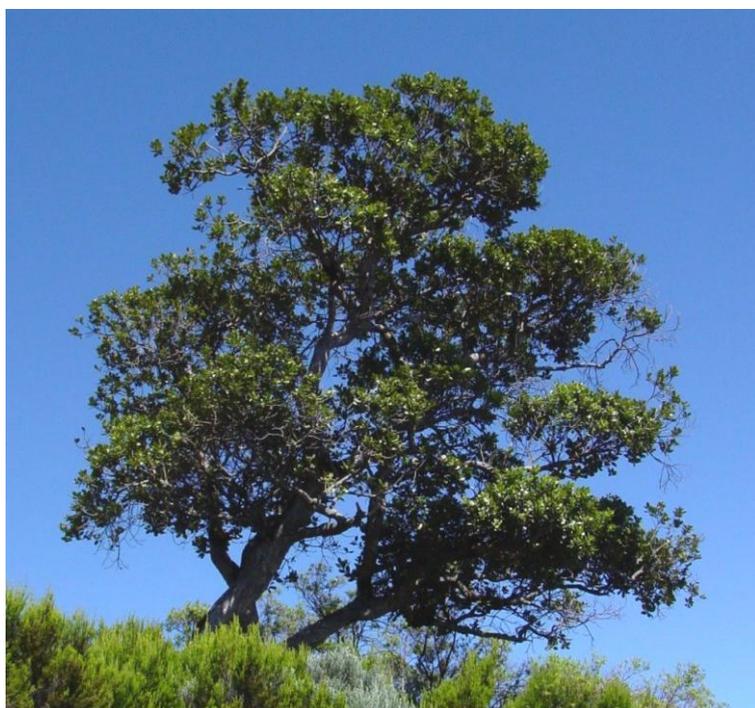
S. majus communément appelé « Bois de fer », est une espèce dryade que l'on retrouve dans la série mégatherme hygrophile héliophile (Cadet, 1977). C'est un grand arbre de 15 à 20 m de haut, avec un tronc d'1 m de diamètre (Friedmann, 1981). Ses feuilles, groupées en bouquet à l'extrémité des rameaux, possèdent un limbe elliptique, acuminé* et mince à marge ondulée. Les fleurs sont hermaphrodites et se développent directement sur les rameaux (floraison cauliflore). Les fruits sont des baies de 2 à 4 cm de diamètre, vert clair avec de légères ponctuations jaunes une fois mures. Ils renferment généralement une graine à tégument très dur et très épais (Friedmann, 1981) de la forme d'un crâne humain avec une face lisse et une face sculptée. Avant d'être classé espèce protégée, le bois de fer était très utilisé pour son bois imputrescible dans la construction de maisons (Bordères, 1991) et comme boisson rafraîchissante (Cordemoy, 1895 ; Lavergne, 1990). Cf. fig.7a. Comme pour le Tambalacoque (*Sideroxylon grandiflorum*) de l'île Maurice, la régénération naturelle chez le bois de fer est très faible (Friedmann, 1981; Strasberg, 1996), ce qui pourrait être lié à la disparition de(s) l'espèce(s) disséminatrice(s). La raréfaction des individus juvéniles de cet arbre de la famille des Sapotacées a été attribuée à l'extinction du Dodo (cf. annexe 5) à l'île Maurice (*Raphus cucullatus*) qui facilitait la germination et la dispersion des graines (Vaughan & Wiehe, 1941 ; Temple, 1977). Sur l'île de la Réunion, existait une espèce d'oiseau proche du Dodo, le Solitaire (*Threskiornis solitarius*), d'assez grande taille (environ 70 cm) et doté d'une faible aptitude à voler.

M. balata :

M. balata ou « Grand Natte » est un grand arbre (jusqu'à 20 m de haut) possédant des feuilles lancéolées, vert sombre, coriaces* et glabres*, avec un pétiole court. Son écorce est grisâtre voire marron, épaisse et gercée longitudinalement. Les fleurs présentes de novembre à février, sont axillaires, solitaires ou par trois, et ne se développent jamais sur les vieux bois (Friedmann, 1981). Les fruits sont de grosses baies vert clair, de 5 cm de diamètre environ qui peuvent contenir de 1 à 6 graines. Cf. fig.7b



A



B

FIGURE 8 : ARBRE ET FRUITS DE *LABOURDONNAISIA CALOPHYLLOIDES* (A) ET *SIDEROXYLON BORBONICUM* (B). CREDITS PHOTOS : JEAN MICHEL SARRAILH



Ainsi, étant donné la taille des fruits de ces espèces, les modes possibles de dispersion des graines sont la **barochorie** et l'**hydrochorie**. La zoochorie n'est à ce jour pas envisagée ; on ne sait pas quels pourraient être les agents disperseurs capables d'ingérer des fruits de grande taille. Ces modes de dispersion suggèrent une aire de répartition des graines assez limitée dans l'espace. Cependant, les conditions environnementales de l'île de la Réunion (relief accidenté, fort gradient altitudinal, cyclones...etc.) peuvent se révéler favorables aux dispersions de graines par l'action de la gravité ou de l'eau.

- ESPECES A PETITS FRUITS : *SIDEROXYLON BORBONICUM BORBONICUM ET CAPURONII*

L'espèce ***Sideroxylon borbonicum*** (ou Bois de fer bâtard) se divise en deux variétés : la variété capuronii, située entre 0 et 800 m d'altitude, et la variété borbonicum se développant de 800 à 2000 m d'altitude. Les deux variétés sont assez communes.

Ce sont de petits arbres hauts de 5 à 8 m (variété borbonicum), pouvant atteindre 15 m de hauteur (variété capuronii). Les feuilles, avec un limbe elliptique, sont coriaces, groupées à l'extrémité des rameaux, d'un vert clair chez la variété capuronii, d'un vert plus foncé chez la variété borbonicum. Les fruits se présentent sous la forme de petites baies vertes d'environ 1 cm de diamètre, devenant rouge puis noire à maturité. Une pulpe collante enveloppe la graine extrêmement dure. Cette espèce est une post-pionnière, c'est donc une des premières essences à repousser sur les coulées de lave.

- ESPECE A FRUIT INTERMEDIAIRE : *LABOURDONNAISIA CALOPHYLLOIDES*

Labourdonnaisia calophylloides (ou Petit Natte) est un arbre atteignant 20 m et plus de hauteur, à tronc volumineux et court mais très droit. La ramification latérale est étagée au jeune âge, crevassée, de couleur gris clair à blanchâtre. Les feuilles à limbe obovale ou elliptique, parfois à marge révoluée, sont vert sombre dessus, d'un vert plus clair ou glauque dessous. Les jeunes feuilles se distinguent par une couleur rouge-violacée. Les fruits sont des baies ovoïdes de 2 à 3 cm de longueur. Le Petit natte est endémique de la Réunion et de Maurice.

Ces quatre espèces se rencontrent dans la **série mégatherme hygrophile**, une des 4 grandes unités de végétation des forêts réunionnaises définies par Cadet, 1977 (cf. annexe 6). Chacune de ces formations représente le stade le plus complexe d'une succession de groupements végétaux dont le premier est une communauté de Mousses et de Lichens, premiers occupants des coulées de laves récentes. Cette succession de stades d'une végétation de plus en plus riche en espèces et de plus en plus complexe constitue une série dynamique. L'évolution et le profil de la série mégatherme hygrophile sont illustrés en annexe 7.

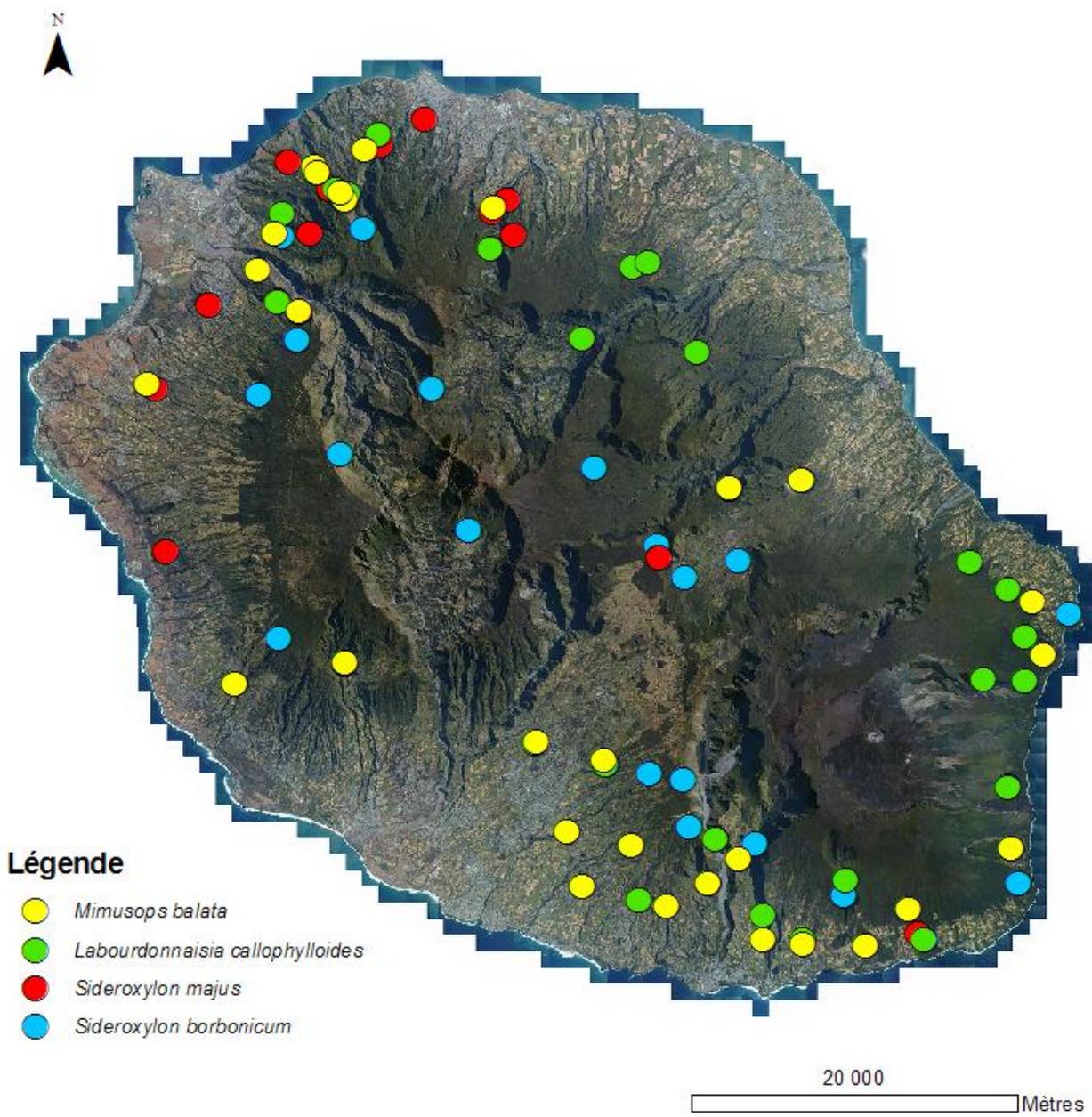


FIGURE 9 : CARTE DES SITES ECHANTILLONNES. CIRAD, 2010

2.2 ECHANTILLONNAGE

Cinq échantillons de chacune des quatre espèces sont récoltés dans un maximum de stations (correspondant à différentes populations) réparties sur toute l'île. (cf. fig. 9). La localisation et les noms de populations échantillonnées pour *S. majus* sont regroupés en annexe 8.

Sur un individu géo-référencé, deux à trois feuilles sont récoltées. Lorsque les feuilles ne sont pas accessibles, un petit morceau de cambium est prélevé à la place. Pour chaque échantillon collecté, on note : l'espèce, le lieu et la date de la collecte, les coordonnées GPS, la hauteur de l'individu ainsi que le diamètre du tronc à hauteur de poitrine (i.e. 1m30), et des remarques sur le stade phénologique. Toutes autres observations pouvant être utiles sont notées (pigmentation anormale du limbe, présence de poils...etc.).

Les sites d'échantillonnage sont choisis en fonction des précédentes campagnes et des informations fournies (présence ou non de Sapotacées) par les gestionnaires de la forêt (ONF, Conservatoire du littoral) ou par des particuliers. Les différentes populations de l'île ont été définies sur la base des études précédentes qui ont mis en évidence des différenciations génétiques marquées entre certaines régions de l'île (Payet, 2010).

L'observation se fait dans un premier temps à la jumelle en empruntant autant que possible les chemins accessibles en voiture ou 4x4. Une fois la zone d'intérêt repérée, il est nécessaire de parcourir plusieurs kilomètres à pied dans la forêt pour récolter les feuilles et atteindre les arbres généralement difficiles d'accès, en bord de ravines par exemple.

Tableau 1 : Echantillonnage

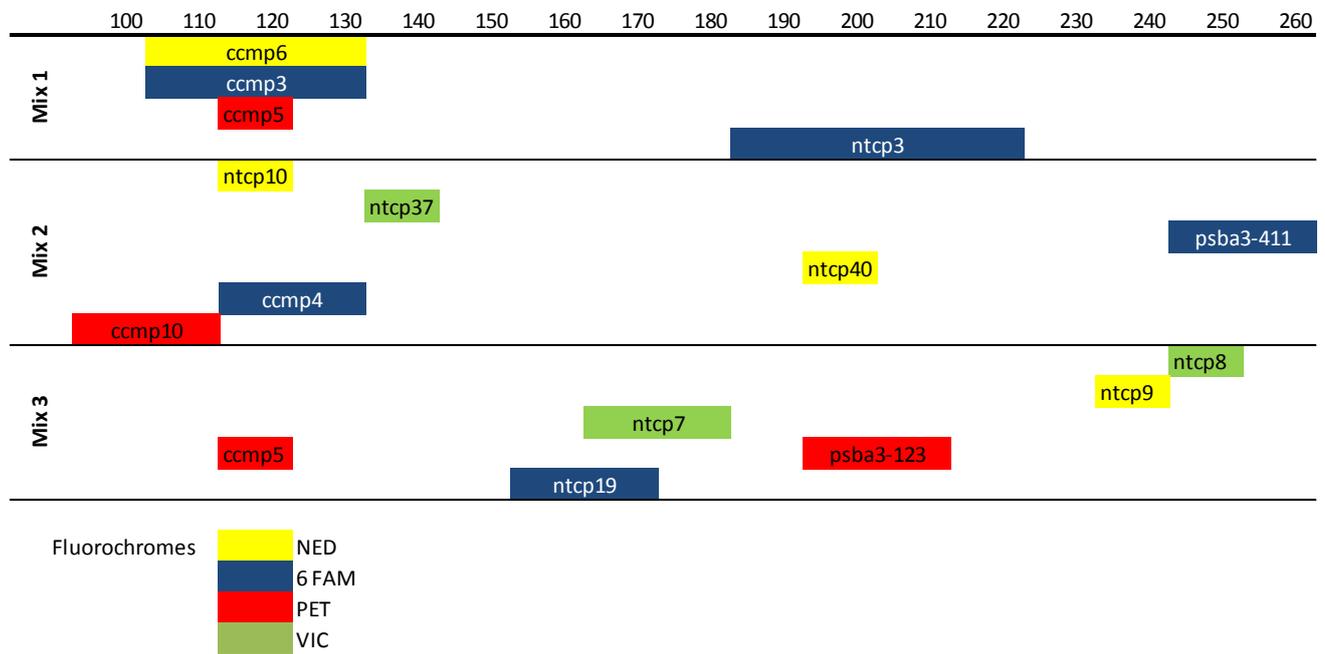
Espèce	Nombre d'individus collectés	Nombre de populations
<i>Sideroxylon majus</i>	158	21
<i>Mimusops balata</i>	141	29
<i>Labourdonnaisia calophylloides</i>	146	31
<i>Sideroxylon borbonicum</i>	124	23

2.3 METHODES D'ANALYSES MOLECULAIRES ET MARQUEURS MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES

2.3.1 EXTRACTION DE L'ADN

L'ADN chloroplastique est extrait à partir du broyat de 20 mg de feuilles (ou cambium) d'échantillons secs selon le protocole DNeasy Plant Mini du Kit Qiagen (cf. annexe 9).

Tableau 2 : Description des trois mix d’amorces. La première ligne indique la taille en paires de bases des fragments amplifiés pour chaque couple d’amorce. Le code couleur est fonction du fluorochrome associé à l’amorce Forward.



La qualité des extractions est vérifiée en effectuant une électrophorèse des produits PCR issus de l'extraction ADN (cf. annexe 10) sur gel d'agarose à 2%. Après migration à 110 volts pendant 1h, coloration au bromure d'éthidium BET (un agent intercalant) et rinçage à l'eau du gel, les résultats sont révélés aux UV (cf. annexe 11)

2.3.2 MARQUEURS MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES

AMPLIFICATION DES REGIONS MICROSATELLITES

Les séquences microsatellites de l'ADN chloroplastique sont amplifiées par PCR, en utilisant 3 mix de couples d'amorces marquées aux fluorochromes. (Cf. tableau 2)

La composition des mix a été choisie en fonction de la taille du fragment amplifié et de la couleur de fluorescence des microsatellites, de façon à pouvoir identifier les pics sur les chromatogrammes fournis par le logiciel Genemapper. Les amorces CCMP 3 et CCMP 4 ont par exemple été passées dans des mix différents, puisque dans le cas contraire, les chromatogrammes auraient été illisibles. En effet, la longueur des fragments respectifs est similaire (i.e. même position sur le chromatogramme) et il n'est pas possible de différencier les pics par leur couleur puisque le fluorochrome utilisé est le même dans les 2 cas.

La principale raison qui nous a amené à tester ces fragments chloroplastiques est la disponibilité des amorces universelles. Les amorces ont été testées sur l'ADNcp de *S. majus*, et les régions amplifiées ont été passées au séquençage. Les résultats ont permis de mettre en évidence un fort degré de polymorphisme pour ces régions microsatellites, qui ont donc été sélectionnées en priorité pour cette étude. Les caractéristiques des amorces utilisées sont détaillées dans le tableau 4.

Les conditions des réactions de PCR, réalisées selon le protocole du kit **Type-it® Microsatellite PCR** (Qiagen, Inc), sont données dans le tableau 3.

Tableau 3 : Conditions des réactions de l'amplification des régions micro satellites

<u>Préparation MIX</u>		<u>Programme PCR</u>		
	pour 1 puits (en µL)			
MM'	5	Dénaturation	95 °C	5 min
Amorce F	0,2	Dénaturation	95 °C	30 s
Amorce R	0,2	Hybridation	54 °C	1 min 30
H2O	2,6	Elongation	72 °C	30 s
ADN	2	Elongation	60 °C	30 mn
		Etape finale	12 °C	Infini

} **28 cycles**

MM' contient : HotStarTaq® Plus ADN Polymerase, tampons Type It Microsatellite PCR à pH 8.7 (20°C) avec 6 mM de MgCl2 et dNTPs

L'amplification a été conduite dans un thermocycleur PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Tableau 4 : Caractéristiques des 15 amorces chloroplastiques utilisées. Le code couleur du tableau précédent est conservé. (SM = *S. majus*, LC = *Labourdonnaisia calophylloides*, MB = *M. balata*, SBB et SBC = *Sideroxylon borbonicum borbonicum* et *capuronii*)

Amorces	Séquence Forward	Séquence Reward	Taille du fragment	Motif microsatellite
CCMP 3 ²	CAGACAAAAGCTGACATAG	GTTTCATTGGCTCCTTTAT	112	(T)11
CCMP 4 ²	AATGCTGAATCGAYGACCTA	CCAAAATATTBGGAGGACTCT	126	(T)13
CCMP 5 ²	TGTTCCAATATCTTGTGTCATT	AGGTTCCATCGGAACAATTAT	121	(C)7(T)10
CCMP 6 ²	CGATGCATATGTAGAAAGCC	CATTACGTGCGACTATCTCC	103	(T)5C(T)17
CCMP 10 2	TTTTTTTTTAGTGACGTGCA	TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	103	(T)14
NTCP 3 ¹	AAGTCAAAGAGCGATTAG	TGATACATAGTGCATACAG	196	(T)10
NTCP 7 ¹	TGATCCCGGACGTAATCC	CGAATCCCTCTCTTTCCG	175	(A)11
NTCP 8 ¹	ATATTGTTTTAGCTCGGTGG	TCATTCCGGCTCCTTTATG	251	(T)11
NTCP 9 ¹	CTTCCAAGCTAACGATGC	CTGTCCTATCCATTAGACAATG	237	(T)10
NTCP 10 ¹	TGCTGAATCGACGACCTA	AATATTCGGAGGACTCTTCTG	120	(T)13
NTCP 19 ¹	AATCGTTGTTTTAGACGATGC	GAAACCCATTCTTACCACAAG	165	(T)17
NTCP 37 ¹	TTCCGAGGTGTGAAGTGG	CAGGATGATAAAAAGCTTAACAC	142	(A)13
NTCP 40 ¹	TAATTTGATTCTTCGTCGC	GATGTAGCCAAGTGGATCA	150	(A)14
psbA3 123 ³	AGAGGGCGTTATTGCTCCTT	CATGAACTAACCACAACCATAAA	250-280	**
psbA3 411 ³	TTTATGGTTGTGGGTTAGTTCA	CCCTTCCCTTTACTCCACT	250	*

* SM : (A)6T(A)18

LC : (A)15

MB : (A)6T(A)10

SBB/SBC : (A)6T(A)15

** SM : (T)12

LC : (T)9

MB : (T)9

MB : (T)8

SBB/SBC : (T)10

1 : Bryan et al. 1999

2 : Weising-Gardner 1999

3 : Données non publiées

GENOTYPAGE DES PRODUITS PCR

Avant passage au séquenceur, les produits PCR sont dilués avec de l'eau HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). La gamme de dilution est fonction de l'espèce de l'échantillon et des couples d'amorces utilisés. Pour le mix 1, les dilutions ont été faites au 1/100 pour *Labourdonnaisia calophylloides* et *Sideroxylon borbonicum*, au 1/10 pour *Mimusops balata* et au 1/30 pour *Sideroxylon majus*. Pour les mix 2 et 3, la dilution des produits PCR s'est faite au 1/10 pour les 4 espèces. 1µl de cette solution a été à nouveau dilué dans 10,7µl de Formamide (F à -20°C) et 0,3µL de marqueur de taille (Genescan AB500LIZ).

Pour chaque plaque PCR, contenant 96 puits, un individu témoin est défini par « Run ». Un run correspond à l'analyse par le séquenceur de 16 échantillons, i.e. de 16 puits de la plaque PCR. Cela permet, lors de la lecture des pics sur Genemapper, de corriger d'éventuels décalages dans la taille des microsatellites (« effet Run » du séquenceur).

Le génotypage a été effectué à l'aide d'un séquenceur à 16 capillaires de type ABI 3130XL (Applied Biosystems™).

La lecture des pics a été réalisée grâce au logiciel GENEMAPPER (ABI Prism, Version 3.0) puis vérifiée à l'œil selon une méthode stricte.

2.3 ANALYSE DES DONNEES

2.3.1 DETERMINATION DES HAPLOTYPES

Les pics fournis par le logiciel Genemapper donnent la longueur en paires de bases azotées des fragments ADN présentant le taux de fluorescence le plus élevé, donc correspondant aux fragments microsatellites amplifiés par le couple d'amorces marquées au fluorochrome. Les allèles de chaque individu sont alors déterminés en fonction de la taille du pic observé pour le marqueur microsatellite concerné. On attribue ainsi pour chaque individu une valeur d'allèle par locus. Cette série d'allèles constitue un haplotype.

Le **nombre d'haplotypes** détectés et leur fréquence dans les populations de chacune des quatre espèces de Sapotacées ont été déterminés à l'aide de Genalex 6.4, le module d'analyses génétiques d'Excel.

2.3.2 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES HAPLOTYPES

On visualise **la répartition haplotypique** de chacune des populations échantillonnées sur la carte de l'île de la Réunion, à l'aide du logiciel ArcGIS.

2.3.3 RESEAU HAPLOTYPIQUE

Un **réseau d'haplotypes** a été construit selon la méthode de parcimonie avec le logiciel Network 4.5 de Fluxus pour montrer les relations phylogénétiques entre haplotypes.

Rapport-Gratuit.com

2.3.4 STRUCTURATION SPATIALE DE LA DIVERSITE GENETIQUE ET PHYLOGEOGRAPHIE

La **structuration géographique** des haplotypes est testée grâce au **coefficient d'apparentement de Loiselle** (Pairwise Kinship coefficient, Loiselle, 1995), calculé avec le logiciel SPAGEDI. Cet indice mesure le degré de ressemblance génétique par classe de distances géographiques séparant les individus. 20 000 permutations entre haplotypes ont été effectuées pour le test.

Les paramètres de diversité et de différenciation ont été estimés à l'aide du logiciel Permut. Ces paramètres incluent la **diversité génétique moyenne au sein des populations** (h_s), la **diversité génétique totale** (h_T) et le **coefficient de différenciation génétique** entre les populations (G_{ST}), ainsi que les paramètres équivalents (v_s , v_T , et N_{ST}) obtenus en prenant en compte les similarités entre haplotypes (i.e. la distance phénétique, ou nombre de différences appariées entre haplotypes). Ces indicateurs de la diversité ont été proposés par Nei (1973) et définis comme suit :

Soit une population subdivisée en k populations dans laquelle i allèles sont en ségrégation. p_i est la fréquence de l'allèle i dans la population générale et p_{ki} la fréquence de l'allèle i dans la population k. On a alors :

$$h_s = 1 - \sum_i \overline{p_i^2} \quad \text{avec} \quad \overline{p_i^2} \quad \text{la moyenne sur les k populations des carrés des fréquences de l'allèle i}$$

$$h_T = 1 - \sum_i \overline{p_i^2} \quad \text{avec} \quad \overline{p_i^2} \quad \text{la moyenne pondérée de la fréquence de l'allèle i dans les k populations}$$

$$G_{ST} = \frac{h_T - h_s}{h_T} = 1 - \frac{h_s}{h_T}$$

Le paramètre de différenciation qui prend en compte les distances génétiques entre les individus est construit sur le même principe. La mesure de diversité utilisée est alors :

$$v = \sum_{ij} \pi_{ij} P_i P_j \quad \text{Où } \pi_{ij} \text{ est la distance entre les haplotypes i et j.}$$

h_s devient v_s , et h_T devient v_T , et le coefficient de différenciation est noté N_{ST} .

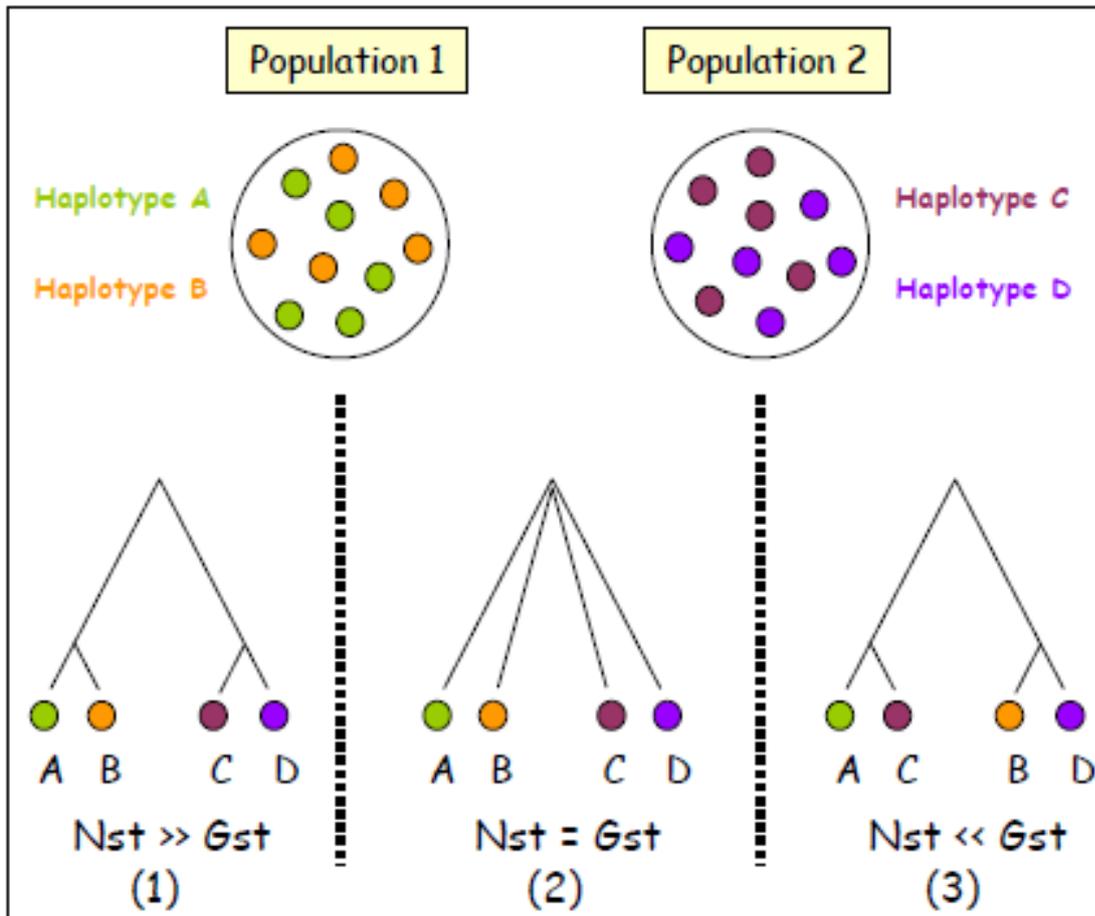


FIGURE 10 : ILLUSTRATION DE LA CORRESPONDANCE ENTRE LES PHYLOGENIES DES HAPLOTYPES ET LEUR DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE, D'APRES PONS ET PETIT, 1996. (TIREE DE KOFFI, 2010)

L'analyse comparée des G_{st} et N_{st} permet de tester la structure phylogéographique inter populations, selon la méthode de Pons et Petit, 1996, expliquée ci-après et illustrée par la figure 10 :

(1) Lorsqu'il y a correspondance entre la phylogénie des haplotypes et leur distribution géographique (c'est-à-dire qu'il existe une **structure phylogéographique**), la différenciation mesurée en prenant en compte les similarités entre haplotypes (N_{ST}), est supérieure à la différenciation basée uniquement sur les fréquences des haplotypes (G_{ST}) :
 $N_{ST} > G_{ST}$

Autrement dit, les haplotypes distincts se retrouvant au sein des populations sont en moyenne plus apparentés que les haplotypes distincts issus de différentes populations.

(2) Quand il n'y a **pas de structure phylogéographique**, alors **$N_{ST} = G_{ST}$**

(3) Enfin, lorsque les haplotypes les plus fortement reliés ne sont jamais ensemble, mais toujours dans des populations différentes, alors **$N_{ST} < G_{ST}$**

Une carte de **répartition des individus** classés en population en fonction de leur **ressemblance génétique** a été réalisée à l'aide du module Geneland 3.3.0 du logiciel R 2.13.1. Le programme compare les haplotypes des individus deux à deux et attribue une population pour les individus qui statistiquement se rapprochent le plus d'un point de vue génétique. Le logiciel GENELAND utilise la méthode bayésienne de regroupement spatialisé.

Le nombre d'itérations a été fixé à 100 000 avec un thinning = 100. Le programme est lancé 10 répétitions de suite (Run 1) en fixant le paramètre « nombre de populations à rechercher » égal à 10. Le programme est relancé à nouveau 10 fois de suite (Run 2), en fixant le nombre de population à rechercher égal au nombre de populations effectivement détectées au Run 1. Les cartes données dans la partie résultats sont une synthèse des cartes obtenues au Run 2.

Enfin, des AMOVA (analyses de la variance moléculaires) sont réalisées avec le logiciel Arlequin à différentes échelles de populations. Ces amova donnent la part de variation intra population expliquant la diversité génétique totale de la population. Cette méthode se base sur l'indice de différenciation génétique F et ses déclinaisons (F_{CT} , F_{ST} et F_{SC}). Cet indice est analogue au G_{ST} .

3 – RESULTATS

Cette partie ne détaille pas tous les résultats obtenus au cours du stage dans un but de synthétiser les informations collectées et ne pas gêner la compréhension des analyses par une surcharge de résultats. De ce fait, seuls les résultats obtenus pour *S. majus* seront analysés dans le détail. Les résultats concernant les autres espèces sont présentés dans le texte, ou en annexe, et utilisés pour les interprétations.

3.1 GENOTYPES ET DETERMINATION DES HAPLOTYPES

Sur les 15 loci sélectionnés pour l'étude, seuls ceux qui présentaient une diversité allélique forte et une faible proportion d'allèles rares ont été gardés pour interpréter les résultats. Les sites polymorphes ne sont pas les mêmes selon les espèces.

Pour *S. majus*, seul PSB-A3 123, en plus de NTCP 3 qui avait déjà été testé auparavant (Dafreville, 2009), présente une diversité allélique totale de 0,696. (cf. tableau 5)

On dénombre 23 haplotypes pour *S. majus*, 16 pour *M. balata*, 38 pour *S. borbonicum*, 23 pour *L. calophylloides*. Les différents haplotypes recensés pour chaque espèce sont détaillés en annexe 12.

Tableau 5 : Polymorphisme des loci retenus selon les espèces (données calculées avec le logiciel Genalex)

Espèce	N	Locus	Na	h	Taille du fragment amplifié
<i>Sideroxylon majus</i>	158	NTCP3	7	0,744	202-214
	158	PSBA3 411	10	0,696	251-264
<i>Mimusops balata</i>	141	CCMP3	6	0,498	110-116
	141	NTCP3	6	0,596	201-207
	141	PSBA3 123	2	0,499	207-216
<i>Labourdonnaisia calophylloides</i>	146	NTCP3	6	0,599	196-205
	146	NTCP10	4	0,431	112-118
	146	NTCP8	5	0,462	249-255
<i>Sidéroxylon borbonicum</i>	124	NTCP3	9	0,802	203-214
	124	NTCP40	2	0,431	190-191
	124	PSBA3 411	8	0,787	259-265
	124	NTCP10	2	0,431	114-115

N : nombre d'individus , Na : nombre d'allèles , h : diversité allélique

3.2 STRUCTURATION SPATIALE DES HAPLOTYPES

Dans cette partie, il s'agit de voir comment les haplotypes recensés dans chaque population s'organisent géographiquement.

Distribution spatiale des haplotypes :

Sur la carte de la figure 11, les fréquences d'haplotypes rencontrés dans chaque population de *S. majus* sont représentées sous forme de diagramme circulaire. L'emplacement des diagrammes correspond aux positions GPS des populations. Cette représentation permet de voir comment se répartissent les haplotypes dans l'espace. Les cartes concernant *M. balata*, *L. calophylloides* et *S. borbonicum* sont regroupées en annexe 13.

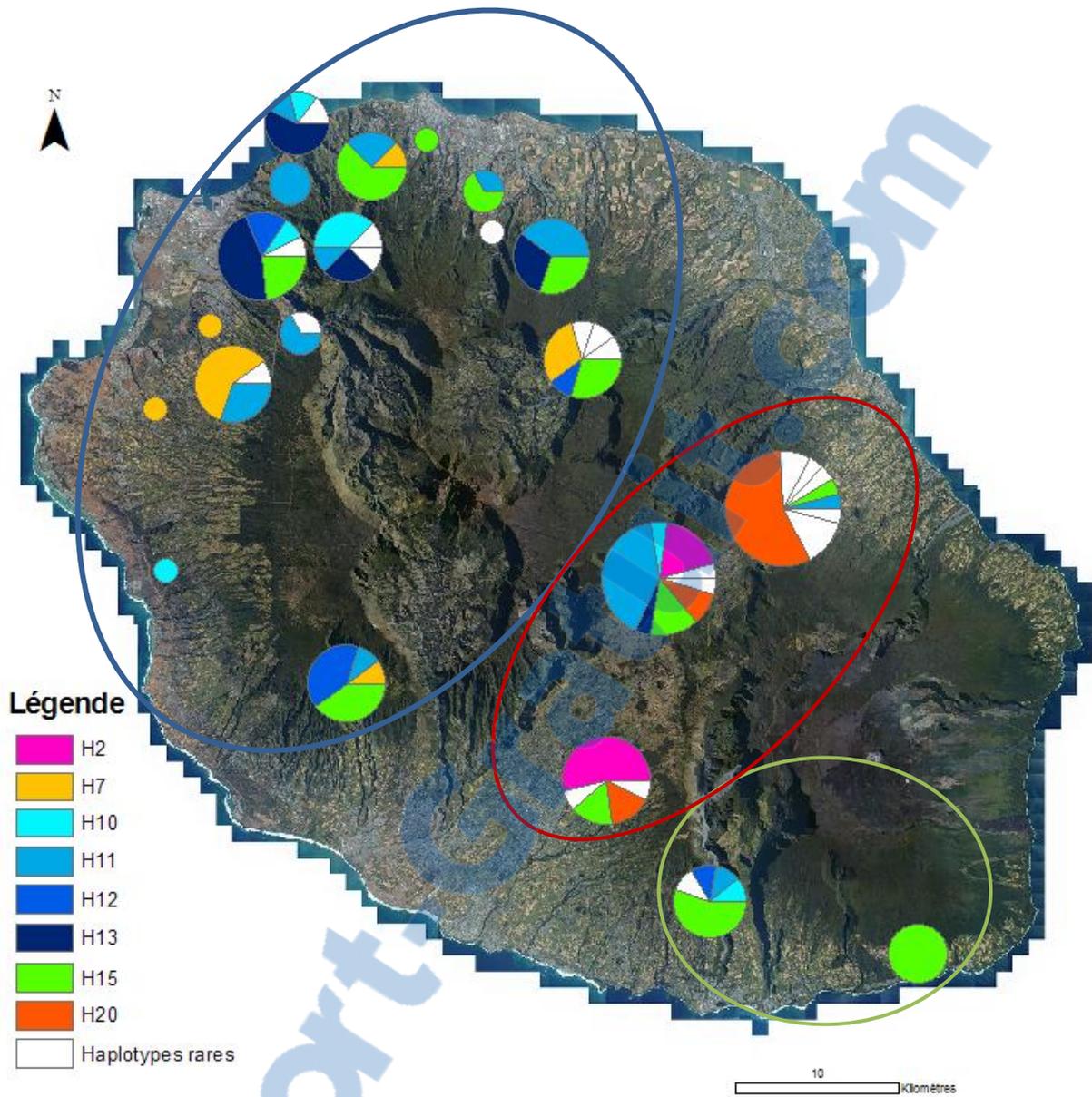


FIGURE 11 : DISTRIBUTION SPATIALE DES FREQUENCES HAPLOTYPIQUES PAR POPULATION. *S. MAJUS*

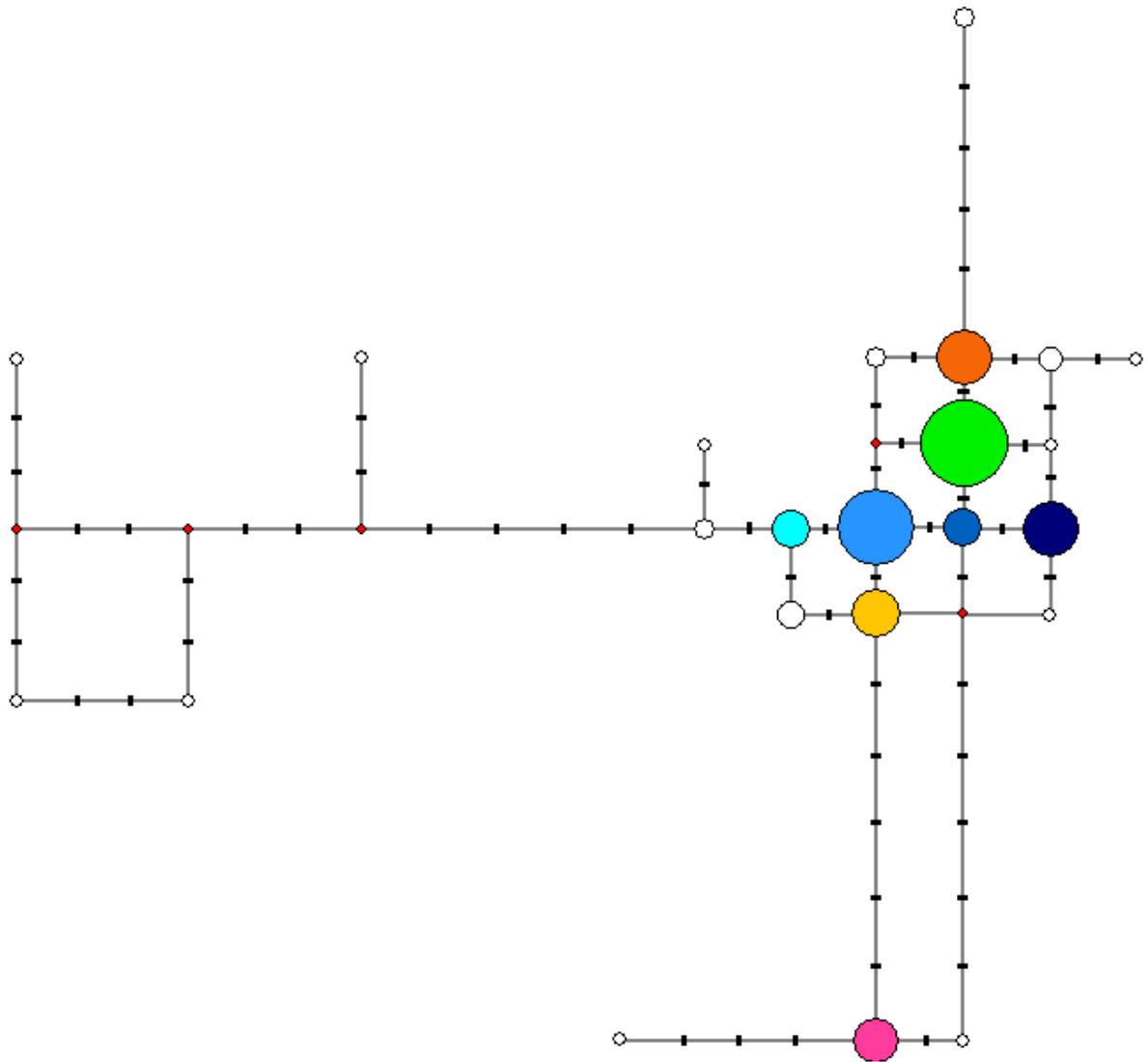


FIGURE 12 : RESEAU D'HAPLOTYPES REALISE EN APPLIQUANT L'ALGORITHM MEDIAN-JOINING DU LOGICIEL NETWORK. LA TAILLE DE CHAQUE DISQUE EST PROPORTIONNELLE AU NOMBRE D'INDIVIDUS PORTANT L'HAPLOTYPE CORRESPONDANT. LES HAPLOTYPES RARES SONT EN BLANCS ET LES POINTS ROUGES REPRESENTENT DES HAPLOTYPES ANCESTRAUX OBLIGATOIRES QUI ONT ETE PERDUS AU COURS DU TEMPS.

Le réseau haplotypique (fig.12) décrit les relations phylogéniques entre haplotypes. On observe que la majorité des haplotypes recensés sur *S. majus* appartiennent au cœur du réseau où il y a peu d'évènements de mutation. En périphérie de ce cœur se situent les haplotypes rares qui comportent un grand nombre de mutation.

Deux groupes d'haplotypes appartenant au cœur du réseau haplotypique (haplotypes bleu et vert) se retrouvent préférentiellement aux extrémités Nord/Nord Ouest et Sud Est de l'île :

- La région Nord/Nord Ouest (massif ancien) est en majorité constituée des haplotypes dégradés de bleus: H10, H11, H12, et H13. Ce groupe d'haplotypes partage le même allèle pour le marqueur NTCP 3. On retrouve en plus faible proportion l'haplotype H15 (vert) dans quelques populations. Les populations présentant une forte proportion de l'haplotype H7 (jaune) sont isolées des autres sites échantillonnés dans le massif ancien par des barrières géographiques. Il s'agit de Ravine Bernica, Bois de Quinquina séparées des autres populations par une grande ravine au nord (la rivière des galets) et de Salazie, situé dans un des 3 cirques du massif ancien.

- Le Sud/Sud Est (massif récent) se caractérise par une présence majoritaire de l'haplotype H15.

La région au centre de l'île, correspondant à la frontière entre le massif ancien et le massif récent, présente une plus grande hétérogénéité d'haplotypes, marquée notamment par l'existence de nombreux haplotypes rares. On retrouve en majorité les haplotypes H2 (rose) et H7 (orange foncé), qui ne sont pas partagés par les deux autres régions de l'île. Ces haplotypes sont marginaux d'après le réseau phylogénique. Les haplotypes bleu et vert se retrouvent en proportion équivalente.

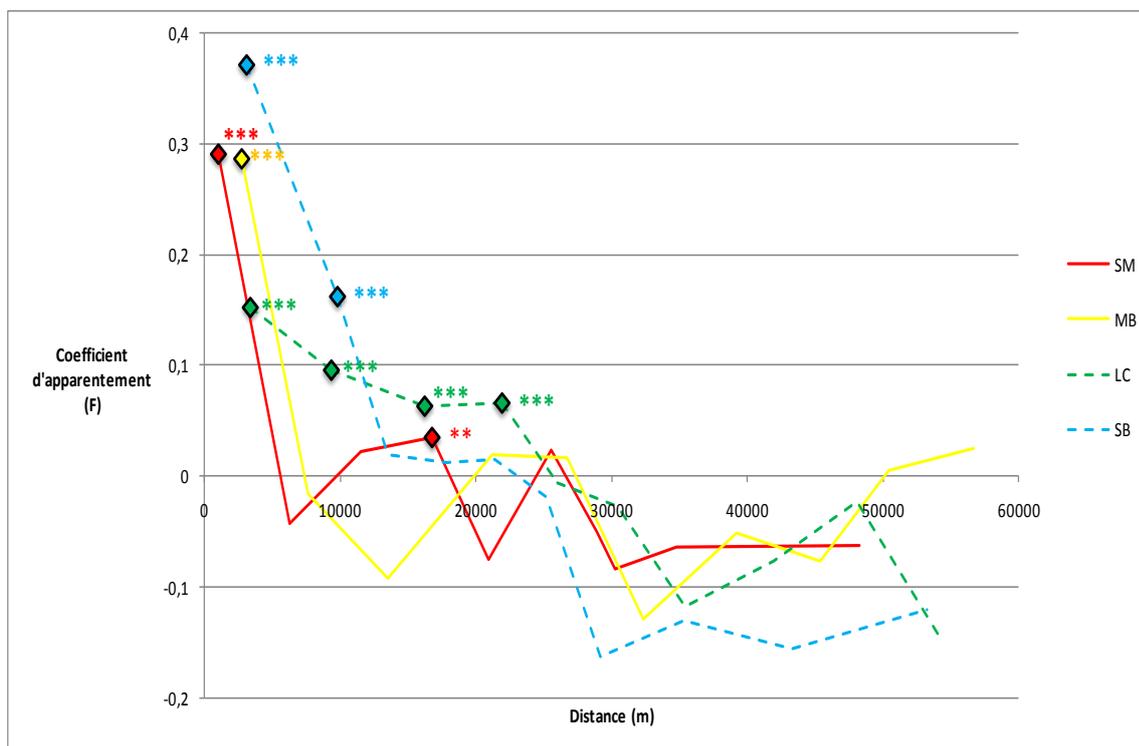


FIGURE 13: COEFFICIENT D'APPAREMENT DE LOISELLE POUR LES QUATRE ESPECES DE SAPOTACEES. SM : *S. MAJUS* MB : *M. BALATA* LC : *L. CALOPHYLLOIDES* SB : *S. BORBONICUM*

3.3 Diversité génétique, structures génétiques et phylogéographique

Tableau 6 : Diversité et différenciation génétique

Espèce	hS (SE)	vS (SE)	hT (SE)	vT (SE)	Gst (SE)	Nst (SE)
<i>Sideroxylon majus</i>	0.632(0.064)	0.567(0.067)**	0.858(0.036)	0.862(0.037)	0.264(0.067)	0.343(0.078)**
<i>Mimusops balata</i>	0.559(0.059)	0.489(0.060)*	0.898(0.016)	0.899(0.039)	0.378(0.067)	0.457(0.070)**
<i>Labourdonnaisia callophyloides</i>	0.647(0.062)	0.568(0.067)*	0.843(0.032)	0.845(0.058)	0.233(0.059)	0.328(0.061)**
<i>Sideroxylon borbonicum</i>	0.729(0.046)	0.534(0.063)**	0.971(0.008)	0.978(0.042)	0.249(0.046)	0.454(0.064)**

Ces résultats montrent une diversité génétique élevée chez chacune des quatre espèces avec $hT = 0,858$ pour *S. majus*, retrouvée au niveau intra population ($hS = 0,632$, SM).

Le signal phylogéographique est significatif lorsque $G_{ST} < N_{ST}$, en d'autres termes, lorsque les différents haplotypes rencontrés dans une même population sont phylogénétiquement plus proches qu'ils ne le sont avec les haplotypes d'autres populations. Pour *S. majus*, $G_{ST} = 0,264 < N_{ST} = 0,343$, il y a donc bien une structure phylogéographique. De la même façon, on observe une structure phylogéographique pour les trois autres espèces avec un G_{ST} significativement inférieur au N_{ST} .

3.4 Isolement et structure génétique spatiale : l'étude du coefficient d'apparentement de Loiselle

L'estimation du coefficient d'apparentement de Loiselle (F) révèle l'existence d'une structuration spatiale des individus au sein de l'île, plus ou moins marquée selon l'espèce considérée.

D'après la figure 13, pour *S. majus* le coefficient est significatif jusqu'à une distance de 1km, pour *M. balata* jusqu'à 4km, pour *S. borbonicum* jusqu'à 10km et pour *L. callophyloides* jusqu'à 22 km. L'isolement par la distance est montré par le fait que ce coefficient diminue avec la distance.

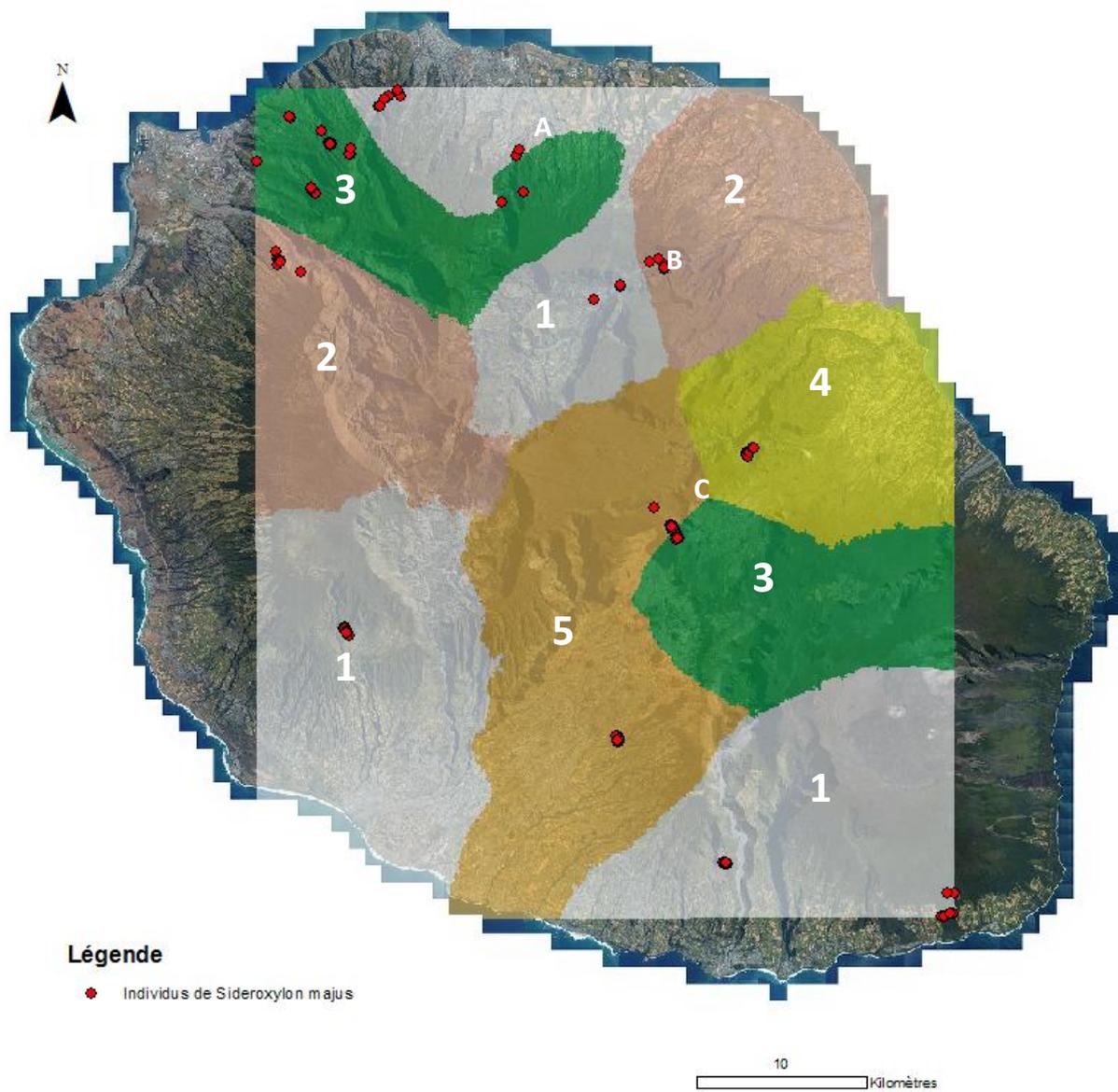


FIGURE 14 : CARTE DE REPARTITION SPATIALE DES POPULATIONS (OU GROUPES) DE *S. MAJUS* DETECTEES PAR GENELAND EN FONCTION DES RESEMBLANCES ENTRE HAPLOTYPES.

3.5 Visualisation de la structure génétique spatiale : définition de nouveaux groupes de population

Le programme Geneland a déterminé le nombre de groupes pouvant être définis au sein de l'ensemble des individus sur la base de la ressemblance entre haplotypes. Chaque individu est ainsi assigné à un numéro de groupe.

La carte fournie par Geneland (fig.14) met en évidence cinq populations distinctes englobant les individus de *S. majus* qui se ressemblent le plus génétiquement. On observe que les populations 1, 2 et 3 sont présentes à la fois dans la région Nord/Nord Ouest (massif ancien) et Sud Est (massif récent). Les populations 4 et 5 ne sont pas morcelées et sont localisées plutôt au centre de l'île. Certains groupes d'individus récoltés dans la même station d'échantillonnage se retrouvent dans deux groupes Geneland différents. C'est le cas de Salazie (noté A sur la figure 14), de Salazie (B) et de Petite Plaine (C).

Les cartes concernant les autres espèces sont regroupées en annexe 14. Les observations tirées sont les suivantes :

- *M. balata* (espèce à gros fruits) : Geneland a détecté 6 populations avec des aires de répartition non morcelées et bien plus grandes que pour les populations de *S. majus*.

- *L. calophylloides* (espèce à fruits de taille moyenne) : seulement 4 populations ont été mises en évidence. Leur aire de répartition est là aussi d'un seul tenant.

- *S. borbonicum* (espèce à petits fruits) : 5 populations ont été décelées. Les aires de répartition de 2 de ces populations sont morcelées.

3.6 Isolement et différenciation génétique entre régions : résultats des amova

Les populations échantillonnées ont été regroupées selon 2 critères :

- leur appartenance au massif ancien ou récent
- leur assignation de groupes donnée par Geneland (cf. fig. 14 et annexe 14)

Tableau 7 : Différenciation génétique à différentes échelles de populations

Groupes	Inter groupes		Inter populations intra groupe		Intra population	
	F _{CT}	% de variation	F _{SC}	% de variation	F _{ST}	% de variation
<i>Sideroxylon majus</i>						
Massif Ancien/Récent	-0.009	0	0.317***	32	0.311***	69
Groupes Geneland (K=6)	0.239***	24	0.129***	10	0.337***	66
<i>Mimusops balata</i>						
Massif Ancien/Récent	0.006	0	0.453***	45	0.456***	54
Groupes Geneland (K=6)	0.349***	35	0.207***	13	0.483***	52
<i>Labourdonnaisia callophyloides</i>						
Massif Ancien/Récent	0.141***	14	0.258***	22	0.363***	64
Groupes Geneland (K=4)	0.215***	22	0.175***	14	0.352***	65
<i>Sideroxylon borbonicum</i>						
Massif Ancien/Récent	0.153**	15	0.407***	34	0.497***	50
Groupes Geneland (K=5)	0.349***	35	0.227***	15	0.497***	50

En considérant les deux grands ensembles **Massif récent/massif ancien** pour *S. majus* :

- La variation observée au sein des populations représentent 69 % de la variation totale (F_{ST} = 0,311, P<0,001)
- La différenciation entre les populations au sein des groupes massif ancien/massif récent explique près d'un tiers de la variation totale (F_{SC} = 0,317 ; P<0,001).
- Les résultats concernant la différenciation génétique entre massif ancien et massif récent ne sont pas significatifs.

En se basant sur les **groupes définis par Geneland** :

- la variation observée au sein des populations des 5 groupes représente toujours une grande part de la variation totale : 66 % (F_{ST} = 0,337, P<0,001).
- la différenciation entre les populations des groupes Geneland n'explique ici que 10% de la variation totale (F_{SC} = 0,129, P<0,001).
- En revanche, le regroupement des individus en groupes définis par Geneland, est assez pertinent puisqu'il représente 24 % de la variation totale (F_{CT} = 0,239, P<0,001).

Rapport-Gratuit.com

Pour *M. balata*, *L. calophylloides* et *S. borbonicum*, les observations sont sensiblement les mêmes : la variation génétique totale observée chez ces espèces s'expliquent pour près d'un tiers par la diversité génétique entre groupes définis par Geneland. C'est aussi la variabilité génétique entre les populations de départ qui représente la plus grosse partie de la variation génétique totale.

4- DISCUSSION

4.1 Généralités sur les diversités génétiques et haplotypique

Pour les quatre espèces de Sapotacées étudiées, **la diversité génétique est forte** chez les individus adultes récoltés. Elle est comprise entre $hT=0,858$ chez *S. majus* et $hT= 0,971$ chez *S. borbonicum*. Ces valeurs sont supérieures à celles trouvées dans la littérature (elle est $0,797$ chez *Santiria trimera*, arbre retrouvé dans la strate supérieure des forêts tropicales (Koffi, 2010)).

La majorité des haplotypes identifiés se concentrent au cœur du réseau phylogénique. Cependant, la présence de plusieurs haplotypes rares gravitant autour, suggère l'existence passée de nombreux haplotypes intermédiaires qui ont été perdus au cours du temps. En outre, la grande hétérogénéité des haplotypes retrouvée au niveau de Petite Plaine et Grand Etang suggère que ces deux populations sont soit des **zones refuge** privilégiées lors de périodes climatiques passées particulières, soit des **zones de rencontre entre deux fronts de colonisation** (un venant du Sud de l'île et l'autre du Nord).

La diversité génétique est répartie spatialement en plusieurs groupes génétiques au sein de chaque espèce. Il apparaît que cette structuration spatiale, caractérisée par le phénomène **d'isolement par la distance**, est plus marquée **pour les espèces à gros fruits** (*S. majus* et *M. balata*). En effet, on distingue plusieurs centres de diversité assez morcelés, dont les limites géographiques coïncident avec **les grandes lignes du relief** (ravines et crêtes).

La structuration génétique spatiale des espèces à petits fruits (*L. calophylloides* et *S. borbonicum*) est moins nette. Les différents groupes génétiques détectés sont moins nombreux et de plus grande taille. A première vue, aucune hypothèse basée sur une répartition selon de grandes barrières naturelles ne valide la répartition observée. Cela pourrait s'expliquer par la présence d'oiseaux ou mammifères capables d'ingérer ces fruits de petite taille, (et par la même occasion les graines), pour ensuite les disperser sur un territoire plus vaste, que s'ils n'avaient été soumis qu'à l'action de la gravité (barochorie).

En résumé, on observe d'une part :

- un phénomène d'isolement par la distance, montré par des coefficients d'apparemment importants sur des distances variables selon l'espèce et qui sont fonction

de la taille du fruit (plus le fruit est gros, plus le coefficient d'apparement est fort sur de petites distances)

- des populations présentant une diversité génétique importante (Petite Plaine et Grand Etang) comme illustrée précédemment avec la figure 11, révélant l'existence de centres de diversité, signe de la présence de deux fronts majeurs de colonisation ou de l'existence de zones de refuges forestiers à un moment donné.

4.2 Remise en cause de l'hypothèse effet fondateur sur le massif récent du Piton de la Fournaise

L'hypothèse de départ postulait que la diversité génétique observée pour *S. majus* pouvait s'expliquer par deux événements de colonisation différés dans le temps : le premier sur le massif ancien du Piton des Neiges et le deuxième avec un effet fondateur sur le Piton de la Fournaise. Les résultats fournis par cette étude apportent des éléments nouveaux remettant en cause cette hypothèse.

4.2.1 DIFFERENCIATION ENTRE REGIONS

Les amova résumées dans le tableau 7 montrent que la séparation spatiale massif ancien/massif récent n'explique en rien la variation génétique totale observée. En revanche, près de 25% de la variation totale est expliquée en regroupant les individus en cinq grandes populations selon Geneland. En outre, au vue des informations apportées par la carte de répartition des haplotypes (figure 11), on pourrait supposer que la région centre de l'île, qui représente un important centre de diversité, pourrait être le point de convergence de deux fronts de colonisation.

4.2.2 STRUCTURE GENETIQUE ET PATRON PHYLOGEOGRAPHIQUE / ISOLEMENT ET DIFFERENCIATION GENETIQUE

La figure 13 montre clairement un isolement par la distance caractérisé par un flux de graines limité dans l'espace : l'apparentement entre les individus disparaît lorsque les individus sont séparés d'une distance supérieure à 1 km. La ségrégation spatiale des haplotypes s'explique en partie par le mode de dispersion barochore des graines de *S. majus*, qui par nature est limité dans l'espace. La rivière des galets ou encore la ravine des remparts constituent ainsi des barrières naturelles aux flux géniques.

4.2.3 HYPOTHESE D'UN PATRON DE COLONISATION DE L'ILE PAR LES *S. MAJUS*

L'absence de différenciation entre les deux grands ensembles Nord et Sud (cf. tableau 7) et la présence répétée des mêmes populations (pop 1,2 et 3) suggèrent que la colonisation de ces territoires ne s'est pas faite en deux vagues séparées dans le temps, mais de façon quasi simultanée. Le deuxième processus de colonisation serait donc la dispersion des Sapotacées de part et d'autre des deux centres de diversité localisés à Petite Plaine et Grand Etang.

La diversité génétique inter population observée au sein des 2 ensembles Nord et Sud s'expliquerait par la présence de barrières naturelles telles que les ravines, crêtes ou cascades, empêchant les flux de gènes entre populations. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que *S. majus* ne possède pas d'agents disperseurs (oiseaux, mammifères) capables de franchir de telles barrières. Les modes de dispersion barochore et hydrochore de *S. majus* limiterait la répartition des graines aux enclos formés par les ravines des versants montagneux des Pitons.

Méthode d'interprétation de la diversité génétique intra île (groupes définis par Geneland) pour les espèces à gros fruits :

Les observations tirées des résultats précédents servent de base pour établir un modèle de répartition de la diversité génétique chez *S. majus*, basé sur l'importance des paramètres topographiques (pentes, crêtes, falaise) et le réseau hydrographique (cascades et gros cours d'eau).

Dans un premier temps, il s'agit d'identifier les éléments majeurs du relief et du réseau hydrographique susceptibles de constituer des barrières aux flux de gènes entre populations. Dans un deuxième temps, des nouvelles zones de répartition des populations sont définies en se basant sur les données fournies par Geneland :

- pour chaque individu, on garde le numéro de groupe correspondant attribué par Geneland,

- cependant, les limites d'aires des populations ne sont pas définies aléatoirement comme dans le logiciel, mais en se basant sur les barrières naturelles du relief et le réseau hydrographique.

Les différentes étapes de construction du modèle sont décrites ci après.

Etape 1



FIGURE 15 : IDENTIFICATION DES ELEMENTS MAJEURS DU RELIEF MATERILISES PAR DES TRAIT NOIRS

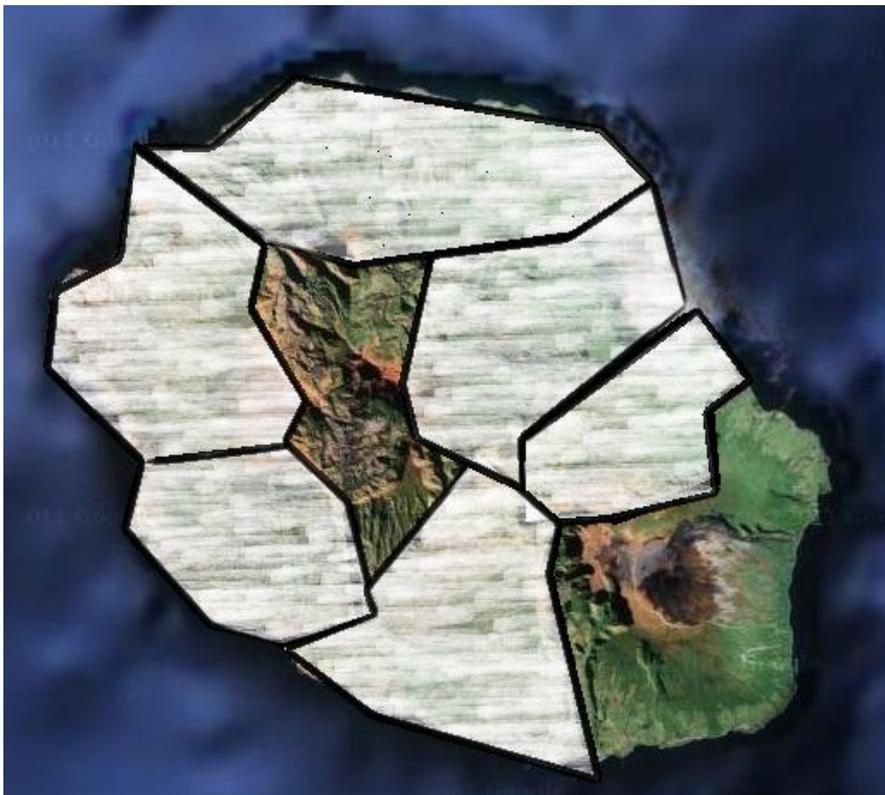


FIGURE 16 : CARTE DES ZONES DEFINIES EN FONCTION DU RELIEF ET DU RESEAU HYDROGRAPHIQUE

Etape1 : Démarcation des lignes majeures du relief (crêtes, grandes ravines) par des traits noirs, plus ou moins épais selon l'importance du relief. Cf. fig.15

En se basant sur l'orientation des pentes (décroissante du centre de l'île vers l'océan), on peut délimiter des zones (cf. fig. 16) dont les frontières sont matérialisées par les barrières naturelles (les traits noirs). Ces zones pourraient s'apparenter à des « bassins versants ». Les zones non hachurées sur la carte correspondent au Piton des Neiges (formé par les trois cirques Salazie, Mafate et Cilaos et au Piton de la Fournaise. La complexité du relief de ces zones nécessiterait une étude plus approfondie.

Etape 2 : En faisant correspondre l'aire de répartition des groupes génétiques définis par Geneland, avec la délimitation par zones on obtient une carte de répartition complète hypothétique des différents groupes présents au sein de l'espèce de Sapotacées. (en considérant que l'aire de répartition d'un groupe défini par Geneland s'étend jusqu'aux barrières naturelles) Cf. fig. 17.

Les zones hachurées en violet correspondent à des zones où les limites de groupes Geneland ne coïncident pas avec les limites naturelles du relief.

Etape 3 : Les individus de *S. majus* ont été classés en groupes par Geneland avec une probabilité d'appartenance pour chaque groupe. Sur certains individus, on retrouve la même probabilité d'appartenance pour deux groupes différents, d'où les incertitudes liées au modèle. Dès lors, une analyse plus poussée sur le jeu de données utilisées par Geneland dans la définition des groupes permet de cartographier les populations de *S. majus* comme illustré sur la figure 18a. Deux incertitudes, notées 1 et 2 sur la carte, concernent les individus échantillonnés à Ravine à Malheur, Rivière des Pluies et Moka Fontaine (1) et ceux de Salazie (2).

En procédant de la même façon pour l'autre espèce de Sapotacées à gros fruits *M. balata*, on peut établir un lien entre les groupes Geneland et le milieu naturel. La cartographie des groupes génétiques de *M. balata* illustrée en figure 18b montre clairement une structuration génétique liée au relief et au réseau hydrographique.

Etape 2

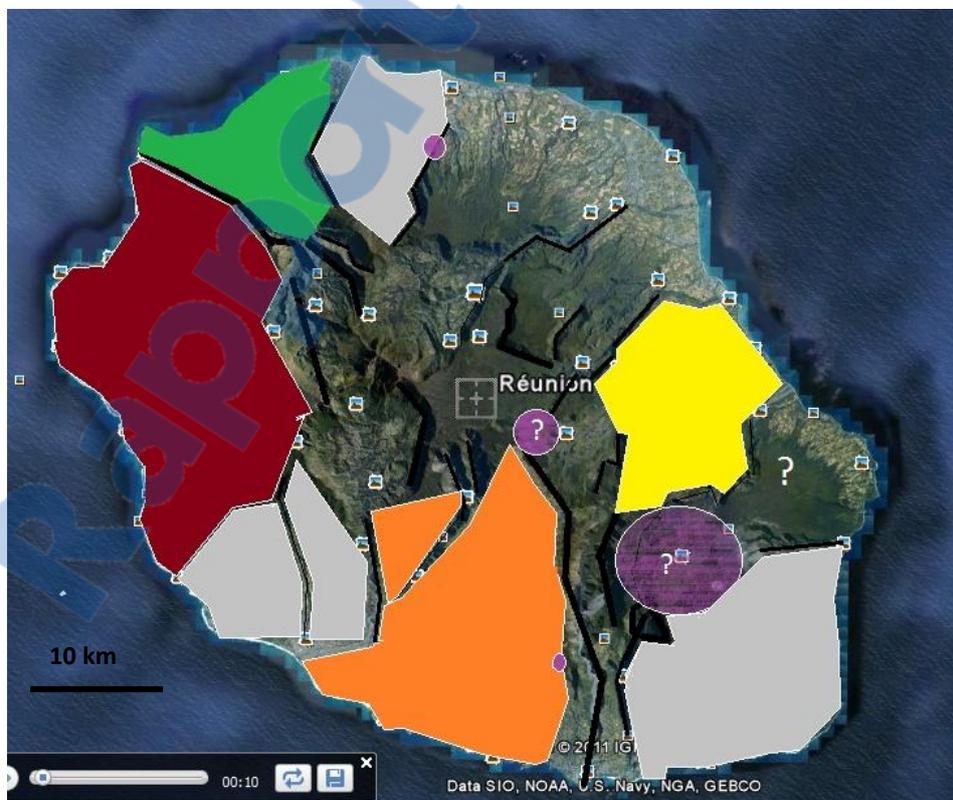
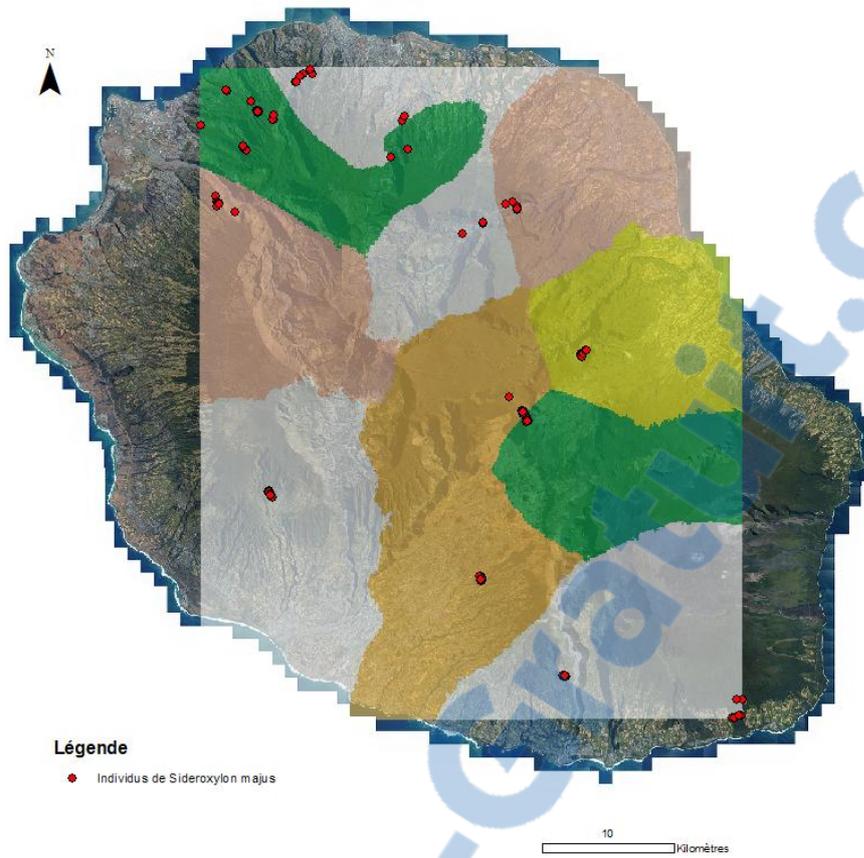


FIGURE 17 : HYPOTHESE DE ZONES D'AIRES DE REPARTITION DES GROUPES DE *S. MAJUS*

Etape 3

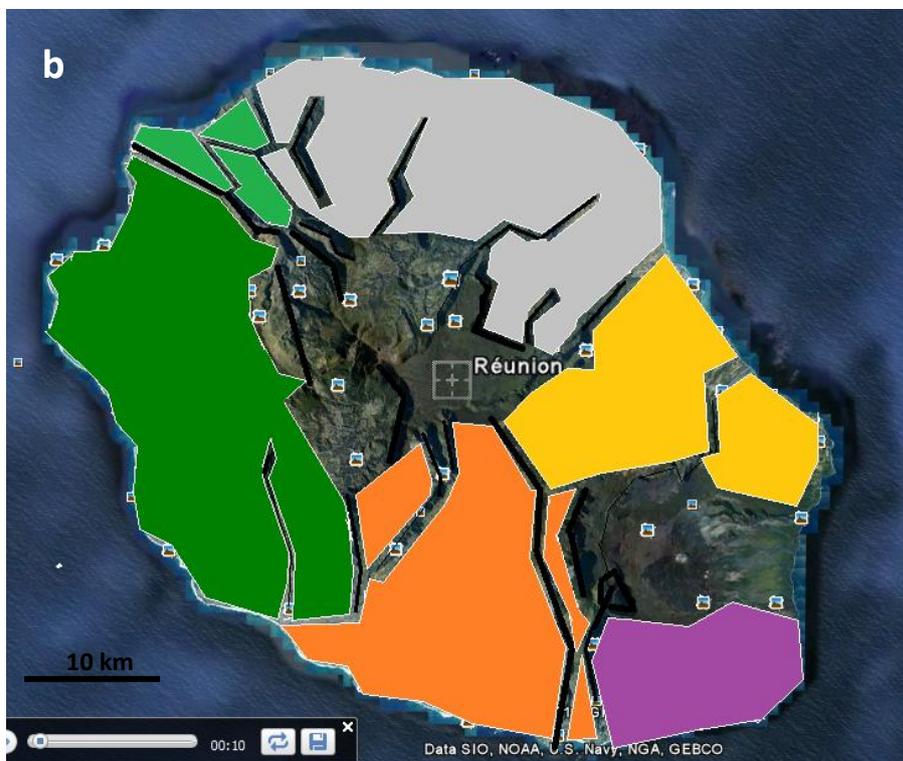
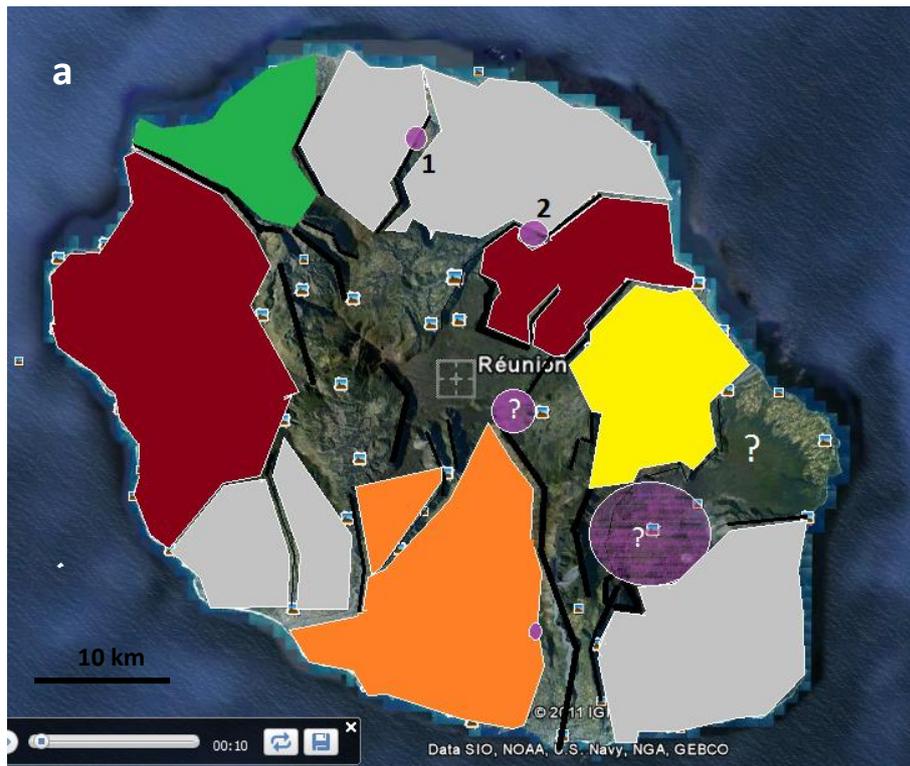


FIGURE 18 : CARTOGRAPHIE DES GROUPES HYPOTHETIQUES DE *S. MAJUS* (FIG. 18A) ET *M. BALATA* (FIG. 1B), MIS EN EVIDENCE A PARTIR DES GROUPES DEFINIS PAR GENELAND ET DES DONNEES GEOLOGIQUES ET HYDROGRAPHIQUES

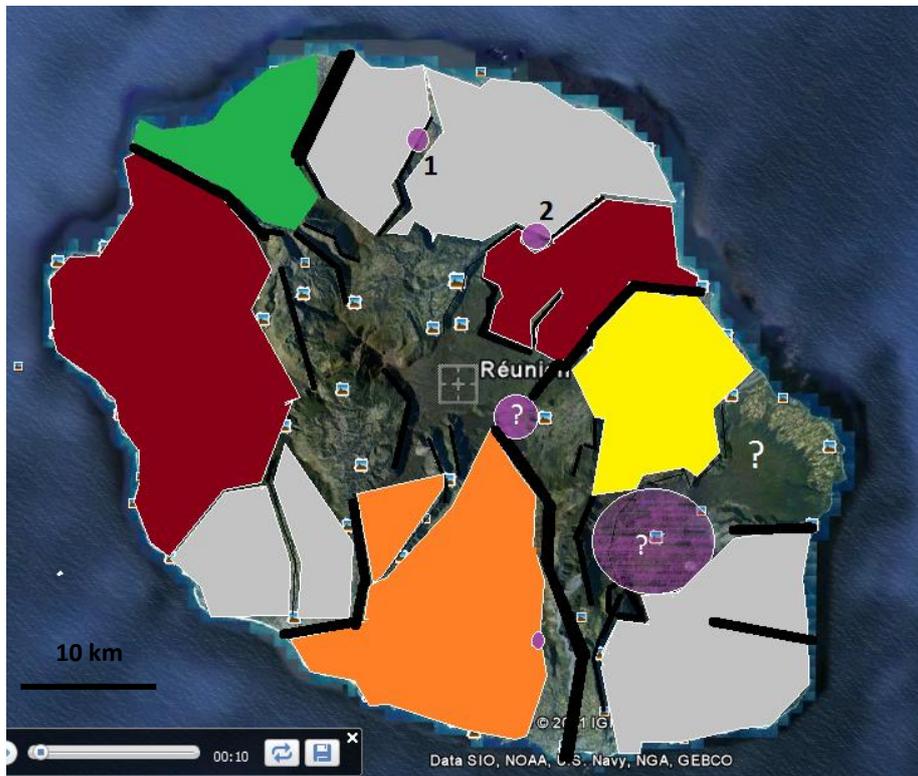


FIGURE 19 : BARRIERES NATURELLES PRINCIPALES AU FLUX DE GENES POUR *S. MAJUS*, REPRESENTES PAR DES TRAIT NOIRS

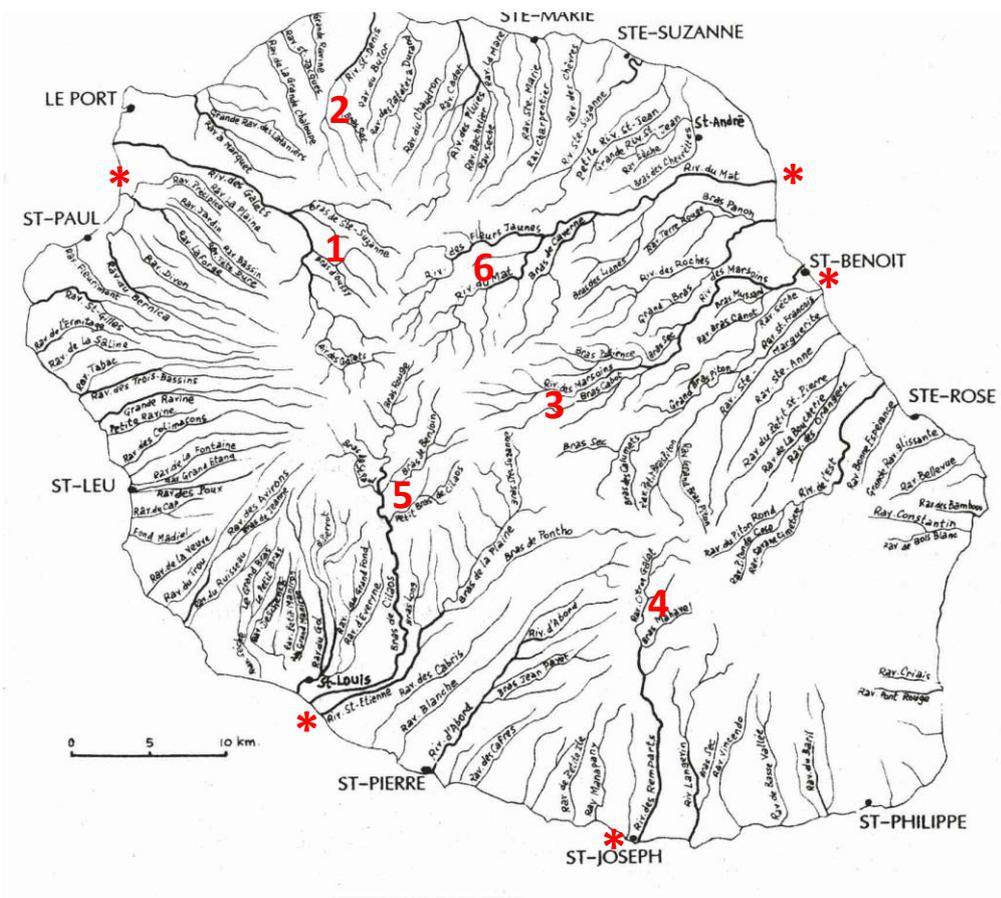


FIGURE 20 : RESEAU HYDROGRAPHIQUE DE L'ILE DE LA REUNION

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



A partir de ces deux cartes, des barrières naturelles principales peuvent être mis en évidence en repérant les frontières communes de populations inter espèces. (illustrées par des traits noirs épais sur la figure 17)

En repérant les cours d'eau principale du réseau hydrographique (figure 20), on observe que ces derniers correspondent avec les barrières naturelles mis en évidence précédemment. Ainsi, on peut établir que les principales barrières naturelles au flux de gènes entre populations correspondent à :

- la rivière des galets (nord ouest) [notée 1 au niveau de sa source et repérée par un astérisque rouge * à l'estuaire sur la figure 20]

- la rivière St Denis (nord ouest) [2]

- Bras sec et rivière des marsouins (est) [3]

- la rivière des remparts (sud) [4]

- le bras de Cilaos (sud ouest) [5]

Il y a une incertitude sur la rivière du Mat. [6]

En recoupant les données de Stéphanie Dafreville sur la génétique des Sapotacées de l'île Maurice, il s'est avéré qu'à la Réunion, seuls des individus autour de Petite Plaine et Sainte Thérèse présentent un haplotype commun, basé sur le marqueur NTCP 3, avec un groupe d'individus de *S. boutonianum* de Maurice.

De plus, cet ensemble autour de Petite Plaine et Sainte Thérèse présente une grande diversité d'haplotypes, provenant de la succession de mutations au cours du temps. Cela implique que ces populations portant des haplotypes rares sont présentes sur l'île depuis plus longtemps que celles présentant une diversité d'haplotypes moindre.

Ces observations suggèrent que le point de départ de la colonisation de l'île par *S. majus* se situe sur la côte Est de la Réunion au niveau de Petite Plaine (la disposition géographique des deux îles conforte cette hypothèse). Une approche phylogénétique approfondie entre Sapotacées de Maurice et de la Réunion, associées à l'étude de la dynamique des courants marins et aériens, apporteront des compléments d'informations concernant le processus de colonisation inter îles.

L'hypothèse de la colonisation de l'île de la Réunion par *S. majus* est résumée dans le schéma de la figure 21.

Sur la figure 21a est illustrée la première vague de colonisation. La zone colorée en bleu correspond à l'aire d'arrivée de l'espèce *S. majus* sur l'île. La zone de couleur jaune correspond à des territoires occupés postérieurement.

La figure 22 montre la répartition de la variabilité génétique totale en différents centres de diversité séparés par des barrières naturelles.



1ere phase de colonisation (venant de Maurice)

2eme phase de colonisation intra île

Barrières naturelles (ravines et crêtes)

Limites des cirques

1 - rivière des galets ; 2 - rivière St Denis ; 3 - Bras sec et rivière des marsouins ; 4 - rivière des remparts ; 5 - le bras de Cilaos ; 6 - rivière du Mat

FIGURE 21 : SCHEMA DE L'HYPOTHESE DE LA COLONISATION DE L'ILE DE LA REUNION PAR *S. MAJUS*



 1ere phase de colonisation (venant de Maurice)

 2eme phase de colonisation intra île

 Barrières naturelles (ravines et crêtes)

 Limites des cirques

1 - rivière des galets ; 2 - rivière St Denis ; 3 - Bras sec et rivière des marsouins ; 4 - rivière des remparts ; 5 - le bras de Cilaos ; 6 - rivière du Mat

FIGURE 22 : REPARTITION DES CENTRES DE DIVERSITE CHEZ *S. MAJUS*

CONCLUSION

La diversité génétique au niveau chloroplastique retrouvée chez l'ensemble des individus adultes de *S. majus* est forte, comparable à celle observée pour les trois autres espèces de Sapotacées, *L. calophylloides*, *M. balata* et *S. borbonicum*. L'étude a montré que cette diversité est structurée dans l'espace et a permis de mettre en évidence des groupes d'individus apparentés génétiquement au sein de chacune des espèces.

Concernant l'espèce d'intérêt écologique, *S. majus*, il semblerait qu'une fois arrivée sur l'île, cette espèce se soit différenciée en sous populations selon le relief et le réseau hydrographique. La disparition des agents disperseurs (Solitaire de la Réunion et autres oiseaux, tortues...) expliquerait l'incapacité pour *S. majus* de disperser ses graines au delà des ravines et crêtes de la Réunion. Cette hypothèse est toutefois discutable puisque ces animaux ont un déplacement assez restreint. Néanmoins, les éléments naturels façonnés par la structure géologique de l'île, constituent ainsi une barrière aux flux de gènes. De ce fait, les modes de dispersion barochore et hydrochore seraient à l'origine des différenciations allopatriques observées.

Il ressort de cette étude que les voies de colonisation intra île ne sont pas les mêmes pour toutes les espèces et sont fonction de la taille des fruits de l'espèce considérée, et donc du mode dispersion des graines associé. En effet, les espèces à gros fruits (*S. majus* et *M. balata*) à dispersion barochore et hydrochore, ont un patron de colonisation dépendant fortement des barrières naturelles (éléments du relief et du réseau hydrographique). En revanche, les espèces à fruits de taille réduite, disposant d'agents disperseurs telles que les oiseaux, présentent un patron de colonisation plus complexe que le relief accidenté à lui seul ne peut expliquer.

Les résultats présentés ne permettent pas d'affirmer l'existence de processus marqué de différenciation et spéciations. Cependant, on peut supposer que les groupes d'individus (groupes Geneland) mis en évidence chez les quatre espèces considérées pourrait être le début d'une divergence entre lignées d'une même espèce. Des études phylogénétiques approfondies entre les groupes pourraient conforter ou non cette hypothèse.

Il faut cependant garder à l'esprit que l'étude de la diversité génétique via des marqueurs neutres chloroplastiques à hérédité maternelle, ne suffit pas à elle seule à comprendre la dynamique des populations. En effet, la différence de mode d'héritabilité des marqueurs peut apporter des informations complémentaires pour caractériser la diversité génétique et sa structuration spatiale. Cette étude s'est centrée sur l'analyse des flux de gènes limités aux graines. La caractérisation des flux de gènes via le pollen et l'étude de marqueurs nucléaires sont donc primordiales.

Rapport-Gratuit.com

En outre, il faut continuer l'effort d'échantillonnage en augmentant le nombre d'individus collectés et en couvrant les zones encore peu explorées. Il semble intéressant de redéfinir les sites d'échantillonnage en fonction des zones délimitées par les éléments du relief et le réseau hydrographique, pour vérifier la nouvelle hypothèse émise concernant les patrons de différenciation intra île chez les espèces de Sapotacées à gros fruits *S. majus* et *M. balata*.

PERSPECTIVES

Dans ce mémoire, a été abordée l'interprétation de la diversité génétique des Sapotacées au sein de l'île de la Réunion. Une approche des scénarios de colonisation par les Sapotacées de l'ensemble de l'archipel des Mascareignes (approche inter îles) apporterait des éléments nouveaux de réflexion.

Les deux espèces à gros fruits *S. majus* et *M. balata* présentent des populations fragmentées, isolées géographiquement par les grandes barrières naturelles de la Réunion. Il serait intéressant de voir si ce phénomène s'observe aussi chez des espèces à gros fruits d'autres familles d'arbres. Si c'est le cas, cela mettrait en évidence l'influence des agents disperseurs de grande taille dans la dispersion des espèces.

En résumé, la diversité génétique est encore importante chez ces quatre espèces de Sapotacées, cependant la pression du milieu (perte d'agents disperseurs, relief accidenté...) et l'impact anthropique (caractérisé par la fragmentation du paysage) pourrait à terme mener à une diminution du pool génétique causée par une réduction des flux de gènes entre populations. Les études réalisées sur les juvéniles de *S. majus* montrent d'ailleurs une diminution de la diversité génétique des régénérations par rapport aux individus adultes. Partant de ce constat, il semble judicieux d'orienter les plans de conservation de la biodiversité vers une gestion éco systémique des forêts réunionnaises en insistant sur l'importance de la continuité écologique entre les différents milieux.

L'approche de la structuration génétique des espèces de Sapotacées à l'échelle de l'ensemble des îles de l'archipel des Mascareignes (donc plus vaste que l'approche intra île réalisée dans ce mémoire) apportera une meilleure compréhension de la dynamique de ces populations structurant l'écosystème forestier.

BIBLIOGRAPHIE

- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, Jr., E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reed, and N. C. Saunders** (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489–522.
- Bogaert J., Bamba I., Kabulu J.P., Koffi K. J., De Cannière C., Visser M. & Sibomana S.** (2008). Fragmentation of Forest Landscapes in central Africa: causes, consequences and management. In *Patterns and Processes in Forest Landscapes: Multiple Use and Sustainable Management*. (eds. Laforteza R., Chen J., Sanesi G. & Crow Th.R.), pp. 67-87
- Bogaert J., Rousseau R., Van Hecke P. & Impens I.** (2000). Alternative area-perimeter ratios for measurement of 2D shape compactness of habitats. *Applied Mathematics and Computation* **111**: 71-85.
- Born C.**, (2007). Diversité génétique et dynamique des forêts d’Afrique centrale. Thèse de doctorat. Université Montpellier II. 13-14.
- Bray L.** (2009). L’espèce, discussion d’une notion intuitive. *Hommes et planètes* **43** : 32-35.
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., da Fonseca, G.A.B., Gerlach, J. Hoffman, M., Lamoreux, J.F., Mittermeier, C.G., Pilgrim, J.D. & Rodrigues, A.S.L.** (2006) Global biodiversity conservation priorities. *Science*. **313**, 58-61.
- Burel F., Baudry J.**, (2000). Ecologie du paysage : concepts, méthodes et applications. Editions TEC & DOC, Paris.
- Cadet L.J.T.** (1977). La végétation de l’île de la réunion, étude phytoécologique et phytosociologique. Université d’Aix-Marseille III.
- Cordemoy de, E. J.** (1895). Flore de l’île de La Réunion. Paris, 574.
- CBNM.** (2008). Index de la flore vasculaire de la Réunion (Trachéophytes) : statuts, menaces et protections. - Version 2007.1 (mise à jour du 12 juin 2007). Conservatoire Botanique National de Mascarin, Saint-Leu.
- Cosson J.F., Estoup A., Coulon A., Galan M., Mortier F., Hewison A.J.M. et al.** (2006). Un modèle géostatistique pour la détection et la localisation des discontinuités génétiques spatiales entre populations. *Les Actes du BRG* **6** : 41-55.
- Courtillot V., Besse J., Vandamme D., Montigny R., Jaeger J-J. et Capetta H.** (1886). Deccan flood basalts at the Cretaceous/tertiary boundary? *Earth Planet. Sci Lett.* **80**, 361-374
- Duncan R.** (1981). Hotspots in the Southern Oceans –An absolute frame of reference for motion of the Gondwana continents. *Tectonophysics* **74**, 29-42

Dafreville S., (2009) : Données non publiées, obtenues dans le cadre de la thèse en cours : Dynamique de dispersion d'espèces structurantes des écosystèmes forestiers, les Sapotacées, à différentes échelles spatiales et temporelles. Université de la Réunion.

Dauby G., Koffi G., Hardy O., Daïnou K., Debout G., Doumenge C., Duminil J., Heuertz M. & Ley A (2010). Patrons phylogéographiques chez les arbres du Bas-Guinéen – une comparaison inter-espèces

Dyer R.J., Nason J.D. (2004). Population Graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Molecular Ecology* 13: 1713-1727

Friedmann, F. (1981). 116. Sapotacées, in Bosser, J., Cadet, T., Guého, J., Marais, W. (eds). Flore des Mascareignes : La Réunion, Maurice, Rodrigues., The Sugar Industry Research Institute, Mauritius. 1-27

Govaerts R., Frodin D.G., et Pennington T.D., (2001). World checklist and bibliography of Sapotaceae. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

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

Hardy O. J., Charbonnel N., Fréville H., Heuertz M. (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163 : 1467-1482.

Kaueffer A. (2008). Dynamique de la diversité génétique et effets fondateurs : l'exemple du mouflon (*Ovis aries*) de Kerguelen. Thèse de doctorat. Université du Québec et Université Claude Bernard, Lyon

Koffi G., (2010), Etude de la variabilité génétique et de la phylogéographie de *Santiria trimera* (Burseraceae) - implications pour une conservation durable des forêts humides d'Afrique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles

Kobmoo, (2009), Contribution à l'étude des patrons de spéciation et de diversification chez les Ficus et les Chalcidiens mutualistes/parasites associés. Thèse de doctorat. Université de Montpellier II.

Lavergne, R. (1990). Le grand livre des tisaneurs et plantes médicinales indigènes de La Réunion. Orphie, Livry-Gargan, 521.

Leakey, R., & Levine, R. (1995), The Sixth Extinction, Doubleday.

Leclerc S. (2007). Origine des séquences microsatellites dans les génomes eucaryotes- Leçons tirées de la séquence du génome humain. Thèse de doctorat. Université de Montpellier III.

Loiselle B. A., Sork, V. L. Nason J., and Graham C. (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82:1420-142

Magri, D., Vendramin, G.G., Comps, B., Dupanloup, I., Geburek, T., Gömöry, D., Lata'owa, M., Litt, T., Paule, L., Roure, J.M., Tantau, I., van der Knaap, W.O., Petit, R.J., de Beaulieu J-L. (2006). A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences *New Phytologist*, 171: 199–221.

Morgan W.J. (1981) Hotspot tracks and the opening of the Atlantic and Indian Oceans. In : C.Emiliani (ed.) *The sea*. Wiley: New York

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G. da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for biodiversity priorities. *Nature*, 403, 853-858.

Ouborg N. J., Vergeer P. and Mix C. (2006). The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. *Journal of Ecology* 94:1233-1248.

Payet G., (2010). Impact de la fragmentation du milieu forestier sur la structure spatiale de la diversité génétique et sur les flux de gènes d'une espèce endémique de La Réunion : *S. majus*. Mémoire de Master II, Université de la Réunion.

Pertoldi C., Bijlsma R. and Loeschcke V. (2007). Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. *Biodiversity and Conservation* 16:4147-4163.

Pereboom V. – (2006). Mode d'utilisation du milieu fragmenté par une espèce forestière aux habitudes discrètes : la Martre européenne. Doctorat de l'Université d'Angers.

Petit R, Kremer A, Wagner DB (1993) Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity* 71: 630-641.

Petit R., Hu F.S., Dick C.W (2008). Forests of the Past: A Window to Future Changes *Science*:Vol. 320. no. 5882, pp. 1450

Pons, O. and Petit, R. J. (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144: 1237–1245

Rousset F. (2000). Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* 13 : 58-62.

Russell A. Mittermeier & Patricio Robles Gil (ed.) (2004). Hotspots revisited, *Cemex*, Mexico, 390 p. ISBN 968-6397-77-9

Strasberg, D., Rouget M., Richardson D., Baret S., Dupont J. and Cowling R. (2005). An Assessment of Habitat Diversity and Transformation on La Reunion Island (Mascarene

Islands, Indian Ocean) as a Basis for Identifying Broad-scale Conservation Priorities. *Biodiversity and Conservation* 14:3015-3032.

Strasberg, D. (1996). Diversity, size composition and spatial aggregation among trees on a 1-ha rain forest plot at La Réunion. *Biodiversity and Conservation* 5:825-840.

Wright S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28 : 114-138

Vekemans X., et Hardy O.J. (2004). New insights from fine scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13: 921-935

Wright, S. J. and H. C. Muller-Landau. (2006). The future of tropical forest species. *Biotropica* 38:287–301.

Zane L., Bargelloni L. and Patarnello T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11 (1):1-16.

Rapport-Gratuit.com

ANNEXES

Annexe 1 : Carte de répartition des 34 hot spots de biodiversité

Annexe 2 : Premiers résultats concernant les études menées par Stéphanie Dafreville sur la dispersion de *S. majus*

Annexe 3 : Photo de longose (*Hedychium gardnerianum*), peste végétale de l'île de la Réunion.

Annexe 4 : Cartes des distributions mondiales des genres *Sideroxylon*, *Mimusops* et *Labourdonnaisia*

Annexe 5 : Description du Dodo de l'île Maurice

Annexe 6 : Profil de la forêt mégatherme hygrophile (La Mare Longue, St Philippe, altitude 500m)

Annexe 7 : Succession des stades de la végétation de la série dynamique mégatherme hygrophile

Annexe 8 : Carte de répartition des populations échantillonnées pour *S. majus*

Annexe 9 : Protocole DNeasy Plant Mini Kit pour l'extraction de l'ADN

Annexe 10 : Conditions de PCR du test de vérification des extractions ADN

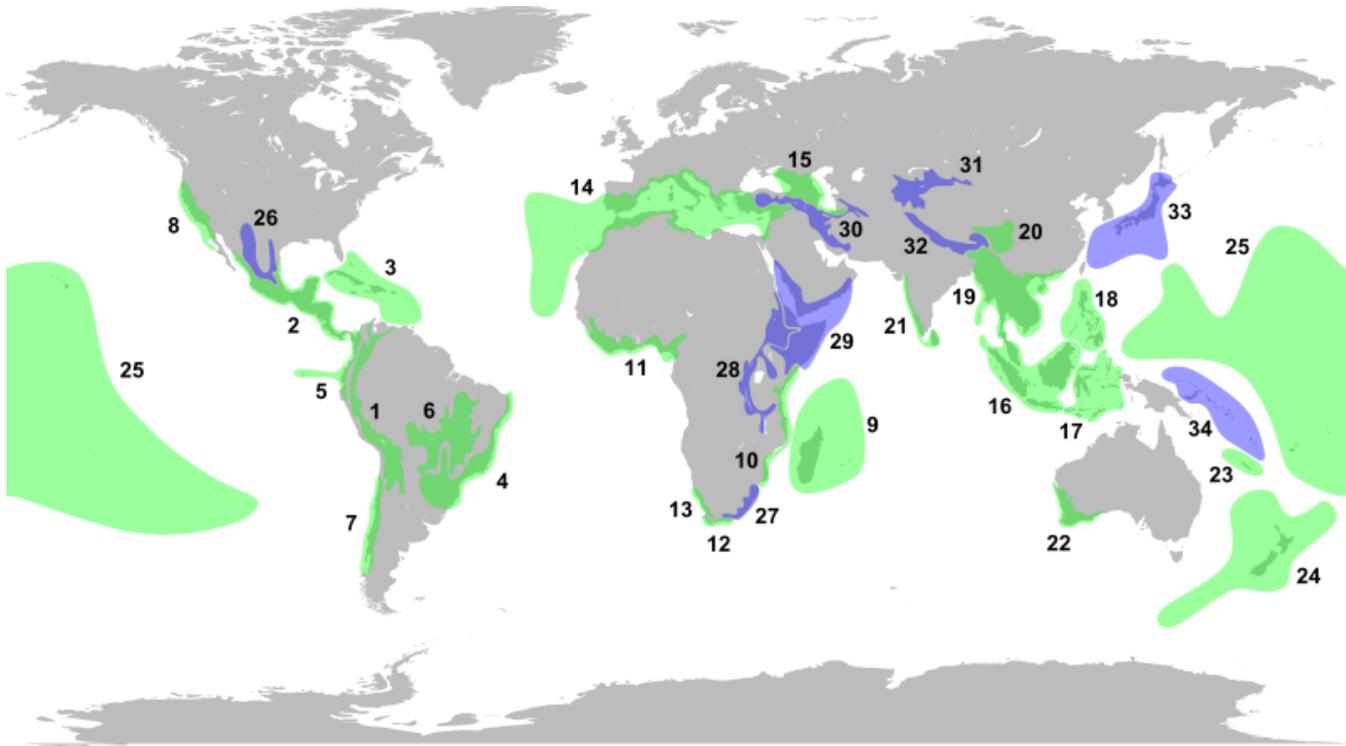
Annexe 11 : Exemple de gel issu de l'électrophorèse des produits de l'extraction ADN après révélation aux UV

Annexe 12 : Liste des haplotypes recensés chez les 4 espèces de Sapotacées étudiées

Annexe 13 : Cartes de répartition spatiale des haplotypes et réseau phylogénétique d'haplotypes associé pour *M. balata*, *Labourdonnaisia calophylloides* et *Sideroxylon borbonicum*

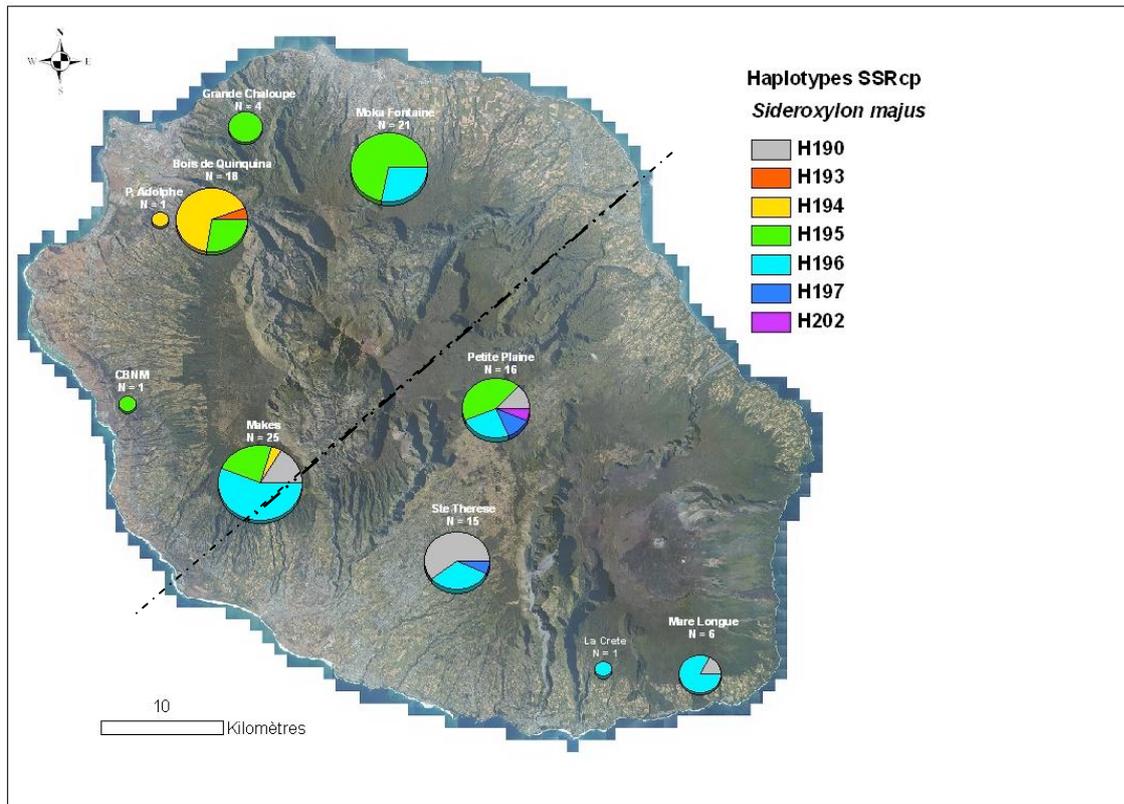
Annexe 14 : Cartes de répartition spatiale des populations détectées par Geneland pour *M. balata*, *Labourdonnaisia calophylloides* et *Sideroxylon borbonicum*

Annexe 1 : Carte de répartition des 34 hot spots de biodiversité, dont 25 ont été définis par Myers et al. (2000) en vert et 9 autres rajoutés par Russell A. et al., 2004



- | | |
|--|------------------------------------|
| 1. The Tropical Andes | 21. Western Ghats and Sri Lanka |
| 2. Mesoamerica | 22. Southwest Australia |
| 3. The Caribbean Islands | 23. New Caledonia |
| 4. The Atlantic Forest | 24. New Zealand |
| 5. Tumbes-Chocó-Magdalena | 25. Polynesia and Micronesia |
| 6. The Cerrado | 26. The Madrean Pine-Oak Woodlands |
| 7. Chilean Winter Rainfall-Valdivian Forests | 27. Maputaland-Pondoland-Albany |
| 8. The California Floristic Province | 28. The Eastern Afromontane |
| 9. Madagascar and the Indian Ocean Islands | 29. The Horn of Africa |
| 10. The Coastal Forests of Eastern Africa | 30. The Irano-Anatolian |
| 11. The Guinean Forests of West Africa | 31. The Mountains of Central Asia |
| 12. The Cape Floristic Region | 32. Eastern Himalaya |
| 13. The Succulent Karoo | 33. Japan |
| 14. The Mediterranean Basin | 34. East Melanesian Islands |
| 15. The Caucasus | |
| 16. Sundaland | |
| 17. Wallacea | |
| 18. The Philippines | |
| 19. Indo-Burma | |
| 20. The Mountains of Southwest China | |

Annexe 2 : Premiers Résultats concernant les études menées par Stéphanie Dafreville sur la dispersion de *S. majus*, à la base de l'hypothèse initiale du schéma de colonisation.

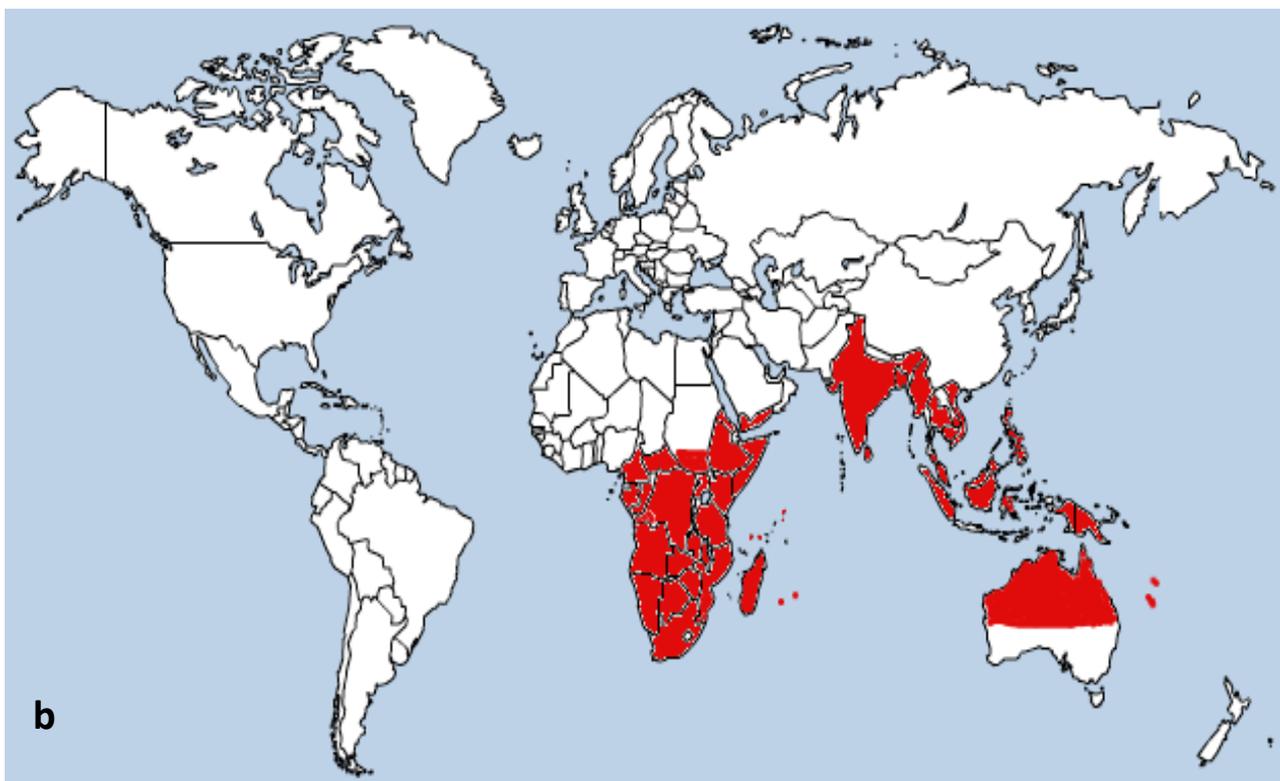
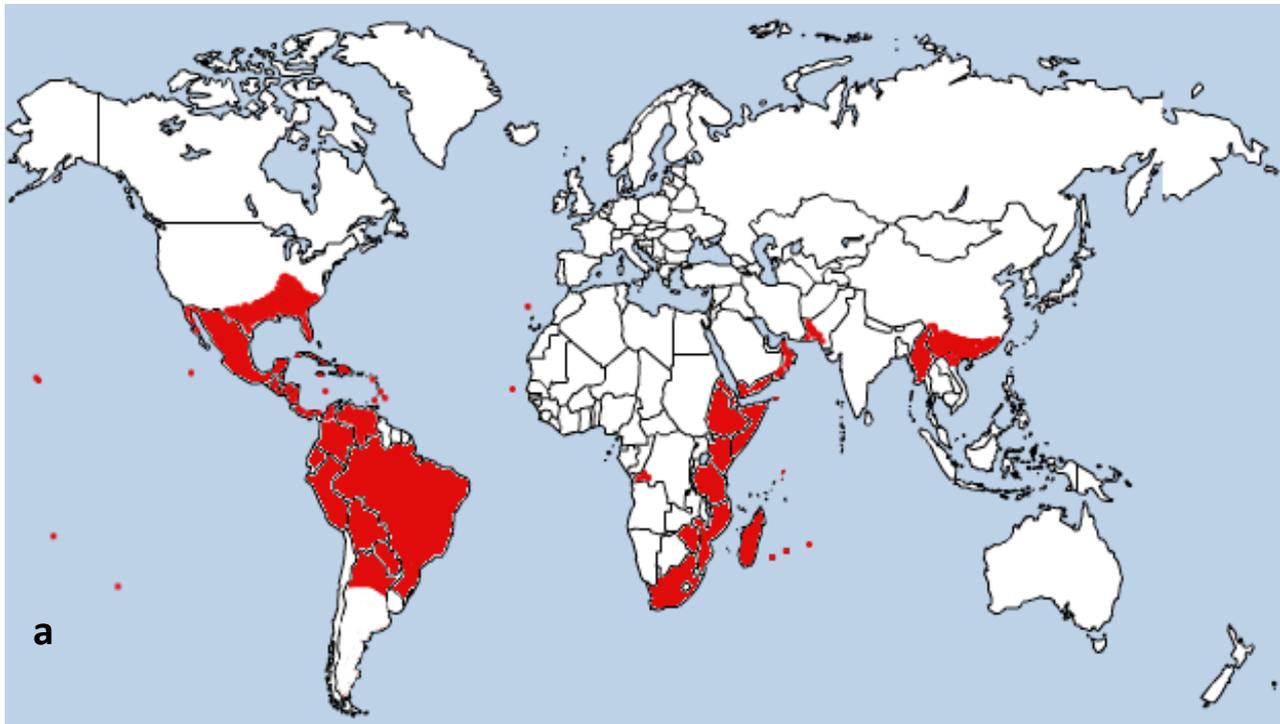


Carte de répartition des différents haplotypes obtenus à partir du marqueur microsatellite chloroplastique NTCP3 pour *S. majus* à la Réunion (D'après les travaux de Dafreville, 2010, données non publiées). La ligne pointillée noire matérialise la frontière entre le massif ancien du Piton des Neiges (au nord) et le massif récent du massif ancien du Piton de la Fournaise (au Sud).

Annexe 3 : Photo de longose (*Hedychium gardnerianum*), peste végétale de l'île de la Réunion.



Annexe 4 : Cartes des distributions mondiales (zones rouges) des genres *Sideroxylon* (a), *Mimusops* (b) et *Labourdonnaisia* (c). Famille des Sapotacées. (Source : www.mobot.org/mobot/research/APweb/orders/ericalesweb.htm, 2011)



Rapport-Gratuit.com



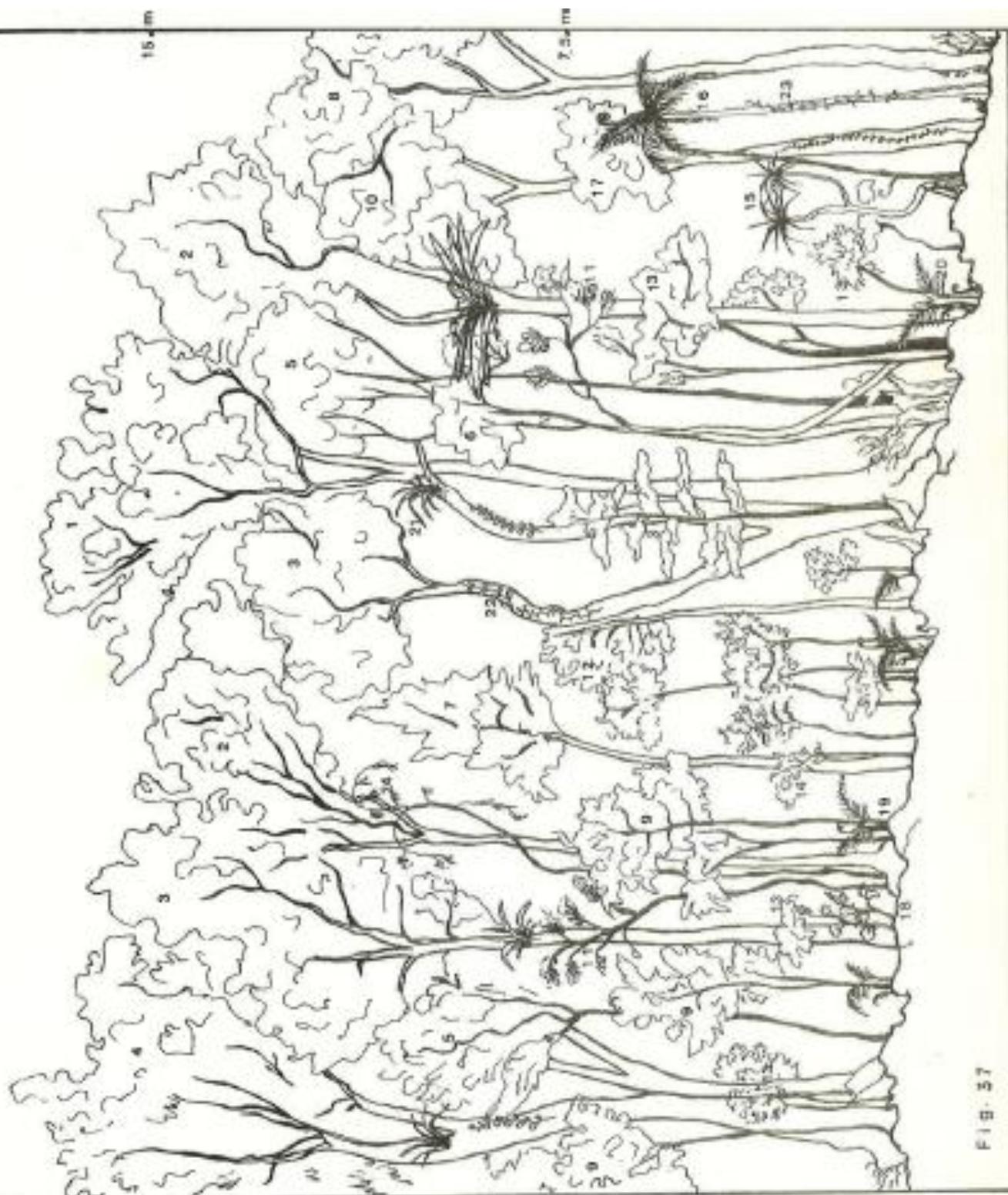
Annexe 5 : Description du Dodo de l'île Maurice



Source : Album de la Réunion, Antoine Roussin

Le dodo, ou dronte (*Raphus cucullatus*), est un oiseau disparu de la famille des raphidés (ordre des columbiformes). Cette espèce, vivait autrefois dans l'archipel des Mascareignes, où, du fait de l'absence de prédateurs, elle avait perdu son aptitude au vol. De la taille d'un dindon et incroyablement maladroit dans ses mouvements, le dodo grattait le sol des forêts à la recherche de fruits, feuilles, baies et graines qui constituaient son alimentation. Il pesait une douzaine de kilos et portait un plumage gris et noirâtre. Le Dodo de l'île Maurice possède un « équivalent » à la Réunion, appelé Solitaire de la Réunion. Le premier renseignement sur le Solitaire de l'île de la Réunion est donné par le capitaine Castelon qui y aborda en 1613.

Annexe 6 : Profil de la forêt mégatherme hygrophile (La Mare Longue, St Philippe, altitude 500m) dessiné d'après une photographie. Tiré de Cadet, 1977.



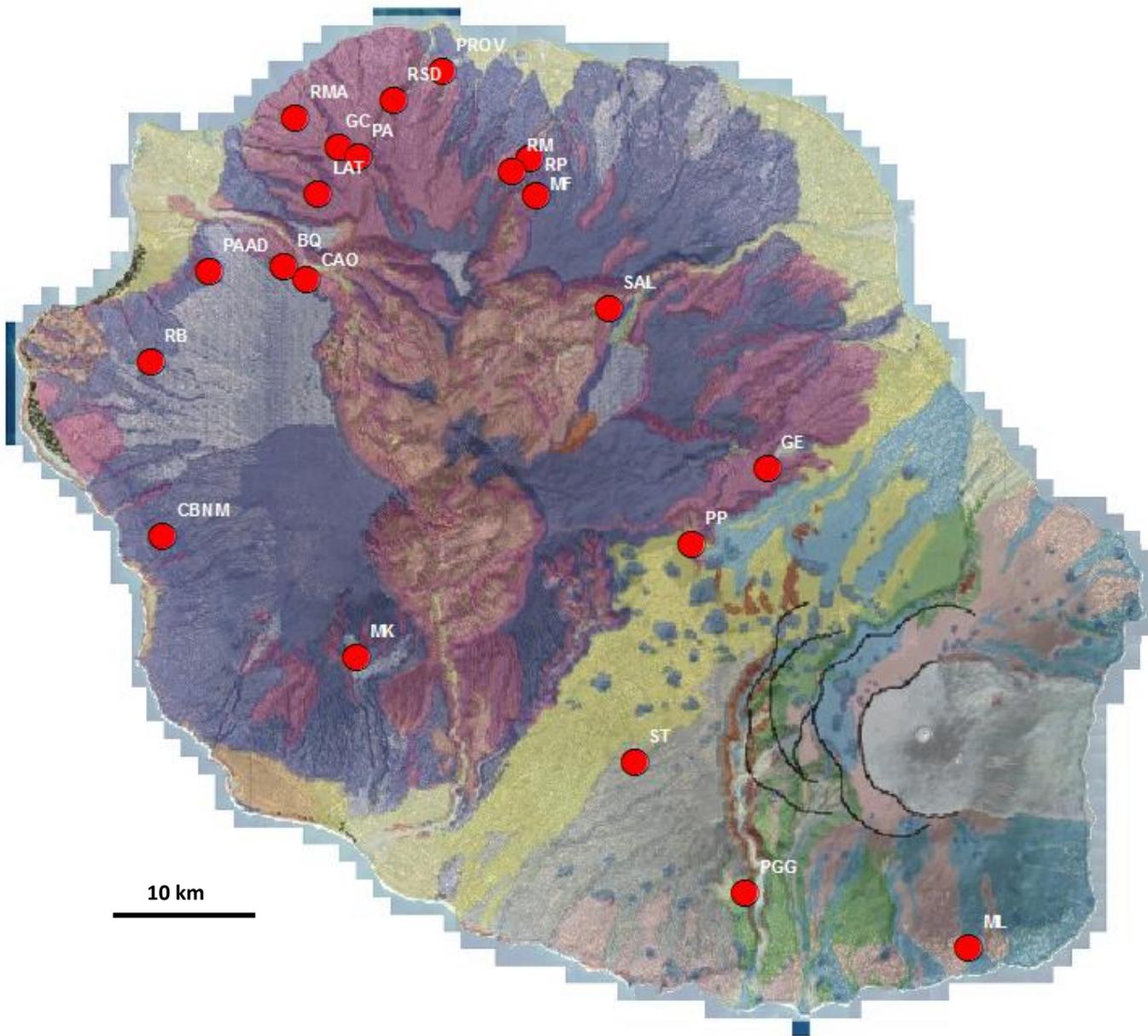
Légende de l'annexe 6

- 1 - *Nuxia verticillata*
- 2 - *Weinmannia tinctoria*
- 3 - *Labourdonnaisia callophyloides*
- 4 - *Psiloxylon mauritianum*
- 5 - *Antirrhoea verticillata*
- 6 - *Cordemoya integrifolia*
- 7 - *Mamecylon confusum*
- 8 - *Polyscias repanda*
- 9 - *Gaertnera vaginata*
- 10 - *Aphloia theaeformis*
- 11 - *Tabernaemontana mauritiana*
- 12 - *Coffea mauritiana*
- 13 - *Psychotria boryana*
- 14 - *Bertiera borbonica*
- 15 - *Pandanus purpurascens*
- 16 - *Cyathea borbonica*
- 17 - *Myonina myrtifolia*
- 18 - *Begonia aptera*
- 19 - *Asplenium lineatum*
- 20 - *Pteris scabra*
- 21 - *Elaphoglossum tomentosum*
- 22 - *Piper pyriforme*
- 23 - *Lomariopsis pollicina*
- 24 - *Cnestis glebra*

Annexe 7 : Succession des stades de la végétation de la série dynamique mégatherme hygrophile

Stades Espèces caractéristiques	Synusie bryo-lichénique	Nephrolepis abrupta + Agauria salicifolia	Agauria + Sideroxylon + Dicranopteris	Sideroxylon + Nephrolepis biserrata	Labourdonnaisia + Nephrolepis biserrata	Forêt climacique
Stereocaulon						
Nephrolepis abrupta						
Agauria salicifolia						
Sideroxylon borbonicum						
Dicranopteris linearis						
Nephrolepis biserrata						
Labourdonnaisia callophyl.						
Herbac. diverses						
Age en années						
- lave scoriacée	10	44	170	250	200	
- lave paléohoe		33				

Annexe 8 : Carte de répartition des populations échantillonnées pour *S. majus*



Bois de quinquina	BQ	Plaine des grègues	PGG
Canalisation des Orangers	CAO	Petite Plaine	PP
Conservatoire Botanique National des Mascariens	CBNM	Ravine Bernica	RB
Grande Chaloupe	GC	Ravine Montauban	RM
Grand Etang	GE	Ravine à malheur	RMA
Ravine latanier	LAT	Rivières des pluies	RP
Makes	MK	Rivière st denis	RSD
Mare Longue	ML	Salazie	SAL
Plaine d'Affouches	PA	Forêt de Ste Thérèse	ST

Rapport-Gratuit.com

Annexe 9 : Protocole DNeasy Plant Mini Kit pour l'extraction de l'ADN

- Température de la pièce : 20-25°C.
- Broyage de 100 mg de matériel frais ou 30mg de matériel sec au broyeur automatique avec du sable et 10 mg de PVP (Poly(n-vinyl-2 pyrrolidone), un anti oxydant permettant d'éliminer certains inhibiteurs de PCR (Rogers & Bendich, 1985) et qui agit contre les tanins.
- Mise en tube eppendorf de 2µl avec 2 billes en verre (4mm de diamètre)
- Ajout de 400µl de tampon d'extraction AP1 préchauffé à 65°C et 4 µl de RNAse
- Incubation une heure à 65°C après agitation.
- Ajout de 130 µl de tampon AP2
- Agitation
- Incubation 5 minutes dans de la glace
- Centrifugation 10 minutes à 14 000 tours par minutes (20 000 g) à 25°C.
- Récupération du surnageant placé dans une colonne QIAshredder Mini spin (colonne violette) avec un tube collecteur de 2ml
- Centrifugation 3 minutes à 14 000 tours par minute (20 000 g) à 25°C.
- Récupération du l'éluat dans un tube collecteur de 2 ml vide
- Ajout de 1,5 fois le volume de tampon AP3 (additionné d'éthanol) ~600µl, soit un volume final d'environ ~650µl.
- Agitation par refolement
- Transfert sur la colonne DNeasy Mini spin (colonne blanche) avec un tube collecteur de 2µl,
- Centrifugation 1 minute à 8 000 tours par minute (6 000 g) à 25°C
- Etape réalisée en 2 fois, puisque le volume de 650µl est trop important pour être incorporé en une seule fois.
- Transfert de la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2µl (Collection tube dans le kit)
- Ajout de 500µl de tampon AW (précédemment dilué dans de l'éthanol)
- Centrifugation 1 minute à 8 000 tours par minute (6 000 g) à 25°C.
- Nouveau rinçage par 500µl de tampon AW
- Centrifugation 2 minutes à 14 000 tours par minute (20 000 g) à 25°C.
- Les colonnes sont placées sur des tubes eppendorf stériles de 1,5ml,
- Ajout de 50µl de tampon d'éluion AE au milieu de la colonne.
- Incubation 5 minutes à température ambiante
- Centrifugation 1 minute à 8 000 tours par minute (6 000 g) à 25°C.
- Nouvelle éluion identique à a précédente (50µl de tampon AE) pour maximiser la quantité d'ADN récupérée.

Annexe 10 : Conditions de PCR du test de vérification des extractions ADN

Couple d'amorce utilisé : trnS/trnG

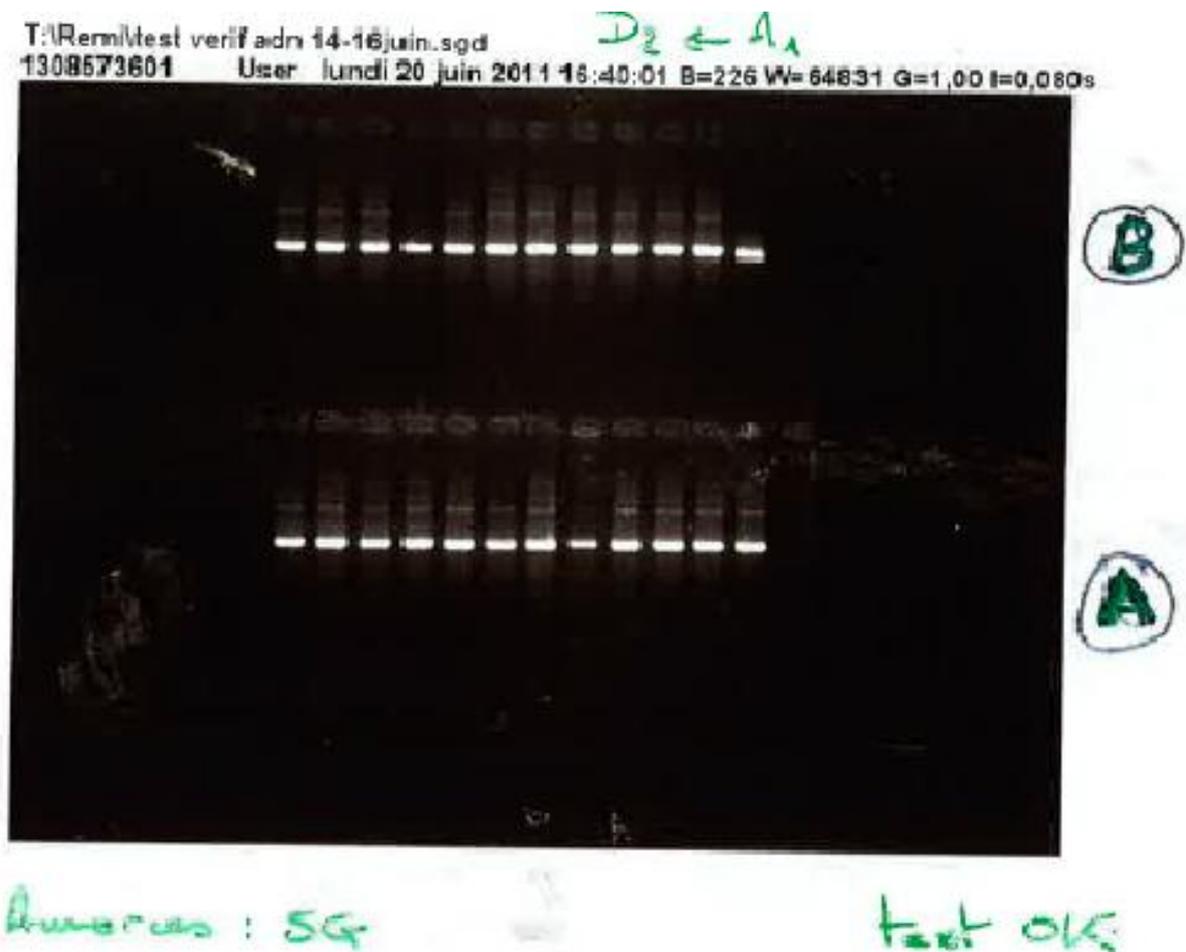
Kit : Multiplex Type it de QIAGEN

- Préparation mix/puits :

5 µL de master mix (dNTP et taq polymérase), 0,2 µL de chaque amorce, 2,6 µL d'eau et 1 µL d'ADN.

- Programme PCR : Une phase de dénaturation à 95°C pendant 5min, suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C (1min30), hybridation à 50°C (1min30) et élongation à 72°C (2min). Puis phase d'élongation à 72°C pendant 10 min.

Annexe 11 : Exemple de gel issu de l'électrophorèse des produits de l'extraction ADN et révélé aux UV



Annexe 12 : Liste des haplotypes recensés chez les 4 espèces de Sapotacées étudiées

S. majus :

N° Haplotype	N	NTCP3	PSBA3 411
1	1	202	258
2	11	202	261
3	1	202	262
4	1	206	251
5	1	206	253
6	3	207	260
7	11	207	261
8	1	207	263
9	2	208	259
10	7	208	260
11	29	208	261
12	8	208	262
13	16	208	263
14	1	209	259
15	37	209	262
16	1	209	263
17	1	210	251
18	1	210	255
19	2	210	261
20	17	210	262
21	3	210	263
22	1	210	264
23	2	214	262

M. balata :

N° Haplotype	N	CCMP3	NTCP3	PSBA3 123
1	1	110	206	216
2	1	112	201	216
3	1	113	205	216
4	13	114	205	207
5	17	114	205	216
6	2	114	206	207
7	3	114	206	216
8	2	115	202	216
9	8	115	204	207
10	24	115	205	207
11	12	115	205	216
12	12	115	206	207
13	25	115	206	216
14	2	115	207	216
15	4	116	204	207
16	4	116	206	207

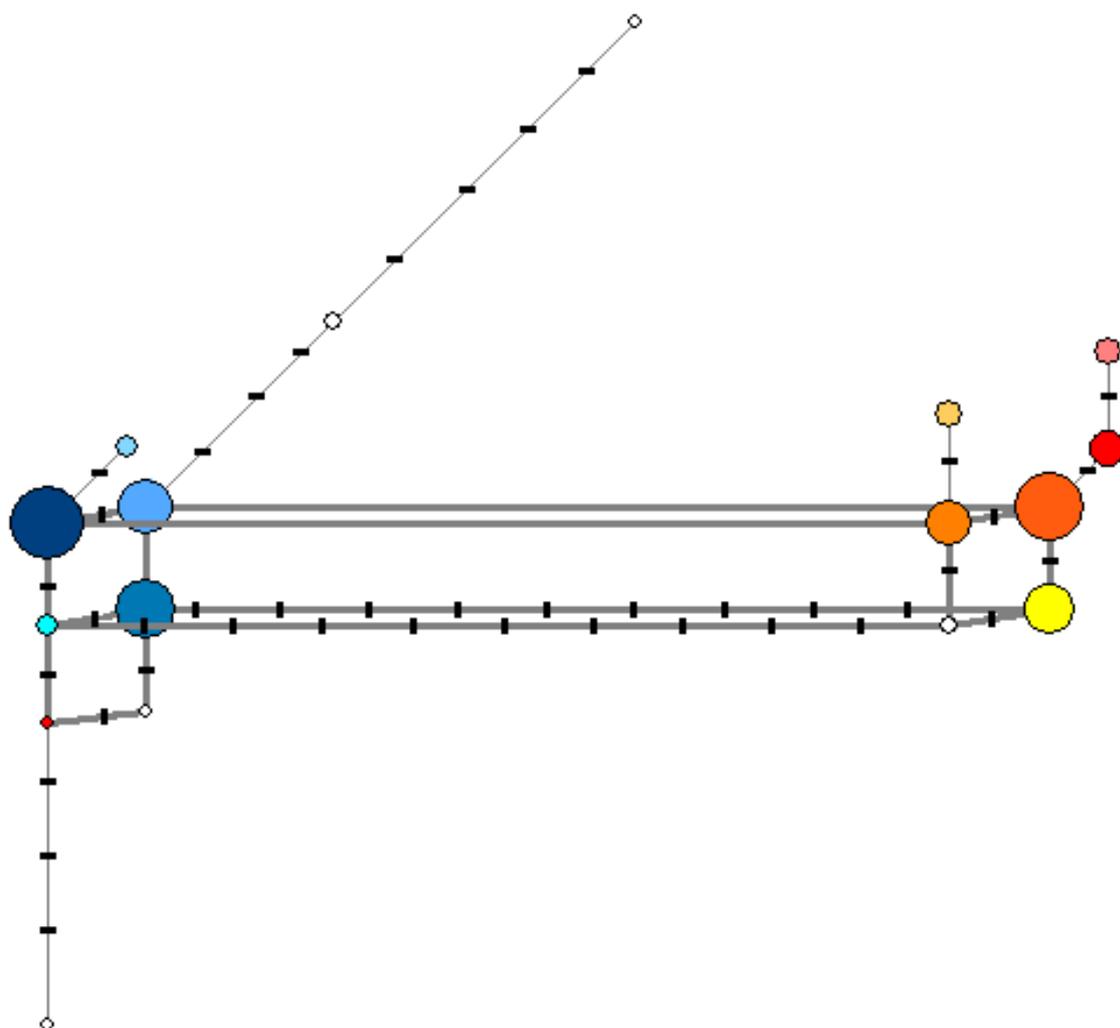
Labourdonnaisia calophylloides :

N° Haplotype	N	NTCP3	NTCP10	NTCP8
1	1	196	112	252
2	2	196	113	251
3	9	200	113	251
4	45	200	113	252
5	3	200	113	253
6	4	200	114	251
7	8	200	114	252
8	2	200	114	253
9	1	201	112	251
10	3	201	112	252
11	1	201	113	249
12	9	201	113	251
13	24	201	113	252
14	1	201	113	255
15	5	201	114	251
16	10	201	114	252
17	1	201	118	252
18	4	202	113	252
19	4	202	114	251
20	1	202	114	252
21	3	203	113	252
22	1	203	114	251
23	1	205	113	255

Sideroxylon borbonicum :

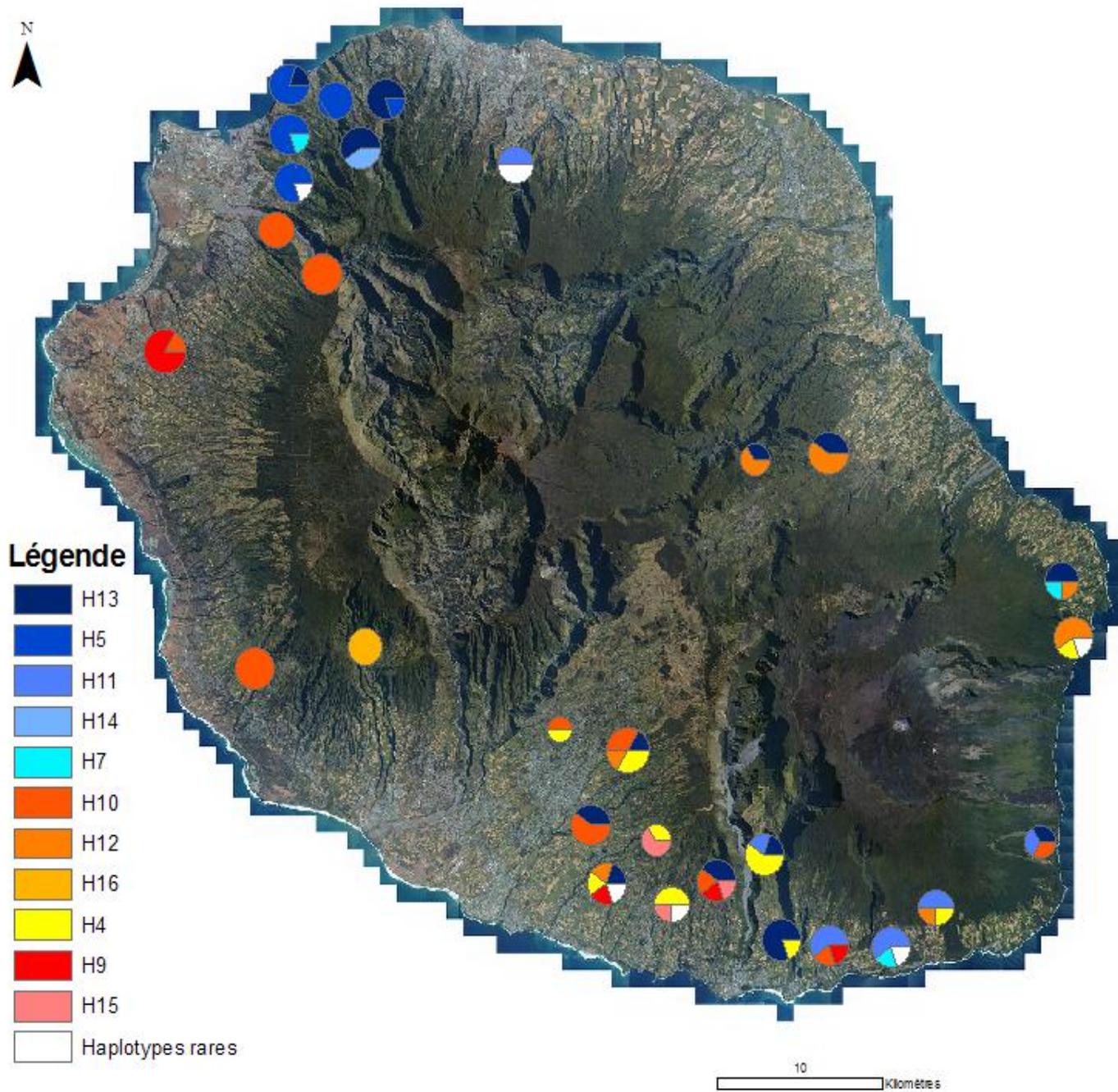
N° Haplotype	N	NTCP3	NTCP40	PSBA3 411	NTCP10
1	1	203	190	262	114
2	1	203	190	263	114
3	1	204	190	259	114
4	1	204	190	262	114
5	6	204	190	264	114
6	1	208	190	264	114
7	1	208	190	265	114
8	1	209	190	260	114
9	2	209	190	262	114
10	1	209	190	263	114
11	2	209	190	264	114
12	1	209	190	265	114
13	1	209	191	259	115
14	1	209	191	261	115
15	1	210	190	262	114
16	6	210	190	263	114
17	3	210	190	264	114
18	2	210	190	265	114
19	1	211	190	261	114
20	1	211	190	262	114
21	4	211	190	263	114
22	2	211	190	264	114
23	1	211	191	261	115
24	2	212	190	260	114
25	2	212	190	261	114
26	6	212	190	262	114
27	5	212	190	263	114
28	6	212	191	260	115
29	10	212	191	261	115
30	1	213	190	260	114
31	9	213	190	261	114
32	6	213	190	262	114
33	1	213	190	263	114
34	1	213	191	259	115
35	2	213	191	260	115
36	10	213	191	261	115
37	2	213	191	264	115
38	6	214	190	261	114

a) *M. balata*

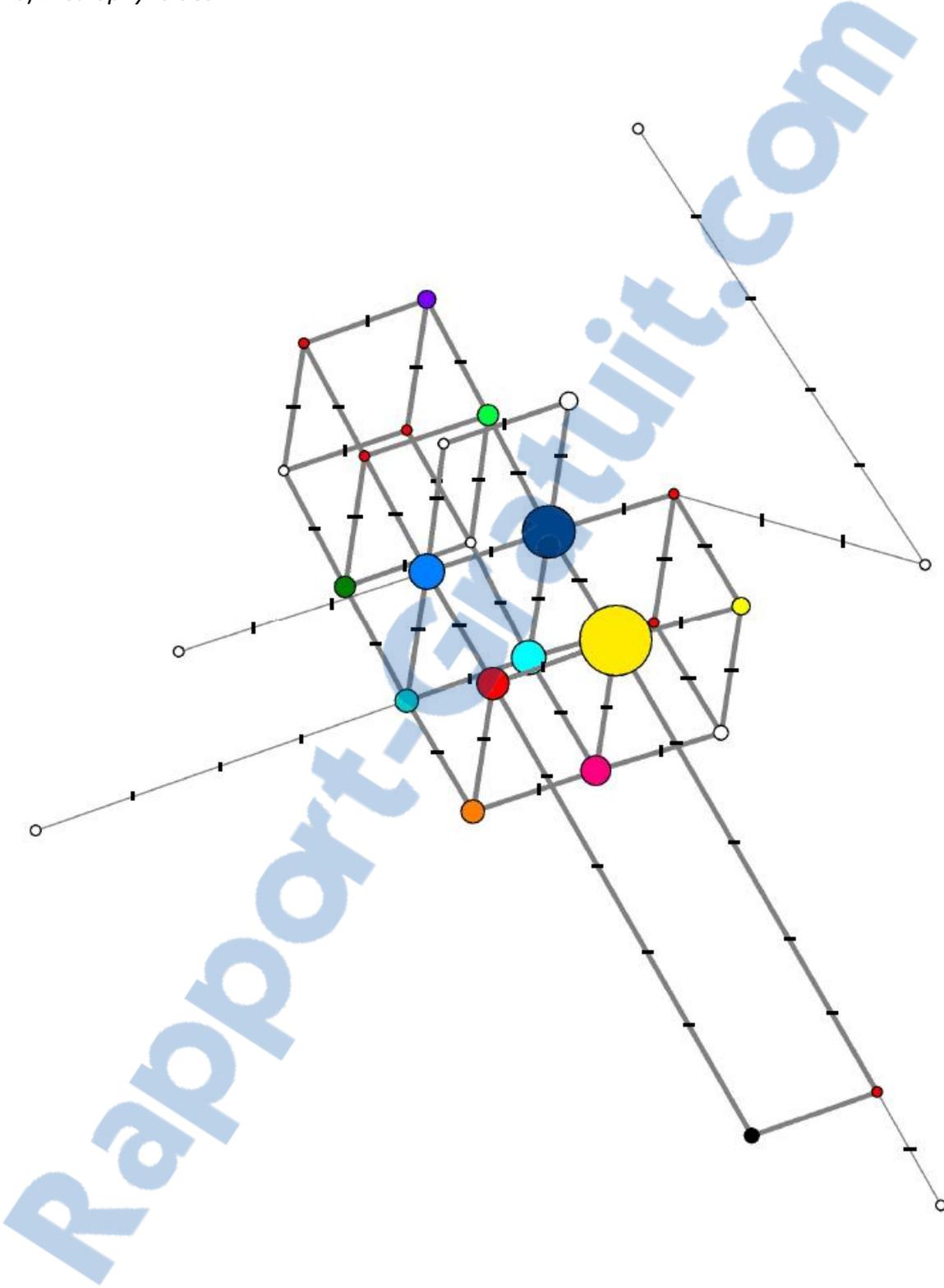


Annexe 13 : Cartes de répartition spatiale des haplotypes et réseau phylogénétique d'haplotypes associé pour a) *M. balata*, b) *Labourdonnaisia calophylloides* et c) *Sideroxylon borbonicum*

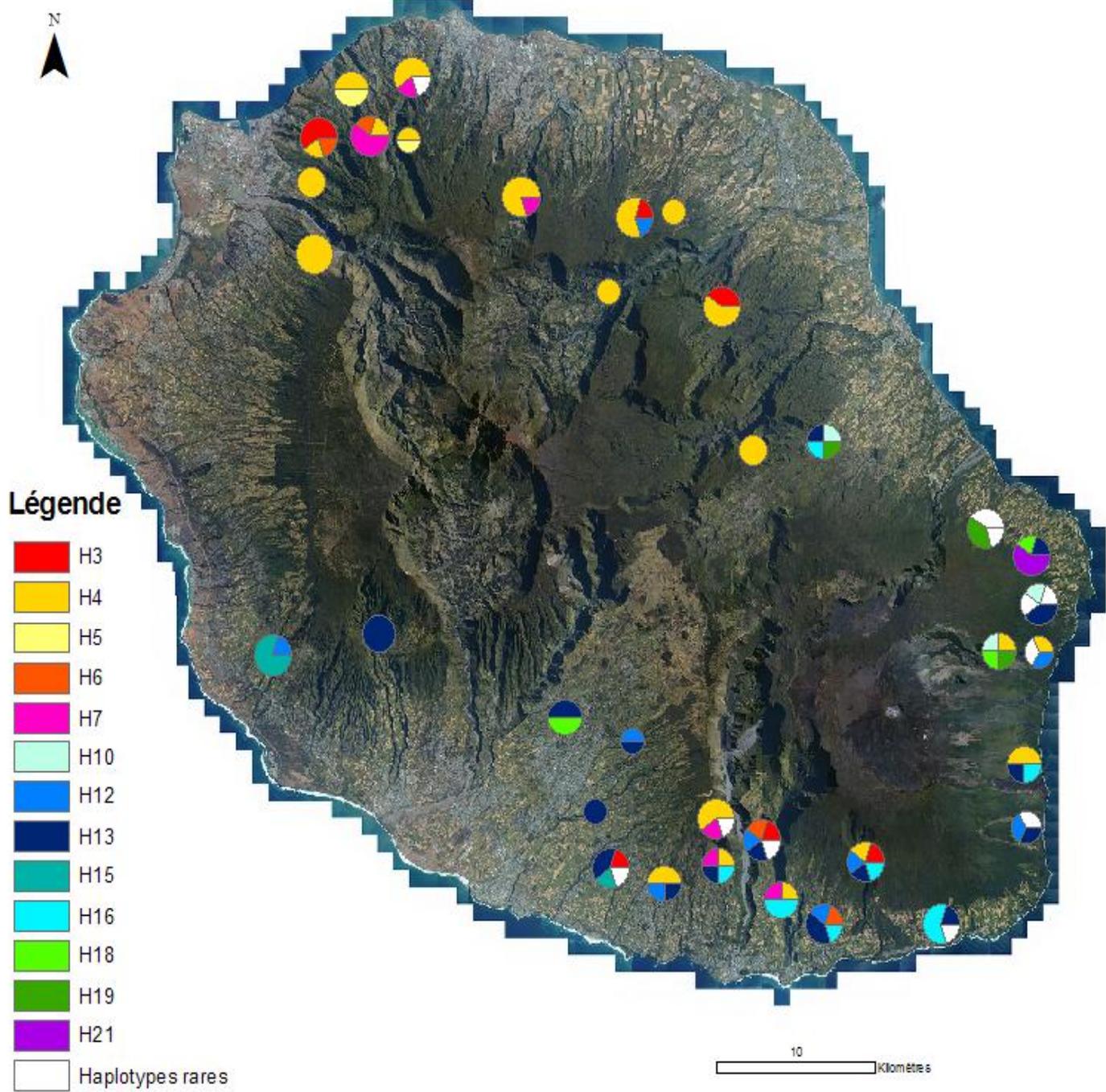
a) *M. balata*



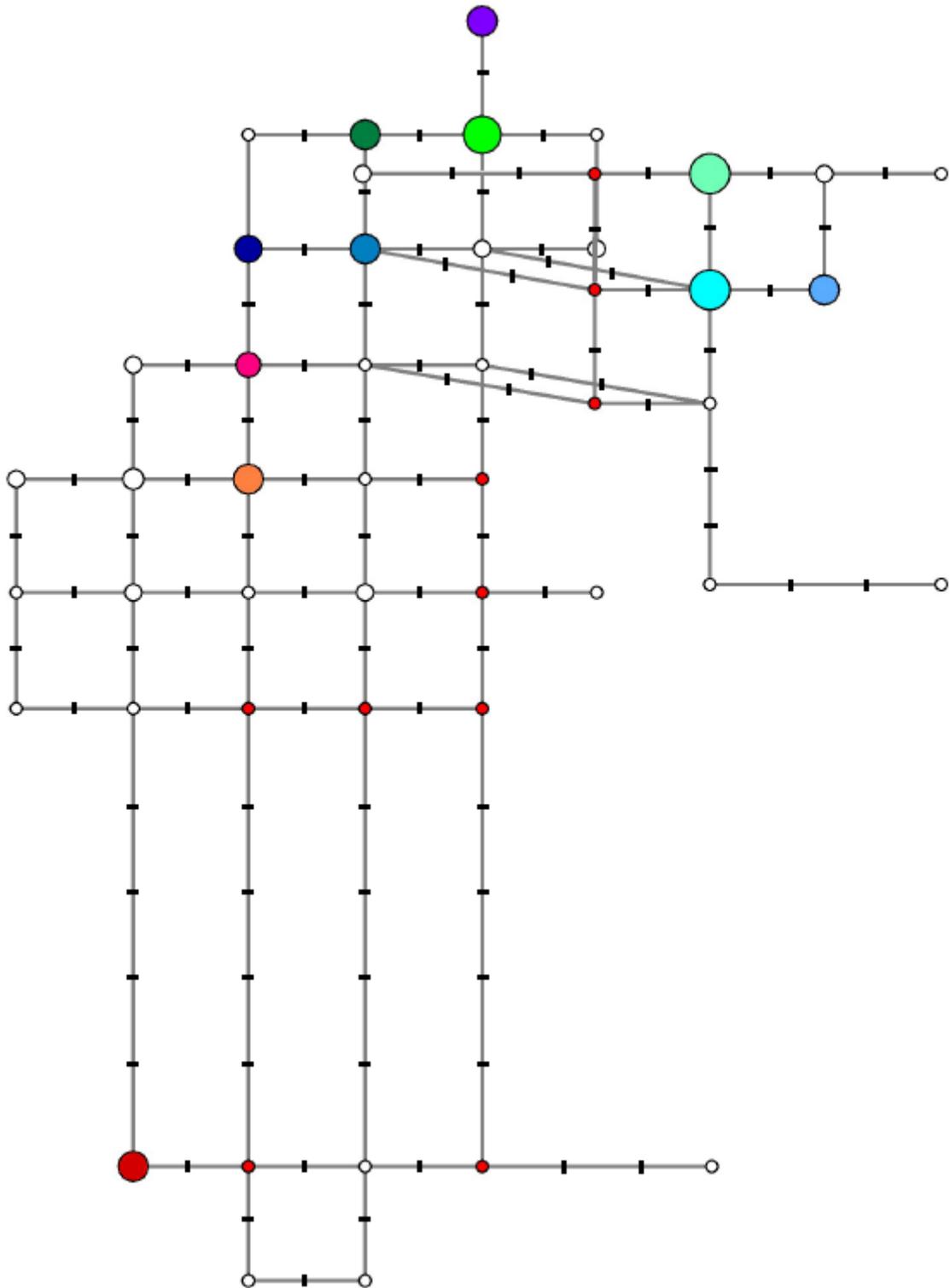
b) *L. calophylloides*



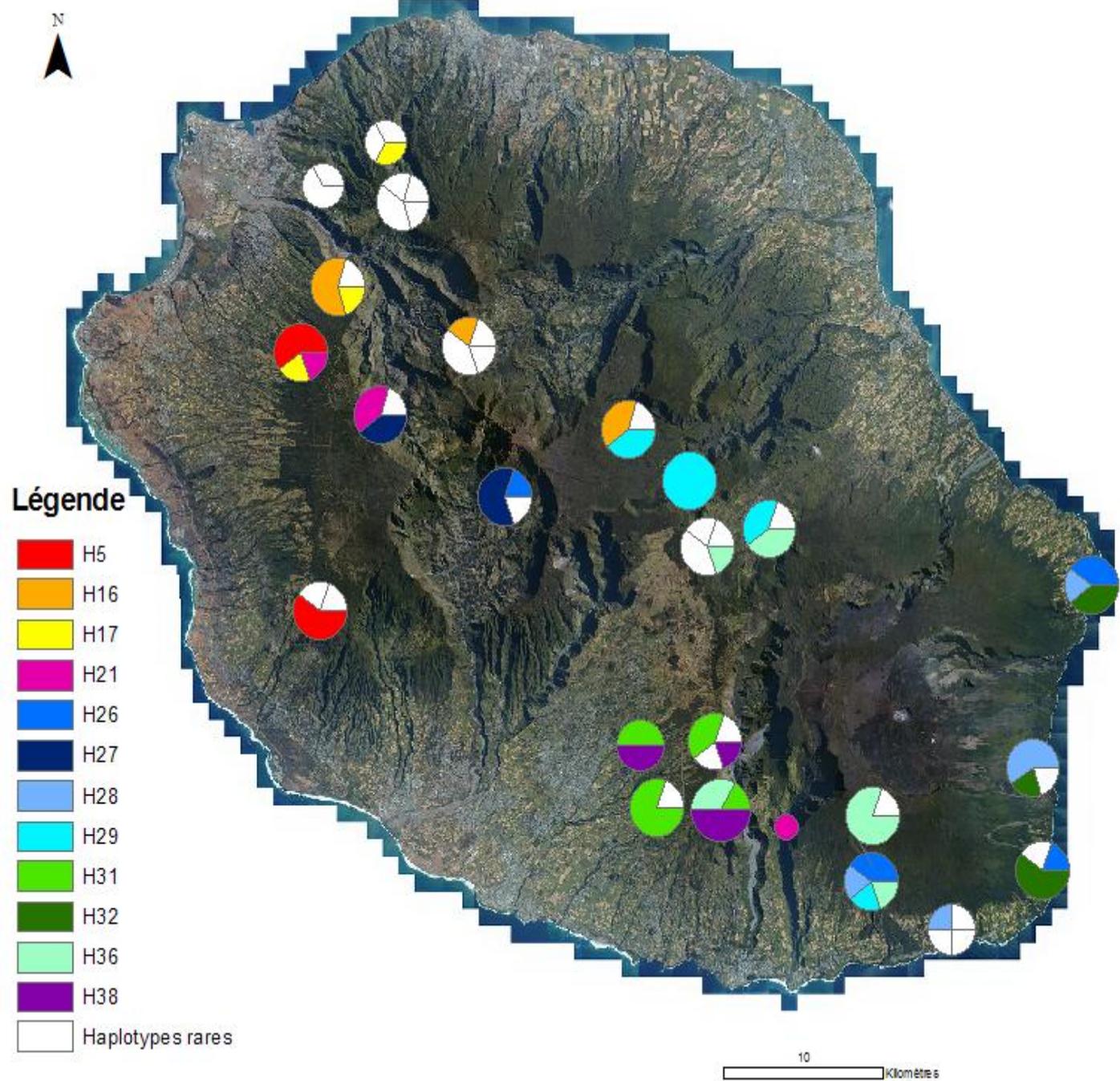
b) *L. calophylloides*



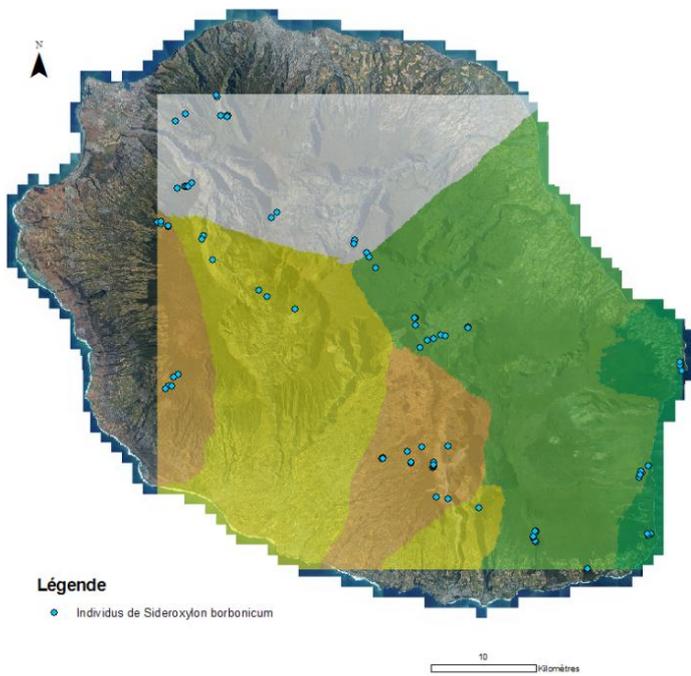
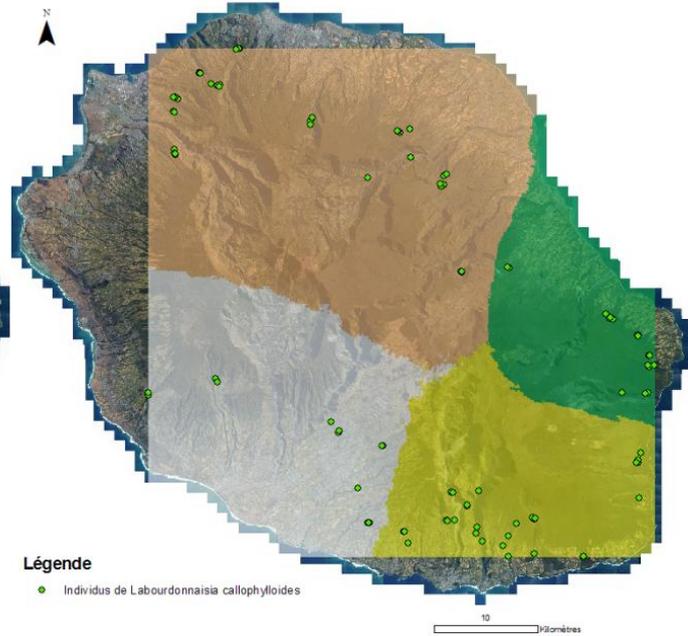
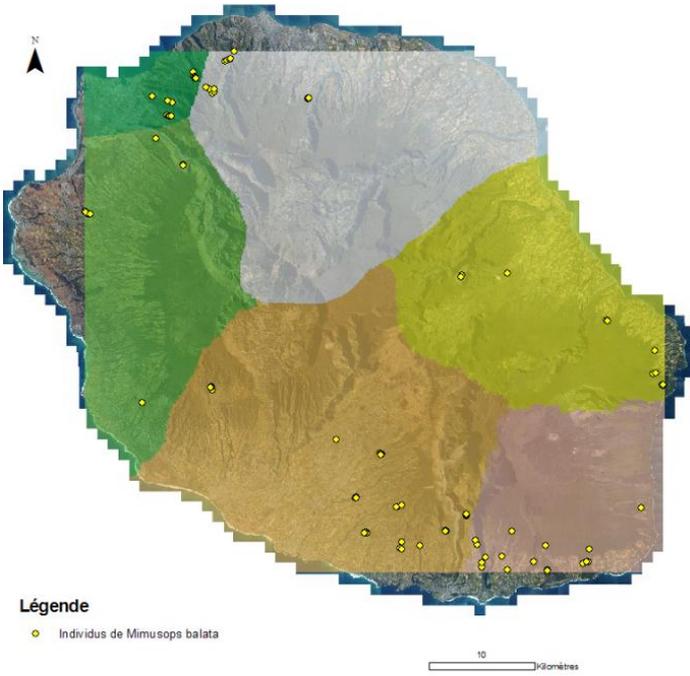
c) *S. borbonicum*



c) *S. borbonicum*



Annexe 14 : Cartes de répartition spatiale des populations détectées par Geneland pour a) *M. balata*, b) *L. calophylloides* et c) *S. borbonicum*



GLOSSAIRE ET ABREVIATIONS

Acuminé (limbe) = Limbe terminé par un acumen i.e. se rétrécit progressivement en pointe étroite.

Allèle = Désigne l'une des variantes possibles d'un gène à un locus donné. Cet allèle présente une séquence de nucléotides particulière, différente de celles des autres allèles du même gène.

Canopée = Strate supérieure de quelques mètres d'épaisseur où se trouve plus de 80 % du feuillage des arbres. C'est là que la majorité de l'énergie solaire est captée (plus de 95 %) et que 30 % des précipitations sont absorbées par le feuillage. On y trouve également une faune abondante et complexe.

Cambium = Méristème secondaire marquant la limite entre le bois et l'écorce.

Dispersion = mouvement effectué par un individu entre son site de naissance et le site où il se reproduit.

Dérive génétique = Modification pour une population donnée des fréquences génotypiques et alléliques d'une génération à une autre par suite de processus aléatoires. Des allèles sélectivement neutres peuvent ainsi se répandre et se fixer dans une population.

Effet de lisière = La lisière correspond à la zone de transition entre deux ou plusieurs biocénoses (forêt et prairie par exemple) et présente des conditions climatique et écologique particulière. On parle d'effet de lisière pour décrire les impacts négatifs des lisières artificielles créées dans les milieux naturels, par exemple par la fragmentation du paysage.

Effet RUN = Décalage observé dans l'attribution de la taille des fragments microsatellites par le génotypeur lors de 2 runs différents pour des mêmes échantillons.

Electrophorèse sur gel = Processus dans lequel des molécules (protéines, fragments d'ADN..) migrent sur un gel d'agarose et sont séparées en fonction de leur taille en appliquant un champ électrique.

Espèces exotiques /indigènes/ endémiques = On dit qu'une espèce est indigène lorsqu'elle est arrivée sur l'île par des moyens naturels et qu'elle était présente avant l'arrivée de l'Homme.

A l'inverse, les espèces exotiques ont été introduites, volontairement ou non, par l'homme. Parmi les espèces indigènes, certaines se sont progressivement différenciées pour créer des espèces nouvelles, dites endémiques, et qui n'existent nulle part ailleurs dans le monde.

Flux de gènes = Echange de plusieurs gènes ou de leurs allèles entre différentes populations en général apparentées. Ce flux contribue au brassage génétique et tend à homogénéiser la structure des populations.

Forêt primaire = Forêt n'a jamais été modifiée par l'Homme et dont les processus biologiques et écologiques sont intacts. Leur destruction est irréversible. A l'inverse, les forêts secondaires se sont installées, spontanément ou non, après une action de l'Homme. Leur biodiversité est généralement plus faible que celle des forêts primaires.

Fragmentation = Consiste en la réduction de la superficie d'un habitat et sa séparation en plusieurs fragments éloignés les uns des autres (Burel and Baudry, 2000).

Génotypage = Technique consistant à déterminer la taille en paire de bases d'un fragment d'ADN donné. Cette technique coûte moins cher que le séquençage de l'ADN.

Génotype = Ensemble de deux allèles que possède un individu diploïde en un locus donné (ex : si au locus considéré, le pool génétique de la population comporte deux allèles A et a, les trois génotypes possibles sont : AA, Aa et aa).

Haplotype = Désigne une combinaison précise d'allèles de plusieurs locus

Hot spot de biodiversité = Site concentrant un fort taux d'endémisme mais dont la biodiversité est très menacée. Pour être qualifiée de hotspot, une région doit répondre à deux critères :

- 1500 espèces endémiques recensées soit plus de 5% des espèces présentes sur la Terre.
- perte de 70% de l'habitat d'origine. (source : www.conservation-nature.fr)

Marqueurs moléculaires = Fragments d'ADN qui servent de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre.

Marqueur de taille = molécule de taille connue servant de référence pour déterminer la taille des molécules à tester.

PCR (Polymerase Chain Reaction) = Technique de réplication de l'ADN ciblée in vitro. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur est d'un million de copies en quelques heures.

Phénétique = La phénétique repose sur le postulat de base que le degré de ressemblance est corrélé au degré de parenté. Elle a pour but de quantifier la ressemblance entre les êtres vivants à classer.

Phénologie = Variation de la période et de la durée de floraison ou de feuillaison d'un végétal en relation avec le climat.

Polymorphisme = Présence dans une population d'au moins deux allèles d'un locus génétique explorable par analyse de l'ADN ou du produit protéique.

Population = Ensemble des individus d'une même espèce qui occupe simultanément le même milieu.

Rapport-Gratuit.com

Séquençage = Technique consistant à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

Structuration génétique = Organisation de la diversité génétique d'une population donnée en plusieurs sous population.

Abréviations :

ADN = Acide DésoxyriboNucléique

ADNcp = ADN chloroplastique

ADNmt = ADN mitochondrial

ADNnc = ADN nucléaire

PCR = Polymerase Chain Reaction

CBNM = Centre Botanique National des Mascariens.

BRGM = Bureau de recherches géologiques et minières

CIRAD = Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique