

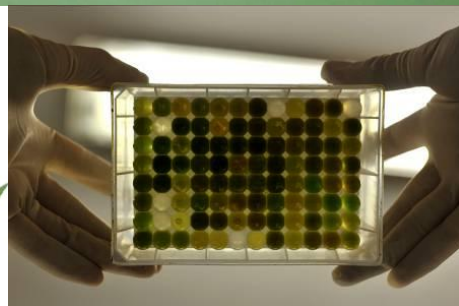
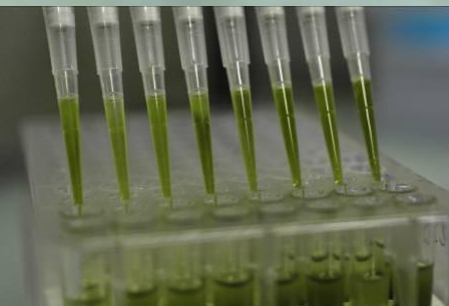


Conservatoire Botanique National
Sud-Atlantique

PLAN DE CONSERVATION DES BERGES A ANGELIQUE DES ESTUAIRES

Apport préliminaire de la génétique :
un complexe d'espèces du genre *Angelica*
sur la façade atlantique










2012





Dans le cadre du plan de conservation des berges à angélique des estuaires, sept études menées sur différentes thématiques, ont permis d'établir l'état des lieux des connaissances sur l'angélique et ses habitats et des outils opérationnels pour les gestionnaires des berges ont été produits.

Les rapports produits par le CBNSA dans le cadre de ce programme inter-régional sont les suivants :

-  **Plan de conservation des berges à angélique des estuaires**
-  Etat des lieux des acteurs des berges et perception du patrimoine naturel des berges
-  Angélique des estuaires et cortège floristique des berges du bassin Adour-Garonne
-  Etude comparative des semences d'angéliques : biométrie, germination et flottaison
-  Apport préliminaire de la génétique : un complexe d'espèces du genre *Angelica* sur la façade atlantique
-  Mégaphorbiaies oligohalines à angélique des estuaires, et autres habitats des berges du bassin Adour-Garonne
-  La cartographie, outil au service de l'évaluation de l'état de conservation des berges et de la fonctionnalité du corridor écologique : proposition d'une méthodologie et expérimentation sur la partie aval de la Garonne
-  Technique mixte de restauration expérimentale de berges et restructuration naturelle de la végétation : Condat, site pilote sur la Dordogne
-  Outils méthodologiques et opérationnels pour les gestionnaires des berges

Ce rapport est :

Apport préliminaire de la génétique : un complexe d'espèces du genre *Angelica* sur la façade atlantique





Prospections de terrain :

**Anaïs PAGES, Emeline AUPY, Julien GIVORD,
Frédéric JEANDENAND, Frédéric FY, Sandrine LORiot,
Nicolas SIMLER, Hervé CASTAGNÉ, Alexandre QUENNESON**

Saisie des données :

Nicolas SIMLER, Alexandre QUENNESON

Rédaction :

**Hervé CASTAGNÉ, Emmanuelle REVARDEL, Alexandre QUENNESON,
Nicolas SIMLER**

Crédit Photographique :

Un numéro a été associé à chaque auteur
des photographies qui illustrent ce document :

**Alexandre QUENNESON : 1, Nicolas SIMLER : 2,
Sandrine LORiot : 3, Hervé CASTAGNÉ : 5**

Le numéro de l'auteur de la photographie est mentionné sur chacune d'entre elles

Relecture :

Laurence PERRET, Coralie PRADEL

Remerciements :

**Emmanuelle REVARDEL, Anne-Laure BOUILLOT,
Guillaume LALANNE-TISNÉ, Sophie GERBER, Henri CARON, Patrick LÉGER**



Référence à utiliser pour toute citation de l'étude

CASTAGNÉ H., REVARDEL E., QUENNESON A., 2012. – Apport préliminaire de la génétique : un complexe d'espèces du genre *Angelica* sur la façade atlantique. Conservatoire botanique national Sud-Atlantique, 44 p.

Conservatoire Botanique National Sud-Atlantique

Domaine de Certes
47 avenue de Certes
33980 AUDENGE
Tél. : 05 57 76 18 07

Site internet CBNSA : www.cbnsa.fr
Site internet angélique : www.angeliquedesestuaires.fr
Courriel : cbsa.info@laposte.net



Sommaire

| | |
|---|----|
| 1. Contexte et objectif de l'étude | 6 |
| 2. Présentation succincte des espèces | 6 |
| 3. Matériel et méthodes..... | 8 |
| 3.1. Matériel végétal | 8 |
| 3.2. Analyse génétique | 10 |
| 3.2.1 Marqueurs microsatellites nucléaires | 10 |
| 3.2.2. Marqueurs chloroplastiques..... | 10 |
| 3.2.3. Analyses statistiques..... | 11 |
| 4. Résultats et analyse | 11 |
| 4.1. Marqueurs microsatellites nucléaires..... | 11 |
| 4.2. Marqueurs microsatellites chloroplastiques et génotypage | 14 |
| 5. Conclusions et perspectives..... | 14 |
| Bibliographie | 15 |
| Annexes | 16 |



1. Contexte et objectif de l'étude

L'angélique des estuaires (*Angelica heterocarpa*) est une espèce patrimoniale et protégée, endémique des estuaires et des rivières tidales associées du sud-ouest de la France, inféodée aux berges soumises à marées dynamiques d'eau douce à faiblement salée. L'aire de répartition de l'angélique des estuaires comprend, du nord au sud, le bassin de la Loire et le bassin Adour-Garonne.

Sur l'inter-région Aquitaine Poitou-Charentes, elle cohabite parfois avec l'angélique sauvage, une espèce commune appelée aussi angélique des bois (*Angelica sylvestris* subsp. *sylvestris*). L'identification des deux taxons, très proches morphologiquement, peut s'avérer délicate car certains individus possèdent des caractères morphologiques intermédiaires entre ces deux espèces, ce qui pourrait laisser supposer l'existence d'hybridations ou d'introgressions. Dans la région de l'Adour, l'hétérogénéité morphologique étant plus marquée, les botanistes s'accordent à souligner le caractère atypique de ces populations et des hybridations avec d'autres angéliques, plus montagnardes, sont suspectées : *A. razulii* et *A. sylvestris* subsp. *bernardae*.

Au regard de ces éléments, deux grands types de questions se posent :

- les questions en relation avec la taxonomie : quelles différences génétiques entre les taxons et quel statut taxonomique pour les individus à morphologies intermédiaires ?

- les questions de la structuration spatiale des populations : les populations sont-elles génétiquement homogènes ou différenciées sur l'aire de répartition, sur les différents bassins versants et d'amont en aval ? Quel est le niveau d'échanges entre populations et de fait la sensibilité à la fragmentation des populations ?

Dans ce contexte, une étude génétique du complexe des 4 espèces sus-citées du genre *Angelica* a été réalisée sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'angélique des estuaires du bassin Adour-Garonne.

Ces connaissances devraient être des guides

- pour l'identification taxonomique des deux espèces et des hybrides et notamment pour des questions réglementaires ;

- évaluer les enjeux et les stratégies de conservation de l'angélique des estuaires à l'échelle de l'inter-région Aquitaine Poitou-Charentes.

L'étude génétique a été confiée à l'unité mixte de recherche BIOGECO (Biodiversités, Gènes et Communautés), émanant d'un partenariat entre l'université Bordeaux 1 et l'INRA. Le CBNSA est intervenu dans le cadre de l'échantillonnage et pour participer au groupe de travail spécialement constitué.

En ce qui concerne l'étude génétique des espèces végétales endémiques rares et menacées d'extinction, parmi les marqueurs disponibles, les marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques ont largement montré leur intérêt. Ce sont ces derniers qui ont été retenus et utilisés dans la présente étude.

2. Présentation succincte des espèces

➤ *Angelica heterocarpa*

Répartition : euatlantique sublittorale endémique du territoire français (présente sur les estuaires de la Loire, Charente, Gironde, Adour et Nivelle).

Ecologie : berges vaseuses soumises à marée d'eau douce à faiblement salée et préférentiellement ensoleillées.



➤ ***Angelica sylvestris* subsp. *sylvestris***

Répartition : eurasiatique, elle s'étend de l'ouest de l'Europe jusqu'en Asie centrale.

Ecologie : plante de mi-ombre qui peut se trouver en pleine lumière et sur sol humide (bois frais et humides, bord des cours d'eau, marécages...).



➤ ***Angelica sylvestris* subsp. *bernardae***

Répartition : espèce montagnarde présente dans la plupart des moyennes et hautes montagnes d'Europe.

Ecologie : milieux plus froids que la sous espèce *sylvestris*, vallées encaissées, humides et ombragées.



➤ ***Angelica razulii***

Répartition : espèce endémique de la chaîne pyrénéenne.

Ecologie : plante de montagne qui se retrouve aux étages montagnard et subalpin. Espèce de pleine lumière ou de mi-ombre sur sols à humidité moyenne et constante.



3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel végétal

L'échantillonnage a été réalisé par le CBNSA en 2009 et 2010 et peut se décomposer en 2 phases avec :

- une première phase destinée à constituer une banque inter-régionale de gènes composée d'échantillons typés *Angelica heterocarpa*, *Angelica sylvestris* subsp. *sylvestris* et intermédiaires récoltés sur les berges de l'ensemble des cours d'eau de l'aire de répartition de l'angélique des estuaires (entre les limites amont et aval) ;

Plusieurs niveaux de structuration possibles des populations d'angélique ont été pris en compte pour élaborer le plan d'échantillonnage (cf. annexe 1). Les échantillons ont ainsi été collectés sur des pieds d'angélique présents à différents niveaux topographiques sur des linéaires de berge de 250 mètres (assimilé à une station dans notre étude) et sélectionnés au « hasard », c'est-à-dire indépendamment de leur identité taxonomique, qui a été notée *a posteriori*. Les individus collectés au sein de chaque station ne devaient pas être trop proches les uns des autres sauf dans le cas d'une forte hétérogénéité morphologique et leur nombre était fonction de la densité.

| Départements | Cours d'eau | Nombre d'échantillons récoltés |
|--------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Charente-Maritime | Charente | 50 |
| | Boutonne | 1 |
| | Seudre | 29 |
| Gironde | Gironde | 100 |
| | Garonne | 158 |
| | Dordogne | 158 |
| | Leyre | 5 |
| Pyrénées-Atlantiques et Landes | Adour | 149 |
| | Nive | 30 |
| | Nivelle | 30 |
| TOTAL | | 710 |

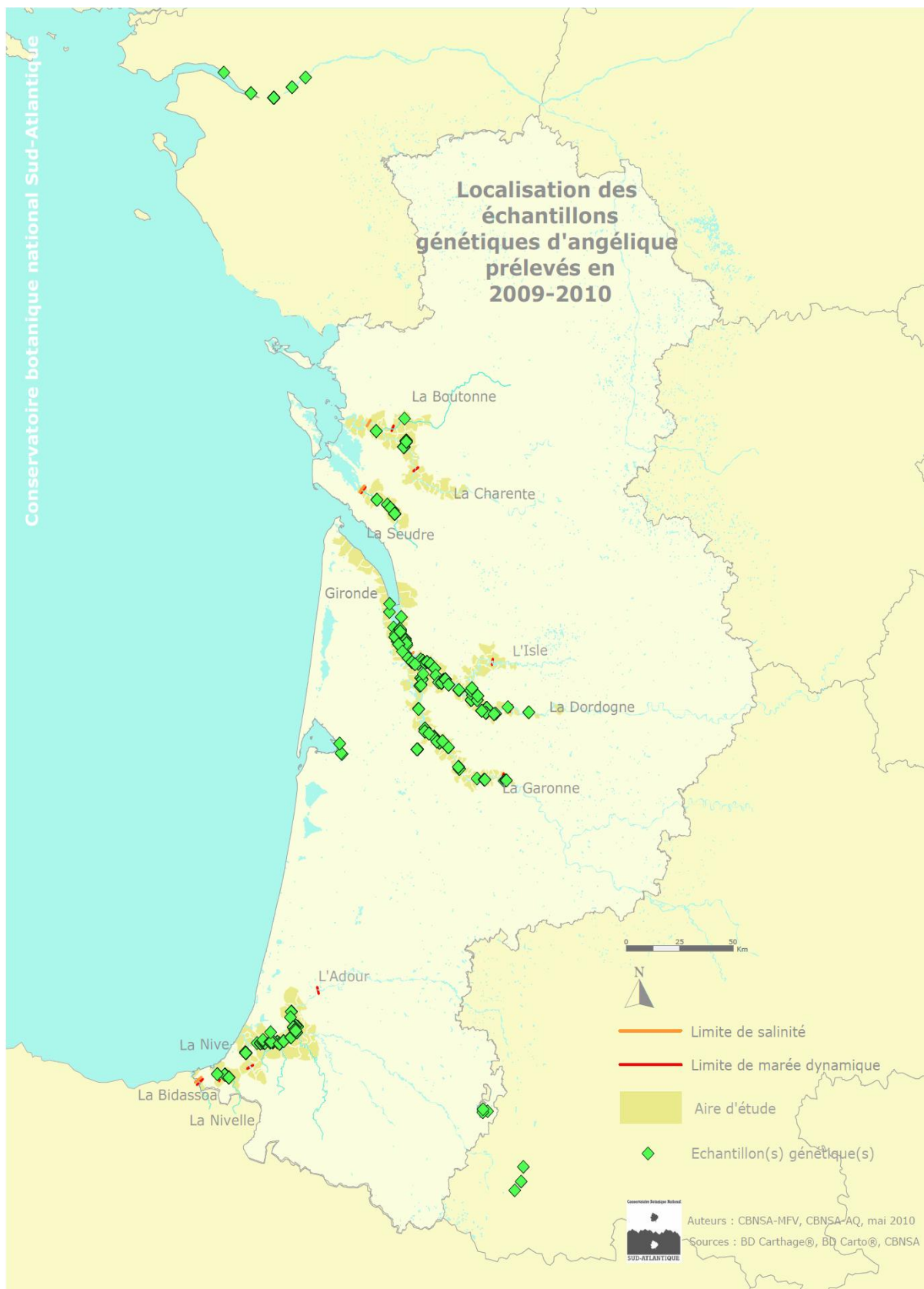
- une deuxième phase destinée initialement à constituer les « références » de taxonomie avec des échantillons collectés sur un nombre réduit de populations de référence typées :
 - *A. sylvestris* subsp. *sylvestris*, *A. sylvestris* subsp. *bernardae* et *A. razulii*, hors contexte rivulaire soumis à marée ;
 - *A. heterocarpa* sur le bassin de la Loire, secteur où il n'existe pas d'ambiguïté morphologique.

| Taxons | Départements | Précision géographique | Nombre d'échantillons | TOTAL |
|---|---------------------|------------------------|-----------------------|-------|
| <i>Angelica heterocarpa</i> | Loire-Atlantique | La-Chapelle-Basse-Mer | 2 | 43 |
| | | Sainte-Luce-sur-Loire | 3 | |
| | | Rezé | 23 | |
| | | Nantes | 9 | |
| | | Couëron | 5 | |
| | | Bouée | 1 | |
| <i>Angelica sylvestris</i> subsp. <i>sylvestris</i> | Gironde | La Brède | 29 | 46 |
| | | Lados | 17 | |
| <i>Angelica sylvestris</i> subsp. <i>bernardae</i> | Pyrénées-Orientales | Luquet | 14 | 30 |
| | | Gardères | 16 | |
| <i>Angelica razulii</i> | Pyrénées-Orientales | Barèges | 1 | 50 |
| | | Bagnères-de-Bigorre | 45 | |
| | | Beaudéan | 4 | |



Un protocole de collecte qui précise les différentes étapes et détaille les modalités techniques et pratiques relatives a été produit (cf. annexe 2). Une fiche « récolte » ainsi qu'une fiche « linéaire de berge » ont également et spécifiquement été élaborées pour la collecte des échantillons (cf. annexe 3).

Carte générale de localisation des tous les échantillons prélevés sur le terrain et analysés pour les marqueurs microsatellites nucléaires



3.2. Analyse génétique

Le travail s'est organisé en plusieurs étapes :

| Etapes | Date de réalisation |
|---|---------------------|
| Mise au point de marqueurs microsatellites nucléaires | 2009-2011 |
| Extraction d'ADN | 2009-2010 |
| Génotypage des individus (marqueurs nucléaires et chloroplastiques) | 2011 |
| Analyse des données | Fin 2011-2012 |

Les éléments présentés dans les parties qui suivent sont issus des rapports intermédiaires faisant état de l'avancement des travaux et produits par les généticiens en charge de la réalisation de l'étude. Ces rapports sont présentés en intégralité en annexe 4.

3.2.1 Marqueurs microsatellites nucléaires

La mise au point de marqueurs microsatellites nucléaires était un préalable nécessaire pour réaliser l'étude génétique dans la mesure où il n'existait pas de marqueurs microsatellites connus et publiés dans le genre *Angelica*.

Cette étape a débuté en 2009. Nous recherchions des marqueurs qui amplifient l'ADN d'*A. heterocarpa* et *A. sylvestris* subsp. *sylvestris* et qui présentent un polymorphisme. La combinaison des marqueurs en multiplexe (de 8 à 10) permet de réaliser le minimum d'étapes de biologie moléculaire et une seule lecture au niveau du génotypage (économie de temps et d'argent). Les phases de la mise au point sont :

- obtention de clones de fragments d'ADN génomique portant des motifs microsatellites ;
- test de polymorphisme de nombre de répétitions par amplification PCR¹ ;
- multiplexage des amorces.
- génotypage

Deux types de clonage ont été réalisés. Un premier, classique, d'enrichissement de séquences microsatellites et clonage dans des bactéries a abouti à un nombre trop restreint de marqueurs utilisables. Nous avons donc ensuite fait appel à une technique de séquençage à grande échelle (séquençage 454) par une entreprise spécialisée (Genoscreen) (Guichoux et al., 2011).

A partir de ce matériel, sur une centaine de couples d'amorces testées, une quarantaine de marqueurs qui amplifiaient l'ADN, d'*A. heterocarpa* et *A. sylvestris* subsp. *sylvestris* puis une vingtaine qui présentait un polymorphisme ont été retenus. Ensuite, 16 marqueurs présentant un profil de bonne qualité ont été utilisés en deux multiplexes pour le génotypage des individus.

Le génotypage a été effectué sur l'ADN extrait de l'ensemble des échantillons collectés. A l'issue de la lecture des génotypes, sur les 16 marqueurs utilisés, 8 seront exploitables pour l'analyse génétique :

- S216 issus du premier clonage ;
- An11, An23, An35, An39, An68, An69, An91 obtenus à la suite du séquençage 454.

3.2.2. Marqueurs chloroplastiques

Les marqueurs microsatellites chloroplastiques sont quant à eux relativement « universels » et peuvent souvent être utilisés sur plusieurs espèces. De tels marqueurs ont été utilisés dans le cadre de l'étude et leur développement n'a pas nécessité de mise au point. Cette méthode peut apporter des informations complémentaires sur la relation entre espèces, notamment sur d'éventuelles introgressions. 12 marqueurs ont été testés sur *Angelica heterocarpa* et *A. sylvestris* subsp. *sylvestris*. Sur les 12 couples d'amorces testés, 6 ont donné un signal et ont été utilisés pour le génotypage : ccmp2, ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp10 et J (Weising et al. 1999 et Caron H, communication personnelle).

¹ PCR : Réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais *polymerase chain reaction*), méthode de biologie moléculaire d'amplification d'ADN *in vitro* (concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne).



3.2.3. Analyses statistiques

Plusieurs types d'analyses statistiques peuvent être utilisés pour exploiter les données disponibles :

- si on choisit de définir des groupes *a priori* (par exemple les populations des bassins versant ou les taxons) : approche F-Statistique (logiciel ARLEQUIN, Excoffier et al. 2005) ;
- si on cherche des unités génétiquement indépendantes sans *a priori* : approche bayésienne (logiciel STRUCTURE, Pritchard et al, 2000) ;

C'est ce type d'analyse qui a été choisi, en cohérence avec l'échantillonnage effectué au « hasard » et sans *a priori*.

- si on teste et décrit une structure génétique continue : autocorrélation spatiale.

4. Résultats et analyse

Les données sont actuellement acquises et les analyses sont en cours. Les résultats sont encore très préliminaires et seuls quelques éléments de conclusion sont présentés dans le rapport. Les résultats seront complétés au fur et à mesure de l'avancée des analyses qui doivent se poursuivre dans le courant de l'année 2012.

4.1. Marqueurs microsatellites nucléaires

L'analyse des données de géotypage pour les marqueurs microsatellites nucléaires porte sur l'ensemble des individus pour lesquels un géotype a été obtenu (790 sur 890 échantillonnés). Seuls les individus ayant un géotype complet ou une seule donnée manquante sur les huit marqueurs ont été pris en compte. La diversité génétique sur l'ensemble des huit marqueurs et sur l'ensemble des individus est assez élevée (nombre moyen d'allèles par locus = 22,85). La répartition des individus géotypés en fonction de leur origine ou groupe taxonomique est récapitulée dans le tableau ci-dessous.

| Localisation | <i>Angelica cf. heterocarpa</i> | <i>Angelica cf. sylvestris</i> subsp. <i>sylvestris</i> | <i>Angelica heterocarpa</i> | <i>Angelica sylvestris</i> subsp. <i>sylvestris</i> | <i>Angelica razulii</i> | <i>Angelica sylvestris</i> subsp. <i>bernardae</i> |
|---------------|---------------------------------|---|-----------------------------|---|-------------------------|--|
| Garonne | 28 | 34 | 91 | 44 | | |
| Dordogne | 60 | 39 | 54 | | | |
| Gironde | 6 | 29 | 45 | 13 | | |
| Loire | | | 36 | | | |
| Charente | 32 | 10 | 7 | | | |
| Seudre | 1 | 28 | | | | |
| Adour et Nive | 37 | 94 | 19 | 60 | | |
| Pyrénées | | 6 | | | 15 | 12 |
| TOTAL | 154 | 240 | 252 | 117 | 15 | 12 |

Nombre d'individus dont le géotype pour les 8 microsatellites nucléaires a été déterminé, en fonction du bassin versant et du taxon attribué lors de l'échantillonnage sur le terrain

Une analyse bayésienne, appropriée pour l'étude d'espèces sympatriques suspectées de s'hybrider dans la nature, a été effectuée (logiciel STRUCTURE, Pritchard et al, 2000). Cette méthode permet de grouper les individus d'un échantillon au sein de populations génétiquement homogènes sur la base de leur géotype et des fréquences alléliques et d'identifier d'éventuels hybrides. Elle est utilisée sans *a priori*, c'est-à-dire sans utiliser d'indications sur l'origine géographique des individus ni sur leur identification taxonomique. Le nombre de groupes choisi dans le modèle est donné par la valeur K.

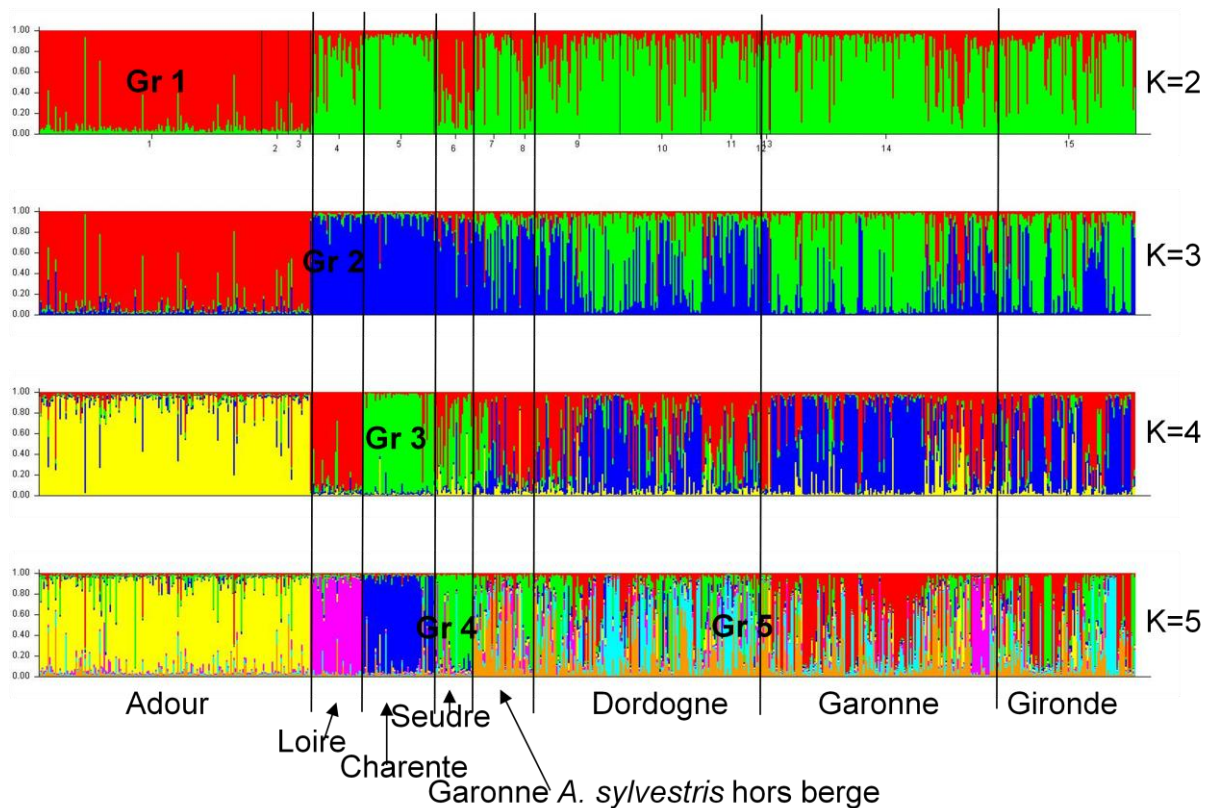
Une approche hiérarchique a été effectuée pour analyser successivement la structure génétique sur :

- l'ensemble des géotypes pour identifier des groupes homogènes ;
- des groupes homogènes constitués de plusieurs taxons identifiés dans l'analyse précédente : les groupes de l'Adour-Pyrénées et de la Charente.



➤ Identification de groupes homogènes

Les résultats sont représentés ci-dessous.



Structure des populations de l'ensemble des angéliques : Analyse bayésienne des données microsatellites nucléaires pour l'ensemble des pieds d'angéliques échantillonnés sur les différents bassins versants du Sud-ouest de la France. Chaque individu est représenté par une fine barre verticale divisée en K segments de couleurs représentant la probabilité que chaque individu appartienne à un groupe sans a priori. Les assignements dans les différents groupes sont donnés pour des valeurs de K consécutives de K = 2 à K = 5, K étant le nombre de groupe imposé au logiciel (STRUCTURE, Pritchard et al, 2000).

A K=2, on observe une différenciation entre les individus des Pyrénées-Adour-Nive-Nivelle toutes espèces confondues et les populations plus au Nord.

A K=3, les populations plus au Nord se différencient, avec d'une part un ensemble homogène des populations de la Loire, Charente, Seudre et d'autre part un groupe plus hétérogène pour le bassin de la Gironde au sens large.

A K= 4, la population de la Charente se différencie et les groupes Adour et Loire restent robustes.

A K=5, la population de la Seudre se différencie en groupe homogène et le groupe du bassin de la Gironde (Garonne, Dordogne, Gironde et populations hors berges de La Brède, Audenge et Biganos) reste très hétérogène. Les populations de la Dordogne se distinguent très légèrement de celles de la Garonne et de la Gironde.

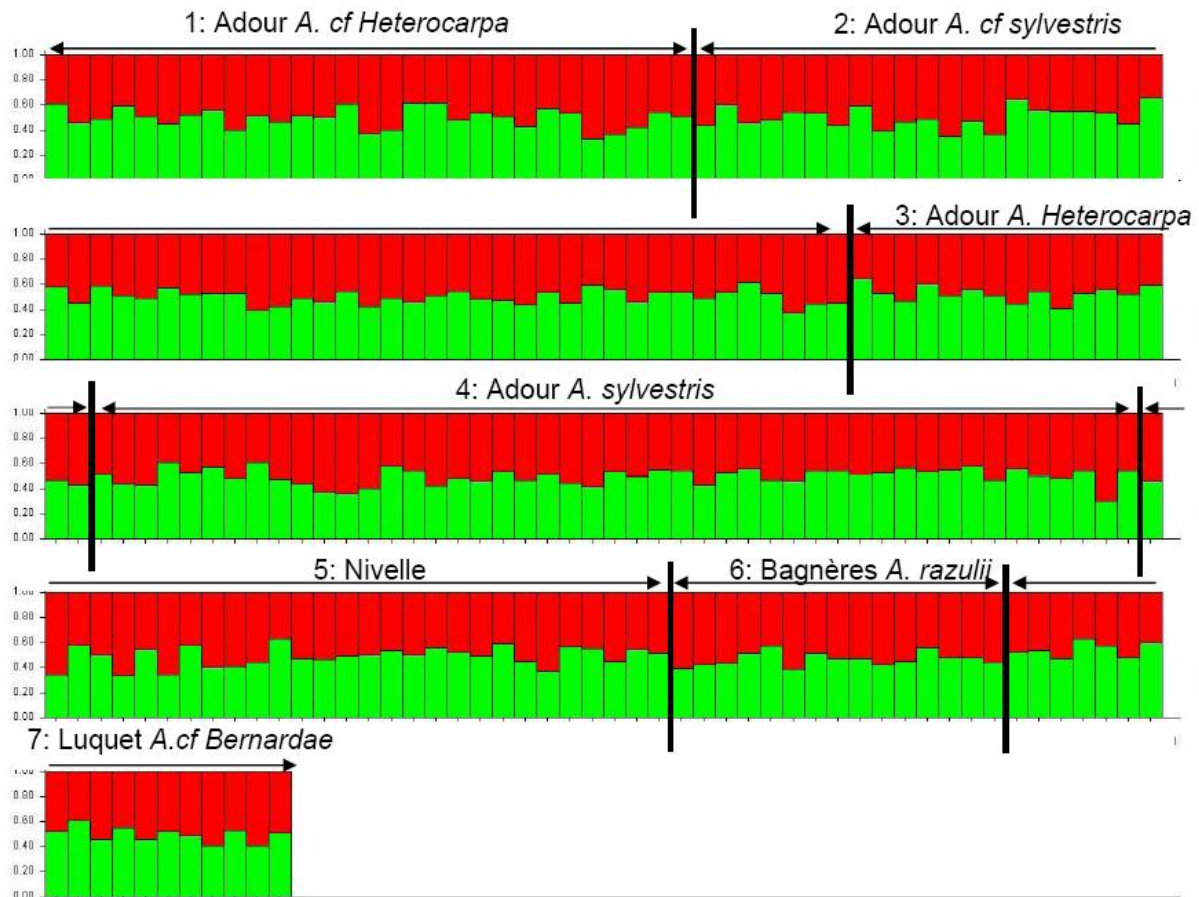
En conclusion, il existe une structuration génétique entre bassins versants, avec une différenciation forte entre les populations Adour-Pyrénées et celles des bassins plus au Nord, pour lesquelles il existe aussi une différenciation entre les bassins de la Loire, de la Charente, de la Seudre, et de l'ensemble Gironde-Dordogne-Garonne. Pour le bassin Gironde-Dordogne-Garonne, la structure est hétérogène, pouvant être interprétée comme résultant de flux de gènes avec les autres bassins, ou de sous-structures très locales (par exemple quelques allèles privés pour des individus typés *A. heterocarpa* du bassin de la Dordogne pour les sites de Libourne, Génissac, Vayres et Brannes).



➤ **Analyse des sous-structures des groupes homogènes de l'Adour-Pyrénées et de la Charente**

Pour les autres groupes, nous n'avons pas pu réaliser cette étude car pour la Loire, l'échantillonnage est composé uniquement d'individus typés *A. heterocarpa*, pour la Seudre uniquement des *A. cf sylvestris*, et le bassin de la Gironde est très hétérogène.

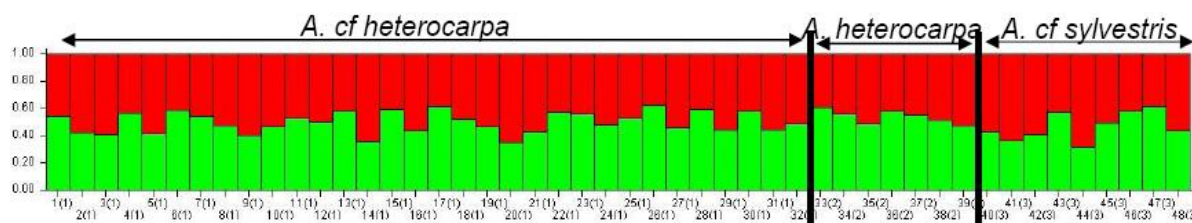
Le groupe « Adour-Pyrénées » est constitué des 4 taxons *A. heterocarpa*, *A. sylvestris* subsp. *sylvestris*, *A. razulii* et *A. sylvestris* subsp. *bernardae* et des individus classés « confère ». L'analyse révèle l'absence de sous-structure sur l'ensemble des taxons de l'aire bassin de l'Adour-Pyrénées : dans aucun cas nous ne pouvons distinguer les taxons sur la base de leur structure multilocus.



Sous-structure des populations sur le bassin de l'Adour et Pyrénées: Analyse bayésienne des données microsatellites nucléaires pour l'ensemble des pieds d'angéliques échantillonnés sur le bassin de l'Adour et les Pyrénées, à K=2. Chaque individu est représenté par une barre verticale divisée en segments de 2 couleurs représentant la probabilité que chaque individu appartienne à un groupe sans a priori. 1: Adour *A. cf heterocarpa*, 2: Adour *A. cf sylvestris*, 3: Adour *A. heterocarpa*, 4: Adour *A. sylvestris*, 5: Nivelle (24 individus *A. cf sylvestris*, 4 *A. sylvestris*, 1 *A. cf heterocarpa*), 6: Bagnères *A. razulii* (dont 1 *A. cf heterocarpa*), 7: Luquet *A. sylvestris cf ssp bernardae*.

Le groupe « Charente » comporte des *A. heterocarpa*, des *A. cf. heterocarpa* et des *A. sylvestris* subsp. *sylvestris*. L'analyse révèle là aussi l'absence de sous-structure sur l'ensemble des taxons du bassin de la Charente. L'analyse dans le bassin de la Gironde est plus complexe du fait de l'hétérogénéité, mais ne semble pas non plus, dans une première analyse, faire apparaître de différences génétiques entre *A. heterocarpa* et *A. sylvestris* subsp. *sylvestris*.





Sous-structure des populations sur le bassin de la Charente : Analyse bayésienne des données microsatellites nucléaires pour l'ensemble des pieds d'angéliques échantillonnés sur le bassin de la Charente, à $K=2$. Chaque individu est représenté par une barre verticale divisée en segments de 2 couleurs représentant la probabilité que chaque individu appartienne à un groupe sans *a priori*.

4.2. Marqueurs microsatellites chloroplastiques et génotypage

Le génotypage a été réalisé sur 256 individus typés *A. heterocarpa*, *A. sylvestris* subsp. *sylvestris* ou intermédiaires, de différentes provenances. ccmp2 et ccmp6 sont monomorphes sur l'ensemble des individus testés, et 19 combinaisons de génotypes, ou haplotypes (profil des marqueurs) ont été détectées pour les 4 locus (marques) polymorphes.

L'analyse des haplotypes chloroplastiques porte sur 72 échantillons typés *Angelica heterocarpa* récoltés sur la Garonne, la Dordogne et la Loire. Une analyse avec les groupes constitués *a priori*, correspondant aux 3 cours d'eau concernés, montre une diversité génétique à l'intérieur de chaque groupe et la matrice de distances génétiques entre populations des différents cours d'eau montre des différences significatives (sauf entre Dordogne et Garonne) pour les marqueurs chloroplastiques.

5. Conclusions et perspectives

Nos résultats indiquent une **structuration géographique selon les bassins versant**, qui peuvent ainsi être considérés comme des **unités de conservation indépendantes**.

Par contre, nous n'observons **pas de différenciation entre les différents taxons** du genre *Angelica*, ce qui permet de les considérer comme un complexe d'espèces qui échangent des gènes. L'absence de structure observée entre taxons, étonnante dans un premier temps, ne veut pas dire que ces taxons ne sont pas des espèces à part entière. Les différences taxonomiques existent sur un plan morphologique et semblent correspondre à des adaptations locales aux environnements de berges pour *A. heterocarpa*. Une hypothèse est que ces différences soient dues à des gènes majeurs soumis à sélection, qui représentent une toute petite partie du génome alors que la plupart du génome est soumis à flux de gènes (comme les marqueurs neutres que nous avons utilisés) (Wu and Ting, 2004). Récemment, quelques cas de différences taxonomiques sans différenciation génétique sur les marqueurs neutres ont été mis en évidence pour des espèces sympatriques (Ochieng, *et al.*, 2010). Il s'agit probablement de cas en dynamique de spéciation sympatrique. En termes de protection, il serait donc probablement judicieux de préserver un continuum de milieu pour préserver cette dynamique évolutive.

L'analyse de ces résultats devrait être poursuivie dans les prochains mois. Le travail actuel concerne l'obtention de séquences d'ADN (marqueurs chloroplastiques et marqueurs nucléaires ITS) pour permettre l'acquisition de données phylogéographiques et répondre de façon complémentaire aux relations entre espèces. Les données écologiques pourront aussi être prises en compte.



Bibliographie

EXCOFFIER L., LAVAL, et SCHNEIDER G.. 2005. - Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1. pp.47-50.

GAUDEUL M. et TILL-BOTTRAUD I.. 2008. - Genetic structure of the endangered perennial plant *Eryngium alpinum* (Apiaceae) in an alpine valley. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93. pp.667-677.

GUICHOUX E., LAGACHE L., WAGNER S., et al., 2011. - Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11. pp.591-611.

OCHIENG J.W. et al., 2010. - Two sympatric spotted gum species are molecularly homogeneous. *Conservation Genetics*, 11(1). pp.45-56.

PRITCHARD J., STEPHENS, M. et DONNELLY P.. 2000. - Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 , pp.945-959.

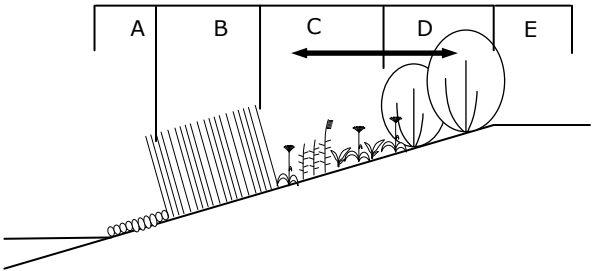
WEISSING K et GARDNER R.. 1999. - A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42. pp.9-19.

WU C.I. et TING C.T., 2004. - Genes and speciation. *Nature Reviews Genetics*, 5, pp.114-122.



Annexes

Annexe 1 : Niveaux de structuration des populations d'angélique des estuaires pris en compte pour l'élaboration du plan d'échantillonnage

| Niveaux de structuration | Implications pour l'échantillonnage et le recueil de données | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----------------|-------------------|----|------|-------|------|--------|---|--------|----|---------|----|-----|----|
| Le bassin versant (particularité de l'Adour) | Collecter sur les différents cours d'eau. | | | | | | | | | | | | | | |
| La position amont – aval localisation le long du cours d'eau entre les limites de salinité et de marées. | Collecter en différents points du cours d'eau depuis la limite aval jusqu'à la limite amont. | | | | | | | | | | | | | | |
| La structuration linéaire de la station : les densités | <p>Adapter le nombre d'échantillons en fonction de la densité : un premier passage sur 250 m linéaires de berge permet d'estimer la densité (nb pieds / 100m) et d'adapter le nb d'échantillons collectés.</p> <p style="text-align: center;"><i>Densité (nb de pieds / 100 m linéaire)</i></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Densité estimée</th> <th>Nb éch. collectés</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><2</td> <td>tous</td> </tr> <tr> <td>2 - 5</td> <td>tous</td> </tr> <tr> <td>5 - 10</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10- 25</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>25 - 50</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>>50</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table> | Densité estimée | Nb éch. collectés | <2 | tous | 2 - 5 | tous | 5 - 10 | 5 | 10- 25 | 10 | 25 - 50 | 30 | >50 | 30 |
| Densité estimée | Nb éch. collectés | | | | | | | | | | | | | | |
| <2 | tous | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 - 5 | tous | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 - 10 | 5 | | | | | | | | | | | | | | |
| 10- 25 | 10 | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 - 50 | 30 | | | | | | | | | | | | | | |
| >50 | 30 | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Le niveau topographique sur la berge</p> <p><i>Angelica heterocarpa</i> caractérise les mégaphorbiaies (niveau C). Elle peut également être présente dans les forêts rivulaires (niveau D) et dans les roselières (niveau B).</p> <p>Son optimum écologique : \longleftrightarrow</p> <p>Le haut de berge (E) est <i>a priori</i> plus favorable à <i>Angelica sylvestris</i> subsp. <i>sylvestris</i>.</p> | <p>Collecter sur tout le profil de pente des berges.</p> <p>Noter le niveau topographique sur lequel l'échantillon est collecté (A à E) :</p>  | | | | | | | | | | | | | | |



Annexe 2 : Protocole de récolte des échantillons et modalités pratiques

Modalités pratiques sur le terrain

➤ Travail à l'échelle d'un linéaire de 250 m

Le linéaire est caractérisé par le premier et le dernier numéro d'échantillon récolté sur ce linéaire (Ex : 150-180 pour un linéaire où il a été récolté les échantillons numérotés de 150 à 180). Les actions à réaliser sont :

- photographier le linéaire de berge ;
- remplir la fiche descriptive « linéaire de berge ». Une seule fiche remplie par linéaire de berge quel que soit le nombre de pieds échantillonnés sur ce linéaire ;
- estimer la densité en angélique sp. et adapter le nombre d'échantillons à collecter sur le linéaire.

➤ Travail à l'échelle du pied d'angélique collecté au sein du linéaire de berge

Le pied d'angélique échantillonné est caractérisé par le nom du cours d'eau, la position le long du gradient amont – aval et un numéro d'échantillon. A chaque échantillon correspondent un numéro et une fiche « échantillon ». Les actions à réaliser sont :

- faire un point GPS ;
- attribuer un numéro à l'échantillon et le reporter sur les fiches « échantillon » ;
- remplir la fiche « échantillons » ;
- prélever d'un morceau de feuille (morceau de feuille de 5 à 10 cm² (3 folioles environ) à la main ou à l'aide de ciseaux. La partie prélevée était de préférence jeune, en croissance, non sénescence et non attaquée par des moisissures ou des insectes) ;
- placer le morceau de feuille dans un sachet à thé (10 x 16 cm) lui-même placé dans un sac plastique (12 x 17 cm) contenant une poignée de silicagel ;
- afin de contrecarrer les erreurs de numérotation, indiquer sur le sac plastique le numéro de l'échantillon, la commune, le lieu-dit et la date ;
- constituer une part d'herbier du pied échantillonné (privilégier le prélèvement d'une feuille entière sans dépasser un format A4. Si la feuille est trop grande, prélever la partie terminale).
- noter la distance au prochain pied d'angélique.

Modalités pratiques de retour du terrain

➤ Echantillons en présence de silicagel

Placer les sacs plastiques contenant les échantillons en présence de silicagel dans un endroit sec, à l'abri de la lumière par mesure de précaution.

Faire un suivi régulier de la qualité du silicagel dans les sachets et remplacer le silicagel saturé d'humidité (rose) par du silicagel déshydraté (bleu) dès que nécessaire c'est-à-dire quand les grains de silicagel sont majoritairement roses dans le sachet. Ne pas jeter le silicagel rose car celui-ci se régénère par passage à l'étuve.



Echantillon génétique dans son sachet

➤ Echantillons d'herbier

Au plus tard 48h après le prélèvement de l'échantillon, scanner cet échantillon.

- Résolution du scanner HP : 150 ppp (taille du fichier : 6,5 Mo)
- Nom fichier : échantillon n°

Renouveler le papier journal jusqu'à ce que l'échantillon soit totalement séché. Placer avec l'échantillon une fiche d'identification de la part d'herbier dûment complétée.



Une partie des feuilles récoltées n'a pas fait l'objet d'une numérisation car leur état était trop mauvais pour permettre une exploitation ultérieure. C'est notamment le cas pour les échantillons de la Seudre et de la Charente.

➤ **Saisie des données**

Saisir dans la base de données Excel « CBNSA génétique Angélique », les données remplies sur les fiches « linéaire de berge » et « échantillons ».



Annexe 3 : Fiches de terrain « linéaire de berges » et « échantillons »

| | |
|--|---------------------------|
| GENETIQUE Angélique des estuaires | LINEAIRE DE BERGES |
| n°/..... | |

Date : / /

Collecteur(s) :

Situation géographique

Département : 17 (Charente-Maritime) 33 (Gironde) 40 (Landes) 64 (Pyrénées-Atlantiques)
 Loire-Atlantique (44) 65 (Hautes-Pyrénées) Autre département :

Cours d'eau : Loire(Lo) Charente(C) Seudre(S) Gironde (Gi) Garonne(Ga) Dordogne(Do)
 Isle(I)

Leyre(Le) Adour(A) Nivelle(N) Bidassoa (Bi) Affluents de l'Adour (.....)

Rive : Droite Gauche

Commune :
.....

Lieu dit :
.....

Densité en Angélique sur le linéaire

Linéaire parcouru :mètres

Nombre de pieds d'Angélique sur le linéaire parcouru : pieds

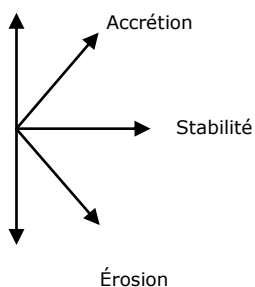
Densité (nb de pieds / 100 m linéaire) <2 2 - 4 5- 9 10 - 24 25-50
 >50

Caractéristiques du linéaire

Anthropisation : non modérée (dépôts gravats, déchets) forte (aménagements)

Boisement : absent modéré (ligneux isolés) important (ripisylve)

Erosion :
(entourez la flèche)



GENETIQUE Angélique des estuaires ECHANTILLON

n°.....

Date de collecte : / /

Collecteur(s) :

Commune :

Lieu dit :

Coordonnées GPS : Nord Ouest

Taxon

Angelica heterocarpa *Angelica sylvestris* subsp. *sylvestris* *Angelica razulii* *Angelica sylvestris* subsp. *bernardae*

Angelica cf. *heterocarpa* *Angelica* cf. *sylvestris* subsp. *sylvestris* *Angelica* cf. *razulii* *Angelica* cf. *sylvestris* subsp. *bernardae*

Phénologie

Stade végétatif Fleuri Fructifié Sénescent

Hauteur du pied échantillonné

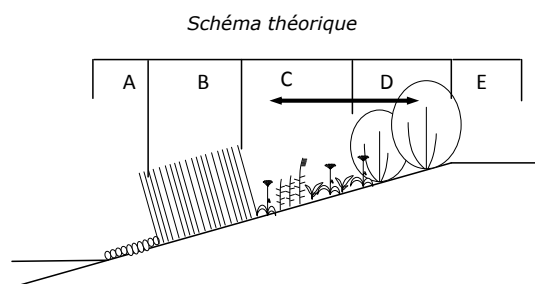
H :cm

Caractères morphologiques

Anthocyanes : tiges feuilles fleurs

Indice de tonte ou de fauche du pied : oui non

Niveau topographique (entourer le niveau topographique A à E au sein duquel est collecté l'échantillon)



| Niveau topographique sur la berge |
|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> A |
| <input type="checkbox"/> B |
| <input type="checkbox"/> C |
| <input type="checkbox"/> D |
| <input type="checkbox"/> E |

| Formation végétale |
|--|
| <input type="checkbox"/> parvo-roselière |
| <input type="checkbox"/> roselière |
| <input type="checkbox"/> mégaphorbiaie |
| <input type="checkbox"/> ripisylve |
| <input type="checkbox"/> prairie |
| <input type="checkbox"/> roncier |

Ombrage sur le pied échantillonné

pas d'ombrage oui par la végétation herbacée oui par un ligneux oui par un édifice

Caractéristiques du lieu d'implantation du pied échantillonné

sédiments vaseux sédiments terreux anfractuosités rocheuses enrochement support végétal

Distance au pied d'Angélique le plus proche

D :mètres



Annexe 4 : Rapports intermédiaires faisant état de l'avancement des travaux

Les rapports intermédiaires faisant état de l'avancement des travaux et produits par les généticiens en charge de la réalisation de l'étude sont présentés dans l'ordre chronologique de rédaction. Ils permettent de suivre les avancements des différentes étapes de cette étude génétique.



Étude de la diversité génétique du complexe d'espèces du genre *Angelica* en Aquitaine et Poitou-Charentes : rapport d'avancement des travaux au 29 juillet 2009

Rédaction : Emmanuelle Revardel, Université Bordeaux 1

INRA, Université Bordeaux I, UMR Biogeoco
Conservatoire Botanique National Sud-Atlantique
Contrat n° 22000346

Objectifs de l'étude :

Il s'agit d'étudier la diversité génétique au sein du complexe d'espèces du genre *Angelica* de l'inter-région Aquitaine Poitou-Charentes : *Angelica heterocarpa*, *Angelica sylvestris* subsp. *sylvestris*, *Angelica sylvestris* subsp. *bernardae* et *Angelica razuli*, grâce à l'utilisation de marqueurs microsatellites.

Les espèces *Angelica heterocarpa* et *A. sylvestris* sont présentes à proximité des berges des estuaires. Dans certaines zones, certains pieds présentent des caractères intermédiaires entre les deux espèces. Une hybridation entre ces espèces pourrait expliquer cette observation.

Dans la région de l'Adour, les formes intermédiaires sont plus marquées et plus hétérogènes, et une hybridation avec d'autres espèces d'Angéliques, plus montagnardes, est suspectée : *A. razuli* et *A. sylvestris* subsp. *bernardae*.

Dans le but de caractériser la structuration génétique des populations d'Angéliques, et d'identifier d'éventuelles hybridations interspécifiques, une analyse génétique utilisant des marqueurs microsatellites est entreprise dans le cadre du présent projet.

Le travail est programmé en plusieurs étapes:

- 1) mise au point de marqueurs microsatellites (première année)
- 2) échantillonnage (première et deuxième année, effectué par le conservatoire en concertation avec les scientifiques)
- 3) génotypage des individus et analyse (deuxième année)

Mise au point des marqueurs microsatellites :

La mise au point des marqueurs microsatellites a débuté en février 2009, prise en charge par Emmanuelle Revardel.

L'objectif est de combiner une douzaine de marqueurs microsatellites sous forme de multiplexe, afin de réaliser le minimum d'étapes de biologie moléculaire et une seule lecture au niveau du génotypage pour caractériser autant de locus que de marqueurs.



Comme il n'existe pas de marqueurs microsatellites publiés dans le genre *Angelica*, leur mise au point est un travail indispensable pour pouvoir réaliser l'analyse génétique. Il doit comporter les étapes suivantes :

1. Obtention de clones de fragments portant des motifs microsatellites
 - Extraction d'ADN génomique de quelques individus d'*Angelica*
 - Création d'une banque de fragments d'ADN génomique enrichie en motifs microsatellites
 - Clonage des fragments obtenus
 - Séquençage des fragments et sélection des clones d'intérêt
2. Test de polymorphisme de nombre de répétitions par amplification PCR
 - Dessin et choix d'amorces pour amplification PCR
 - Extraction d'ADN d'une trentaine d'individus pour tester le polymorphisme
 - Test d'amplification et de polymorphisme de taille par amplification PCR sur de l'ADN de différents individus de *A. heterocarpa* et *A. sylvestris*.
 - Multiplexage des amorces

Echantillonnage

Nous avons travaillé de concert avec le Conservatoire Botanique National Sud-Atlantique (Sandrine Lorient) pour la mise au point d'un protocole d'échantillonnage sur le terrain. La récolte de 1200 échantillons répartis sur les berges des différents bassins versants doit se dérouler dans le courant de l'été 2009.

Premiers résultats

Etat d'avancement de la mise au point des marqueurs :

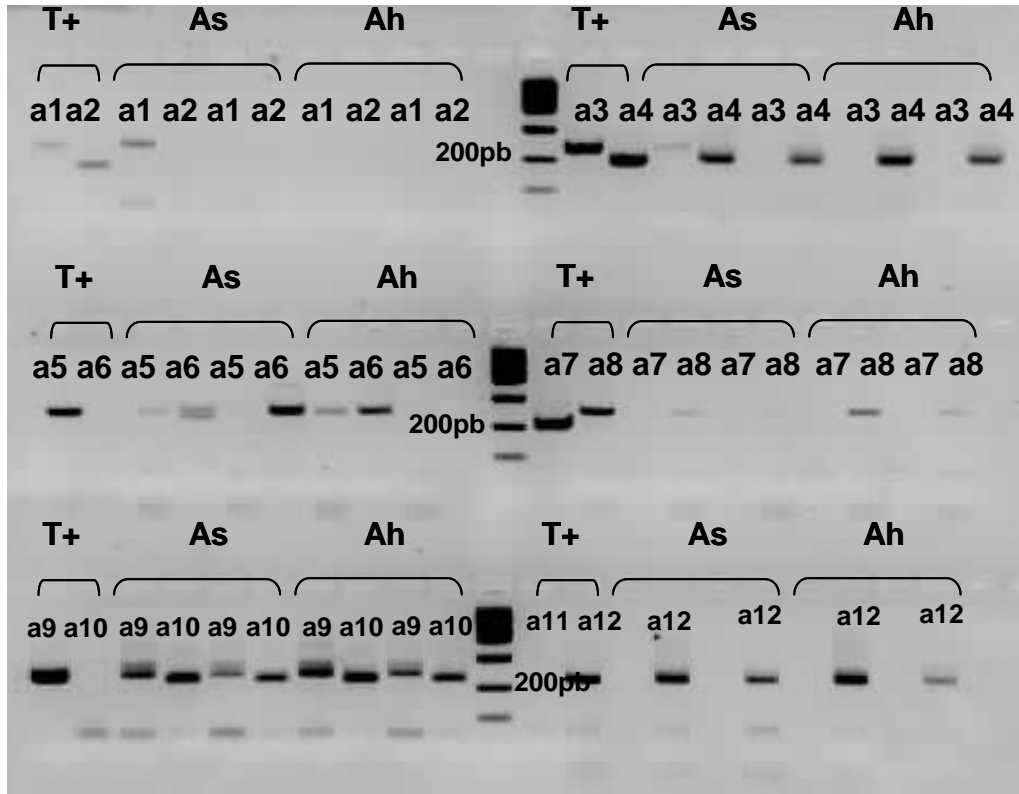
1. Obtention de clones de fragments portant des motifs microsatellites

L'ADN génomique de 3 individus en mélange d'*Angelica heterocarpa* d'une part et de 3 individus d'*Angelica sylvestris* d'autre part, a été coupé par l'enzyme de restriction RsaI, et les produits de digestion passés sur colonne pour enrichissement en motifs dinucléotides CA et GA et trinucléotides GCC. Quatre mélanges de fragments ont ainsi été obtenus et clonés dans un vecteur bactérien pGEM. Parmi ces clones, environ 200 ont été séquencés et 100 se sont trouvés contenir des microsatellites. Une cinquantaine de clones non redondants ont finalement été retenus. Les motifs sont essentiellement des répétitions de dinucléotides CA et GA. Un exemple de séquence présentant un tel motif est donné ci-dessous :



2. Test de polymorphisme du nombre de répétitions par amplification PCR
 a. Test des couples d'amorces identifiés :

Sur l'ensemble des séquences obtenues, une trentaine de couples d'amorces a été déterminée en vue de l'amplification par PCR des motifs microsatellites à partir d'ADN génomique des angéliques. Ces amorces ont été testées dans un premier temps sur 5 individus, 3 *A. heterocarpa* et 2 *A. sylvestris*. Seuls 12 couples amplifient convenablement un fragment. Par exemple, sur le gel photographié ci-dessous, sur 12 couples d'amorces testés sur l'ADN de 4 individus, seuls 5 (a3, a4, a9, a10, a12) donnent un signal permettant de les retenir.



T+: témoin; As: *A. sylvestris*, Ah: *A. heterocarpa*
a1 à a12: différents couples d'amorces

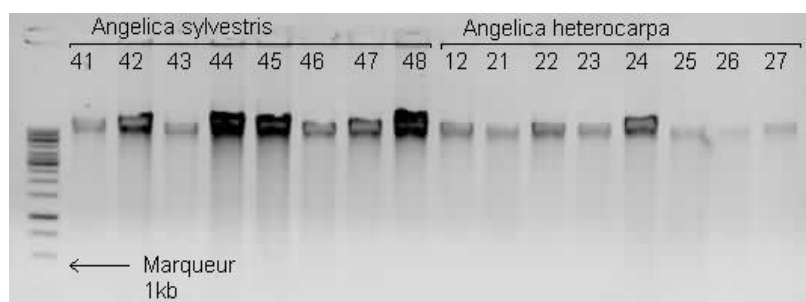
De plus, différentes conditions de PCR ont été étudiées pour essayer d'optimiser les réactions dans le but d'associer les différents couples d'amorce dans une seule réaction PCR (obtention d'un multiplex).

A ce stade, toutes les amorces hybrident aussi bien avec *A. heterocarpa* qu'avec *A. sylvestris*. Ces marqueurs conviennent donc apparemment pour les deux espèces.

b. Test du polymorphisme

Il a fallu pour cette étape extraire de l'ADN génomique d'une trentaine d'individus.

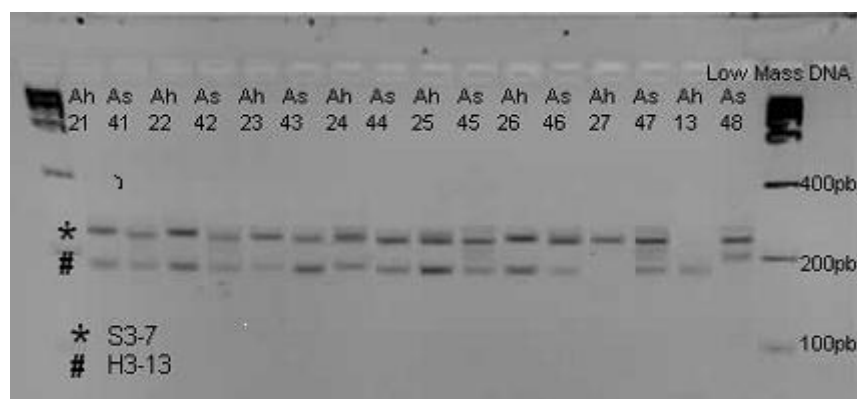
La photographie ci-dessous représente le résultat de la migration électrophorétique de l'ADN de quelques-unes de ces extractions:



Notre but est de pouvoir mesurer un polymorphisme allélique en utilisant des amorces marquées par différentes couleurs (bleu, rouge, vert et jaune), sur séquenceur ABI. Nous avons essayé de tester le polymorphisme des marqueurs sur l'ADN de ces différents individus, par deux approches:

- Directement par marquage coloré des oligonucléotides et passage sur séquenceur ABI. Pour cela, nous avons rencontré de nombreuses difficultés du fait de la complexité de cette technique. Nous en sommes donc ici à une étape de mise au point technique. Cette étape nous a néanmoins permis de voir que sur les 12 couples d'amorces retenues, au moins 3 présentent un polymorphisme de 2 à 5 allèles.

- Nous avons choisi une approche beaucoup plus simple mais plus grossière nous permettant de visualiser un polymorphisme : par migration des produits de PCR obtenus pour différents individus sur gel d'agarose très concentré (4%). Sur 6 couples d'amorces testés, tous semblent polymorphes. La photographie d'un tel gel est donnée ci-dessous, où le produit de deux réactions de PCR (deux couples d'amorces S3-7 et H3-13) a été déposé dans chaque puits, l'un au-dessus de 200pb, et l'autre au-dessous. Les variations de hauteur des bandes en fonction des individus (As : *A. heterocarpa* et Ah : *A. sylvestris*) pour chaque couple nous indiquent des différences alléliques entre les individus.



Conclusions et perspectives

Nous sommes donc en cours de mise au point des marqueurs. Nous disposons de couples d'amorces qui amplifient des locus à la fois chez *A. heterocarpa* et *A. sylvestris*. Certains de ces marqueurs semblent polymorphes.

Cependant, du fait des aléas techniques, chaque couple d'amorces en est à une étape particulière de sa mise au point. Cela demande encore de nombreux ajustements techniques. Il est possible que nous ne disposions pas de suffisamment de marqueurs adaptés pour l'analyse génétique. Dans ce cas, certaines des étapes devront être refaites (par exemple repartir de la banque).

Il s'agira aussi de tester les amplifications sur les autres espèces du genre, pour lesquelles nous ne disposons pas encore d'échantillons.

La mise au point de marqueurs microsatellites est un travail lourd, long et coûteux. Les aléas techniques doivent être pris en compte dans le temps et le budget consacré.



Dépenses déjà effectuées :

| Type de manipulation | Coût approximatif |
|--|-------------------|
| Extraction d'ADN (50 échantillons) | 100 euros |
| Création de la banque et clonage | 200 euros |
| Séquençage (environ 6 plaques de 96 réactions) | 1800 euros |
| Amplifications PCR et Génotypage | 1500 euros |
| Divers (terrain, consommable...) | 500 euros |
| Total approximatif déjà dépensé | 4100 euros |

Personnes impliquées dans la mise au point des marqueurs:

Emmanuelle Revardel, Maître de conférences Université Bordeaux 1.

Anne-Laure Bouillot, Stagiaire BTS Biotechnologie du lycée Saint-Louis de Bordeaux (stage de 6 semaines en mai-juillet 2009, et stage de 9 semaines prévu en décembre-février 2010).

Henri Caron, Ingénieur de Recherche INRA.



Étude de la diversité génétique du complexe d'espèces du genre *Angelica* en Aquitaine et Poitou-Charentes : Rapport d'avancement des travaux au 20 janvier 2011

Rédaction : Emmanuelle Revardel, Université Bordeaux 1

INRA, Université Bordeaux 1, UMR Biogeco
Conservatoire Botanique National Sud-Atlantique
Contrat n° 22000346

Objectifs de l'étude :

Angelica heterocarpa est une espèce protégée, endémique des estuaires du sud-ouest de la France, inféodée aux berges dans les zones de marée dynamique.

Dans certaines zones à proximité des berges, *Angelica heterocarpa* et *A. sylvestris* cohabitent, et certains pieds présentent des caractères intermédiaires entre les deux espèces. Une hybridation entre ces espèces pourrait expliquer cette observation. Dans la région de l'Adour, les formes intermédiaires sont plus marquées et plus hétérogènes, et une hybridation avec d'autres espèces d'Angéliques, plus montagnardes, est suspectée : *A. razuli* et *A. sylvestris subsp. bernardae*.

Notre objectif est de caractériser les relations génétiques d'*Angelica heterocarpa* avec les autres espèces, son statut taxonomique (différences avec les autres espèces), et la structuration génétique des populations d'Angéliques sur les différents bassins versants et le long du gradient amont-aval des estuaires en fonction des conditions écologiques.

Dans ce but et dans le cadre du présent projet, une analyse génétique utilisant des marqueurs microsatellites a été entreprise. Le travail a été programmé en plusieurs étapes:

| Etapes | Prévu en | Réalisé |
|--|----------------------------------|-------------------------|
| Mise au point de marqueurs microsatellites | Première année et deuxième année | En cours |
| Echantillonnage et extraction d'ADN | Première et deuxième année | Réalisé |
| Génotypage des individus et analyse | Deuxième année | Prévu au printemps 2011 |

Mise au point des marqueurs microsatellites :

Comme il n'existe pas de marqueurs microsatellites publiés dans le genre *Angelica*, leur mise au point était un travail indispensable pour pouvoir réaliser l'analyse génétique. L'objectif est de combiner une douzaine de marqueurs microsatellites nucléaires sous forme de multiplexe, afin de réaliser le minimum d'étapes de biologie moléculaire et une seule lecture au niveau du génotypage pour caractériser autant de locus que de marqueurs. Un nombre de locus polymorphes suffisant (environ une dizaine avec au minimum 6 allèles équilibrés) est nécessaire pour pouvoir donner des réponses de qualité à nos questions scientifiques.

La mise au point des marqueurs microsatellites a débuté en février 2009. Dans le rapport de septembre 2009, nous faisons état de l'avancement de la mise au point : nous avons 3-4 marqueurs potentiels. A l'issue de cette première étape extrêmement longue, fastidieuse, et coûteuse, le nombre de marqueurs était insuffisant. Nous avons alors fait appel à une stratégie récente de séquençage à grande échelle auprès d'une entreprise spécialisée.

Pour l'instant, après avoir testé une cinquantaine de couples d'amorces, nous en avons retenu 25 qui amplifiaient sur l'ADN d'Angélique, et 12 qui présentaient un polymorphisme. Ensuite, 9 présentant un profil de



bonne qualité ont été testés en multiplexe. Nous en sommes à une phase d'optimisation de la qualité du multiplexe (en essayant d'en combiner 9). Pour une analyse complète, nous sommes en train de développer un second multiplexe, à partir d'autres séquences.

À ce stade, toutes les amorces amplifient aussi bien l'ADN d'*A. heterocarpa* que celui d'*A. sylvestris*. Ces marqueurs conviennent donc pour les deux espèces. Pour les échantillons testés, il y a en général un ou deux allèles détectable par individu, ce qui indiquerait que ces espèces sont diploïdes (une polyploidie aurait compliqué l'analyse), et montre qu'il existe un polymorphisme qui devrait nous permettre de conclure sur les relations inter- et intra-spécifiques.

L'avancement du travail devrait nous permettre de réaliser le génotypage des différents individus au printemps.

Extraction de l'ADN des échantillons :

La récolte d'environ 1000 échantillons répartis sur les berges des différents bassins versants a été réalisée pendant l'été 2009 par le conservatoire. Nous avons réalisé l'extraction des ADN en janvier et février 2010. Les échantillons sont donc prêts pour le génotypage.

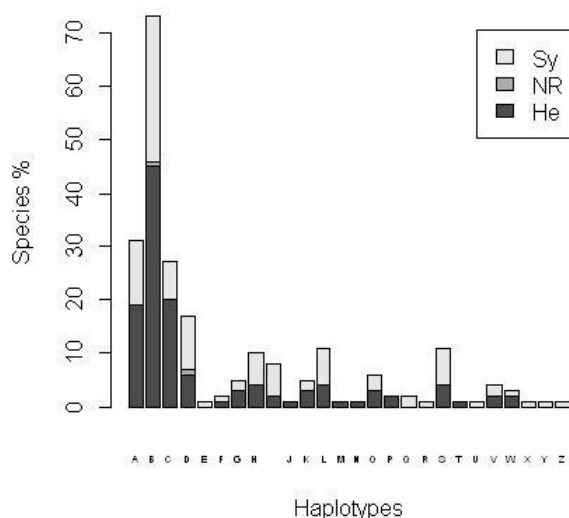
Utilisation de marqueurs microsatellites chloroplastiques :

Des informations complémentaires à la structure des populations peuvent être apportées par l'étude des marqueurs de l'ADN chloroplastiques.

Nous avons testé des marqueurs microsatellites chloroplastiques universels. Sur 10 couples d'amorces testés, 6 ont donné un signal sur Angélique. L'haplotype (profil des marqueurs) d'une centaine d'individus des deux espèces et d'individus de morphologie intermédiaires, de différentes provenances, a été déterminé.

Une première représentation de ces résultats est donnée ci-dessous :

Pourcentage des différents haplotypes (codés par les lettres A à Z) parmi les différents types morphologique des individus testés (Sy : *A. sylvestris* ; He : *A. heterocarpa*, et NR : individus intermédiaire)



Il n'y a pas de structuration des haplotypes par espèce visible suite à notre étude. Cela suggère que les espèces ne sont pas différenciées génétiquement, situation probablement liée à l'existence de flux de gènes entre les espèces (qui homogénéisent les compositions). Une autre hypothèse serait que les espèces ont divergé trop récemment pour que la différenciation de ces marqueurs puisse s'observer.



Conclusions et perspectives

La mise au point des marqueurs est quasiment achevée. Nous disposons de couples d'amorces qui amplifient des locus à la fois chez *A. heterocarpa* et *A. sylvestris* et qui présentent un polymorphisme. Ils pourront être utilisés pour l'analyse génétique prévue au printemps 2011.

Par ailleurs, l'utilisation de marqueurs chloroplastiques universels, que nous avons déjà initiée, permettra un complément d'information sur les hybridations potentielles entre les espèces. Nous envisageons aussi une deuxième approche, basée sur la comparaison des séquences (marqueurs ETS chloroplastiques) pour répondre de façon complémentaire à ces questions d'hybridation. Ces deux dernières approches, bien que moins performantes que les marqueurs microsatellites nucléaires, sont en théorie applicables à d'autres espèces. Les tester avec l'Angélique nous permettra de les maîtriser pour l'analyse d'autres espèces pour lesquelles se pose la question de l'hybridation, comme l'œnanthe de Foucaud.

Personnes impliquées dans la mise au point des marqueurs en 2009-2010 :

- Emmanuelle Revardel, Maître de conférences Université Bordeaux 1 ;
- Anne-Laure Bouillot, Stagiaire BTS Biotechnologie du lycée Saint-Louis de Bordeaux (stage de 6 semaines en mai-juillet 2009, et stage de 9 semaines en décembre-février 2010) et 1 mois en juillet en main d'œuvre occasionnelle (rémunération sur le contrat Angélique) ;
- Henri Caron, Ingénieur de Recherche INRA ;
- Guillaume Lalanne-Tisné, titulaire d'un M2, en main d'œuvre occasionnelle pendant 2 mois (rémunération sur le contrat Angélique) ;
- Sophie Gerber, chargée de recherches INRA, appui.





Étude de la diversité génétique du complexe d'espèces du genre *Angelica* en Aquitaine et Poitou-Charentes : Rapport au 29 novembre 2011

Rédaction : Emmanuelle Revardel, Université Bordeaux 1

INRA, Université Bordeaux 1, UMR Biogeco
Conservatoire Botanique National Sud-Atlantique
Contrat n° 22000448

Objectifs de l'étude :

L'angélique des estuaires (*Angelica heterocarpa*) est une espèce protégée, endémique des estuaires du sud-ouest de la France, inféodée aux berges soumises à marées dynamiques.

Dans certaines zones à proximité des berges, elle cohabite avec l'angélique des bois (*A. sylvestris*), espèce commune, et certains individus présentent des caractères morphologiques intermédiaires entre les deux espèces, posant des problèmes d'identification. Les botanistes des conservatoires ont fait l'hypothèse que des hybridations ou des introgressions pourraient expliquer ces observations.

Dans la région de l'Adour, l'hétérogénéité morphologique est plus marquée, et des hybridations avec d'autres angéliques, plus montagnardes, sont suspectées : *A. razulii* et *A. sylvestris subsp. bernardae*.

Dans ce contexte, notre objectif est de caractériser les relations génétiques à l'intérieur du complexe d'espèces du genre *Angelica* et la structuration génétique des populations sur les différents bassins versants du Sud-ouest de la France, pour répondre aux questions des différences génétiques entre taxons, des corrélations entre différences génétiques et différences écologiques, et spatiales.

Nous avons choisi d'utiliser des marqueurs microsatellites, nucléaires et chloroplastiques, qui ont déjà largement montré leur utilité dans l'étude génétique des populations d'espèces rares ou en danger (Gaudeul et Till-Bottraud, 2008), comme guides pour les orientations de conservation.

L'étude concerne l'ensemble des bassins versants du Sud-ouest de la France: bassins de la Loire, de la Charente, de la Gironde, et de l'Adour).

Le travail s'est organisé en plusieurs étapes :

| Étapes | Réalisation en |
|--|----------------|
| Mise au point de marqueurs microsatellites nucléaires | 2009-2011 |
| Echantillonnage et extraction d'ADN | 2009-2010 |
| Génotypage des individus (marqueurs nucléaires et chloroplastiques) | 2011 |
| Analyse des données | Fin 2011-2012 |

Actuellement, les données sont acquises, mais leur analyse est en cours, et les résultats présentés ici sont très préliminaires.



MATERIEL ET METHODES

Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé par le conservatoire CBNSA sur l'ensemble de l'aire de répartition d'*Angelica heterocarpa* (**Figure 1**). Les échantillons ont été collectés sur des pieds d'Angélique présents sur les berges, si possibles espacés de plusieurs mètres, indépendamment de leur identité taxonomique. Des individus typés *A. heterocarpa*, *A. sylvestris* et intermédiaires ont ainsi été collectés « par hasard » sur les berges à différents niveaux topographiques, et leur identité a été notée *a posteriori* (c'est-à-dire sans avoir influencé la récolte). Les individus de morphologie intermédiaire ont été notés « *cf heterocarpa* » ou « *cf sylvestris* » en fonction de leur plus grande ressemblance avec l'un ou l'autre des taxons.

Des échantillons de populations de référence typés *A. sylvestris*, *A. razulii* et *A. sylvestris ssp bernardae* ont par ailleurs été récoltés dans des stations hors berges d'estuaires, et *A. heterocarpa* en berge de Loire (région où il n'y a pas d'ambiguïté d'identification morphologique).

Au total, 890 échantillons ont été collectés.

Développement des marqueurs microsatellites nucléaires et génotypage

Etant donné qu'il n'existait pas de marqueurs microsatellites publiés dans le genre *Angelica*, leur mise au point était un travail indispensable pour pouvoir réaliser une analyse génétique. L'objectif était de combiner une dizaine de marqueurs microsatellites nucléaires sous forme de multiplexe, afin de réaliser le minimum d'étapes de biologie moléculaire et de passages au séquenceur pour le génotypage.

La mise au point des marqueurs microsatellites a débuté en février 2009. Dans le rapport de septembre 2009, nous faisons état de l'avancement de la mise au point : nous avons 3-4 marqueurs potentiels. A l'issue de cette première étape extrêmement longue, fastidieuse, et coûteuse, le nombre de marqueurs était donc insuffisant et nous avons alors fait appel à une stratégie récente de séquençage à grande échelle (séquençage 454) auprès d'une entreprise spécialisée (Genoscreen) (Guichoux et al, 2011).

Avec cette seconde stratégie, sur une centaine de couples d'amorces testés, nous en avons retenu une quarantaine de marqueurs qui amplifiaient l'ADN d'Angélique, puis une vingtaine qui présentaient un polymorphisme. Ensuite, 16 présentant un profil de bonne qualité ont été utilisés en deux multiplexes pour le génotypage des individus.

Tous les couples d'amorces utilisés et testés amplifient aussi bien à partir de l'ADN d'*A. heterocarpa* que de celui d'*A. sylvestris*. Ces marqueurs conviennent donc pour les deux taxons. Pour les échantillons testés, il y a en général un ou deux allèles détectables par individu, ce qui est compatible avec le fait que ces taxons sont bien diploïdes (une polyploïdie aurait compliqué l'analyse), et montre qu'il existe un polymorphisme qui pourra être exploité pour notre analyse.

Pour les marqueurs retenus pour l'analyse, ils amplifient aussi à partir de l'ADN des autres taxons, *A. razulii* et *A. sylvestris ssp bernardae*, présentant aussi un polymorphisme.

Le génotypage a été effectué sur l'ADN extrait de l'ensemble des échantillons collectés. A l'issue de la lecture des génotypes, sur les 16 marqueurs utilisés, 8 seront exploitables pour l'analyse génétique : S216 issu du premier clonage, et An11, An23, An35, An39, An68, An69, An91 obtenus à la suite du séquençage 454.

La répartition des individus génotypés en fonction de leur origine ou groupe taxonomique est récapitulée dans le **tableau 1**.

Le **tableau 2** récapitule les marqueurs nucléaires utilisés et leur polymorphisme sur les 252 individus identifiés *A. heterocarpa*.

Marqueurs microsatellites chloroplastiques

En complément des marqueurs nucléaires mis au point, nous avons testé des marqueurs microsatellites chloroplastiques qui peuvent apporter des informations complémentaires à la structure des populations, en particulier sur d'éventuelles introgressions entre espèces.

Les marqueurs chloroplastiques, relativement « universels », peuvent souvent être utilisés sur plusieurs espèces. Nous avons ainsi testé 12 de ces marqueurs sur *Angelica heterocarpa* et *A. sylvestris*. Sur les 12 couples d'amorces testés, 6 ont donné un signal et ont été utilisés pour le génotypage : ccmp2, ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp10 et J (Weising et al. 1999 et Caron H, communication personnelle).

Le génotypage a été réalisé sur 256 individus typés *A. heterocarpa*, *A. sylvestris* ou intermédiaires, de différentes provenances. ccmp2 et ccmp6 sont monomorphes sur l'ensemble des individus testés, et 19 combinaisons de génotypes (haplotypes) pour les 4 marques polymorphes ont été détectées (**tableau 3**).



Analyses statistiques

Différents types d'analyses statistiques pour caractériser la diversité génétique et sa répartition pourront être utilisés pour exploiter les données disponibles, dépendant de :

- 1) si on choisit de définir des groupes *a priori* (par exemple les populations des bassins versants ou les taxons) : approche F-Statistique (logiciel ARLEQUIN, Excoffier et al. 2005)
- 2) si on cherche des unités génétiquement indépendantes sans *a priori* : approche bayésienne (logiciel STRUTURE),
- 3) si on teste et décrit une structure génétique continue (autocorrelation spatiale).

RESULTATS

L'analyse des données obtenues est en cours, et les résultats sont encore très préliminaires. Quelques pistes sont présentées ici, qui concernent uniquement le groupe typé *Angelica heterocarpa* sans ambiguïté.

Données des microsatellites nucléaires

L'analyse avec les marqueurs microsatellites nucléaires porte sur tous les individus typés *A. heterocarpa* de l'échantillonnage, soit 252 individus.

Une première analyse en constituant des groupes *a priori*, par cours d'eau (Adour, Charente, Dordogne, Garonne, Gironde, Loire) montre une diversité génétique à l'intérieur de chaque groupe, et des différences entre groupes (**tableau 4**).

Une seconde analyse, cette fois sans *a priori* de groupe (**figure 2**), permet d'identifier très clairement comme populations particulières, les *A. heterocarpa* de l'Adour d'une part et ceux de la Loire d'autre part. Ensuite, même si moins structurée, la Charente apparaît distincte, ainsi que la Garonne. Les populations de la Gironde et de la Dordogne ne se distinguent pas entre elles.

Notons à ce jour que ces résultats sont très partiels et ne sont que préliminaires à une analyse plus approfondie.

Données des microsatellites chloroplastiques

L'analyse des haplotypes chloroplastiques porte sur 72 individus typés *Angelica heterocarpa* répartis sur la Garonne, le Gironde, la Dordogne et la Loire.

Une analyse avec groupes constitués *a priori* correspondant aux quatre cours d'eau concernés montre une diversité génétique à l'intérieur de chaque groupe (**tableau 5**) et la matrice de distances génétiques entre populations des différents cours d'eau (**tableau 6**) des différences significatives (sauf entre Dordogne et Garonne) pour les marqueurs chloroplastiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons donc développé les outils permettant une analyse génétique des populations d'angéliques du Sud-ouest de la France pouvant répondre à des questions de structuration génétique spatiale mais aussi des questions de relations phylogéniques entre taxons.

Nous avons montré l'existence d'une diversité génétique dans les populations d'*A. heterocarpa* des différents bassins versants, aussi bien avec les marqueurs microsatellites nucléaires que chloroplastiques.

Cela indique des particularités entre bassins qui pourront être prises en compte pour le plan de gestion.

L'analyse plus complète de ces résultats devrait être conduite dans les prochains mois. Il s'agira de préciser les relations entre populations des différents bassins ainsi qu'entre taxons.

Nous envisageons par ailleurs d'autres approches, basées sur la comparaison des séquences (« Bar coding » : marqueurs chloroplastiques et marqueurs ITS) qui devraient permettre une approche phylogéographique et répondre de façon complémentaire aux questions d'hybridation. Ces approches sont en théorie « universelles » et applicables à d'autres espèces, contrairement à l'utilisation des marqueurs microsatellites nucléaires qui nécessitent une mise au point spécifique. Les mettre au point pour l'étude des angéliques nous permettra de les utiliser pour l'analyse d'autres espèces pour lesquelles se pose la question de l'hybridation ou de l'identification, comme l'œnanthe de Foucaud.

Une étudiante de master 2 se consacrera à ce travail pendant les 6 prochains mois. L'UMR BIOGECO a obtenu une bourse « labex » qui prendra en charge sa gratification.



Personnes impliquées:

- Emmanuelle Revardel, Maître de conférences, Université Bordeaux 1, BIOGECO : **responsable projet** ;
- Anne-Laure Bouillot, Stagiaire BTS Biotechnologie du lycée Saint-Louis de Bordeaux (stage de 6 semaines de mai à juillet 2009, et stage de 9 semaines de décembre à février 2010) et 1 mois en juillet 2010 en main d'œuvre occasionnelle (rémunération sur le contrat Angélique) : **mise au point des marqueurs et géotypage chloroplastique** ;
- Guillaume Lalanne-Tisné, titulaire d'un M2, en main d'œuvre occasionnelle, (rémunération sur le contrat Angélique) : **mise au point des marqueurs, géotypage microsatellites nucléaires** ;
- Sophie Gerber, chargée de recherches INRA, **appui** ;
- Henri Caron, Ingénieur de Recherche INRA : **mise au point des marqueurs, analyse des résultats** ;
- Myriam Harry, Professeur, Université Paris Sud 11, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation (LEGS) : **collaboration pour l'analyse des résultats.**

Références bibliographiques :

- Excoffier L., Laval, et Schneider G., 2005, Arlequin ver. 3.0 : An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, **47-50**
- Gaudeul M. et Till-Bottraud I., 2008, Genetic structure of the endangered perennial plant *Eryngium alpinum* (Apiaceae) in an alpine valley. *Biological Journal of the Linnean Society*. **93**, **667-677**
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., et al., 2011, Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*. **11** , **591-611**
- Pritchard J., Stephens, M. et Donnelly P., 2000, Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. **155** , **945-959**
- Weising K et Gardner R., 1999, A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* **42**, **9-19**



Figures et tableaux :

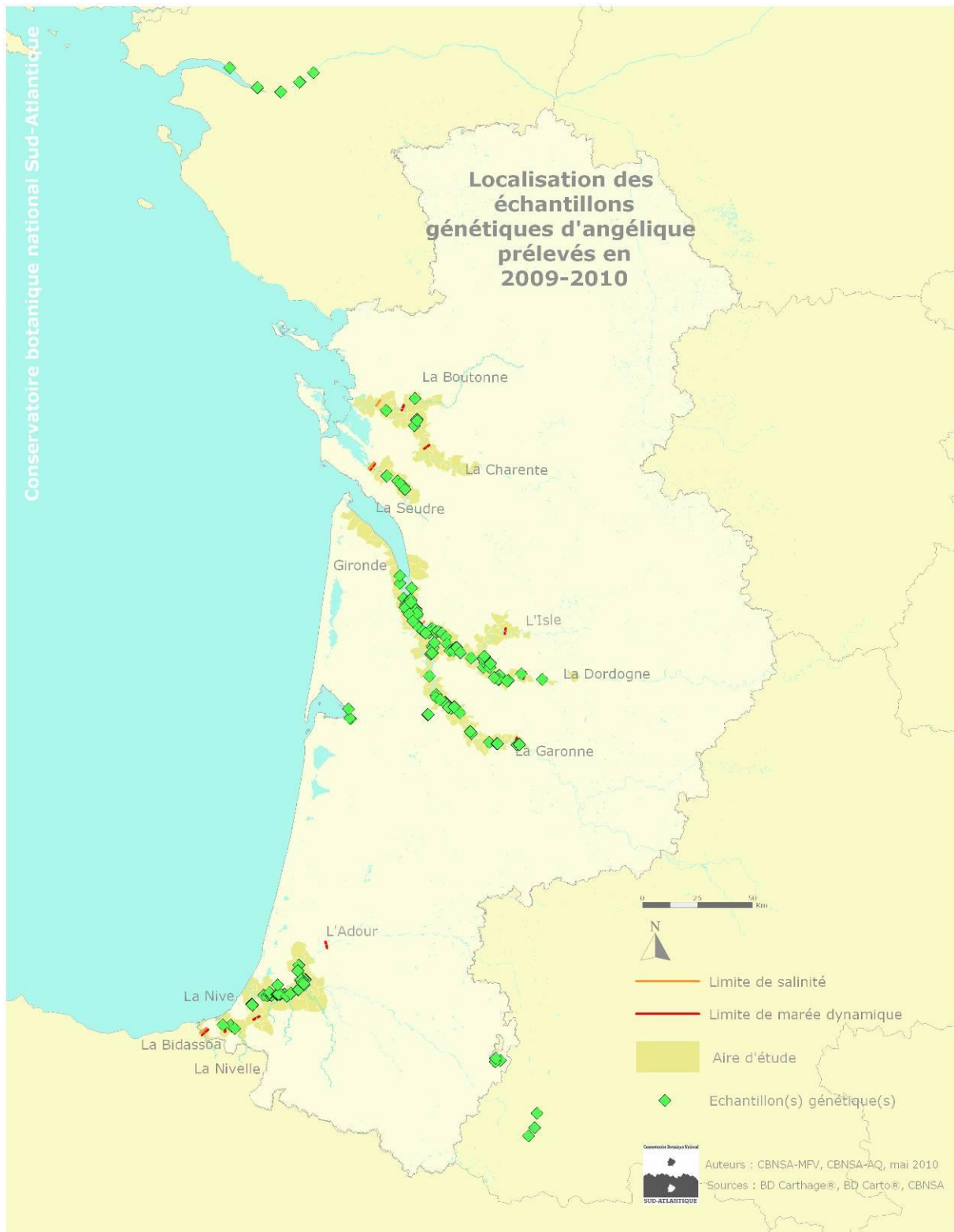


Figure1 : Localisation des échantillons d'angélique prélevés pour l'étude génétique.



| Localisation | cH | cS | H | S | R | cB |
|---------------|----|----|----|----|----|----|
| Garonne | 28 | 34 | 91 | 44 | - | - |
| Dordogne | 60 | 39 | 54 | - | - | - |
| Gironde | 6 | 29 | 45 | 13 | - | - |
| Loire | - | - | 36 | - | - | - |
| Charente | 32 | 10 | 7 | - | - | - |
| Seudre | 1 | 28 | - | - | - | - |
| Adour et Nive | 37 | 94 | 19 | 60 | - | - |
| Pyrénées | - | 6 | - | - | 15 | 12 |

Tableau 1. Nombre d'individus dont le génotype pour les 8 microsatellites nucléaires a été déterminé, en fonction du bassin versant et du taxon attribué lors de l'échantillonnage sur le terrain :
cH : *A. cf heterocarpa*, cS : *A. cf sylvestris*, H : *A. heterocarpa*, S : *A. sylvestris*, R : *A. razulii*, cB : *cf A. sylvestris ssp bernardae*

| Nom du locus | Motif microsatellite dans la séquence | Na | He |
|--------------|---------------------------------------|----|---------|
| An11 | (AG) ₁₀ | 27 | 0.89517 |
| An23 | (AC) ₁₁ | 11 | 0.82245 |
| An35 | (AC) ₁₁ | 11 | 0.74108 |
| An39 | (AG) ₁₀ | 36 | 0.95066 |
| S216 | (AG) ₈ | 7 | 0.61080 |
| An68 | (AG) ₈ | 29 | 0.89455 |
| An69 | (AG) ₈ | 27 | 0.79168 |
| An91 | (AG) ₉ | 8 | 0.61084 |

Tableau 2. Caractéristiques des loci microsatellites nucléaires utilisés pour l'étude des *A. heterocarpa* sur l'ensemble des bassins du Sud-Ouest de la France.
Na : nombre d'allèles sur l'ensemble des individus *A. heterocarpa* testés (225 individus), He : diversité génétique (hétérozygotie attendue) sur l'ensemble des bassins.



| Numéro de l'haplotype | ccmp4 | ccmp5 | ccmp10 | J |
|-----------------------|-------|-------|--------|-----|
| 1 | 153 | 111 | 117 | 217 |
| 2 | 153 | 111 | 118 | 217 |
| 3 | 153 | 112 | 117 | 217 |
| 4 | 153 | 112 | 118 | 217 |
| 5 | 153 | 112 | 116 | 217 |
| 6 | 154 | 110 | 116 | 217 |
| 7 | 154 | 110 | 117 | 217 |
| 8 | 154 | 110 | 120 | 217 |
| 9 | 154 | 110 | 121 | 217 |
| 10 | 154 | 110 | 122 | 217 |
| 11 | 154 | 111 | 116 | 217 |
| 12 | 154 | 111 | 117 | 217 |
| 13 | 154 | 111 | 118 | 217 |
| 14 | 154 | 111 | 119 | 217 |
| 15 | 154 | 111 | 120 | 217 |
| 16 | 154 | 112 | 117 | 217 |
| 17 | 154 | 112 | 117 | 218 |
| 18 | 154 | 112 | 118 | 217 |
| 19 | 155 | 111 | 118 | 217 |

Tableau 3. Haplotypes chloroplastiques obtenus avec les 4 marqueurs chloroplastiques. Les valeurs correspondent aux tailles des fragments amplifiés pour chaque allèle.

| Groupe | Ni | Na | Ho | He |
|----------|-----|------|---------|---------|
| Adour | 19 | 8.6 | 0.65796 | 0.75127 |
| Charente | 7 | 4.4 | 0.59524 | 0.66931 |
| Dordogne | 54 | 13.5 | 0.70893 | 0.79116 |
| Garonne | 91 | 14.5 | 0.68727 | 0.76885 |
| Gironde | 45 | 11.9 | 0.71317 | 0.77252 |
| Loire | 36 | 6.5 | 0.62173 | 0.67077 |
| Moyenne | 42 | 9.9 | 0.66405 | 0.73731 |
| Total | 252 | 19.5 | | 0.78965 |

Tableau 4. Diversité génétique estimée par localisation (bassin versant) pour *Angelica heterocarpa*, pour les huit loci microsattélites nucléaires.

Ni : nombre d'individus testés, Na : nombre d'allèles moyens, Ho : hétérozygotie observée, He : hétérozygotie attendue (Hardy-Weinberg).

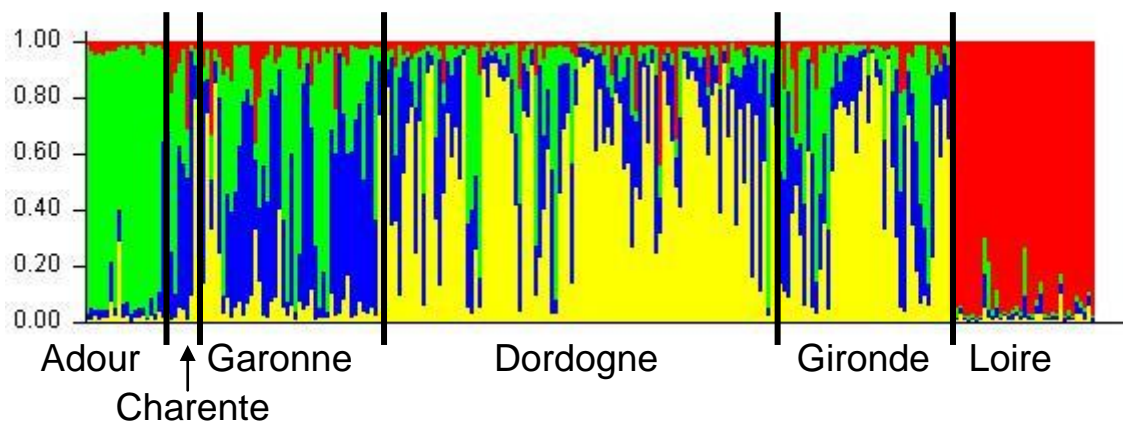


Figure 2. Analyse bayésienne de 257 pieds d'*Angelica heterocarpa* échantillonnés sur les différents bassins indiqués. Chaque plante est représentée par une fine barre verticale divisée en segments de 4 couleurs représentant la probabilité que chaque individu appartienne à un groupe sans *a priori*. (logiciel STRUCTURE, Pritchard et al, 2000)

| Groupe de localisation | Ni | Nh | Numéros d'haplotypes | GD |
|------------------------|----|----|--------------------------|-------------------|
| Dordogne | 19 | 5 | 9, 12, 13, 15, 16 | 0.6374 +/- 0.1045 |
| Garonne | 25 | 7 | 1, 9, 12, 13, 14, 15, 19 | 0.5867 +/- 0.1102 |
| Gironde | 9 | 5 | 2, 12, 13, 15, 18 | 0.8611 +/- 0.0872 |
| Loire | 19 | 5 | 3, 6, 10, 12, 13 | 0.6725 +/- 0.0703 |

Tableau 5. Analyse des haplotypes chloroplastiques de 72 individus typés *Angelica heterocarpa* pour les différentes localisations.

Ni : nombre d'individus, Nh : nombre d'haplotypes, GD : diversité génétique (+/- déviation standard)

| | Dordogne | Garonne | Gironde | Loire |
|----------|----------------|----------------|----------------|---------|
| Dordogne | 0.00000 | | | |
| Garonne | -0.02325 | 0.00000 | | |
| Gironde | 0.13616 | 0.20229 | 0.00000 | |
| Loire | 0.12102 | 0.13244 | 0.13244 | 0.00000 |

Tableau 6. Matrice de distances génétiques (Fst) pour les individus typés *A.heterocarpa* à partir des données des haplotypes chloroplastiques.

En gras : **différences significatives (seuil de 0.05).**



Biodiversité, gènes & communautés

Étude de la diversité génétique du complexe d'espèces du genre *Angelica* en Aquitaine et Poitou-Charentes : Rapport au 11 mars 2012



Rédaction : Emmanuelle Revardel, Université Bordeaux 1

INRA, Université Bordeaux 1, UMR Biogeco
Conservatoire Botanique National Sud-Atlantique
Contrat n° 22000448

Ce rapport complète celui du 29 novembre 2011. Les résultats présentés intègrent l'ensemble des données sur les taxons étudiés, *Angelica heterocarpa*, *A. sylvestris*, *A. razulii* et *A. sylvestris subsp. bernardae* sur tous les bassins versants du Sud-Ouest de la France : Loire, Charente, Gironde, Adour.

Contexte de l'étude

L'angélique des estuaires (*Angelica heterocarpa*) est une espèce protégée, endémique des estuaires du Sud-Ouest de la France, inféodée aux berges soumises à marées dynamiques. Dans certaines zones à proximité des berges, elle cohabite avec l'angélique des bois (*A. sylvestris*), espèce commune, et certains individus présentent des caractères morphologiques intermédiaires entre les deux espèces, posant des problèmes d'identification. Les botanistes ont fait l'hypothèse que des hybridations ou des introgressions pourraient expliquer ces observations. Dans la région de l'Adour, l'hétérogénéité morphologique est plus marquée, et des hybridations avec d'autres angéliques, plus montagnardes, sont suspectées : *A. razulii* et *A. sylvestris subsp. bernardae*.

Dans ce contexte, notre objectif est de caractériser les relations génétiques à l'intérieur du complexe d'espèces du genre *Angelica* et la structuration génétique des populations sur les différents bassins versants du Sud-Ouest de la France, pour répondre aux questions des différences génétiques entre taxons, des corrélations entre différences génétiques et différences écologiques et spatiales.

MATERIEL ET METHODES

Voir le rapport du 29 novembre 2011. Nous exploitons ici les données obtenues avec les marqueurs microsatellites nucléaires que nous avons mis au point, sur les individus échantillonnés sur la totalité de l'aire de répartition du Sud-Ouest de la France et l'ensemble des taxons d'*Angelica*.



RESULTATS

L'analyse des données de géotypage pour les marqueurs microsatellites nucléaires porte sur l'ensemble des individus pour lesquels un géotype a été obtenu (809 sur 890 échantillonnés). Seuls les individus ayant un géotype complet ou une seule donnée manquante sur les huit marqueurs ont été pris en compte. La diversité génétique sur l'ensemble des huit marqueurs et sur l'ensemble des individus est assez élevée (nombre moyen d'allèles par locus = 22.85).

La répartition géographique et taxonomique des échantillons analysés est donnée sur la figure 1. Sont concernés les taxons suivants : *Angelica heterocarpa*, *A. sylvestris*, les confère (notés « *A. cf heterocarpa* » ou « *A. cf sylvestris* » en fonction de leur plus grande ressemblance avec l'un ou l'autre des taxons), *A. razulii* et *A. sylvestris ssp bernardae*.

Nous avons effectué une analyse bayésienne, appropriée pour l'étude d'espèces sympatriques suspectées s'hybrider dans la nature (logiciel STRUCTURE, Pritchard et al, 2000). Cette méthode permet de grouper les individus d'un échantillon au sein de populations génétiquement homogènes sur la base de leur géotype et des fréquences alléliques et d'identifier d'éventuels hybrides. Elle est utilisée sans *a priori*, c'est-à-dire sans utiliser d'indications sur l'origine géographique des individus ni sur leur identification taxonomique. Le nombre de groupes choisi dans le modèle est donné par la valeur K.

Une structuration en bassins versants :

Une approche hiérarchique a été effectuée pour analyser successivement la structure génétique : dans un premier temps, la structure a été étudiée sur l'ensemble du jeu de données pour identifier des groupes homogènes. Les résultats sont représentés figure 2.

A K=2, on observe une différenciation entre les individus des Pyrénées-Adour-Nive-Nivelle toutes espèces confondues et les populations plus au Nord.

A K=3, les populations plus au Nord se différencient, avec d'une part un ensemble homogène des populations de la Loire, Charente, Seudre et d'autre part un groupe plus hétérogène pour le bassin de la Gironde au sens large.

A K= 4, la population de la Charente se différencie et les groupes Adour et Loire restent robustes.

A K=5, la population de la Seudre se différencie en groupe homogène et le groupe du bassin de la Gironde (Garonne, Dordogne, Gironde et populations hors berge de Saucats et Biscarosse) reste très hétérogène. Les populations de la Dordogne se distinguent très légèrement de celles de la Garonne et de la Gironde.

En conclusion, il existe une structuration génétique entre bassins versants, avec une différenciation forte entre les populations Adour-Pyrénées et celles des bassins plus au Nord, pour lesquels il existe aussi une différenciation entre les bassins de la Loire, de la Charente, de la Seudre, et de l'ensemble Gironde-Dordogne-Garonne. Pour le bassin Gironde-Dordogne-Garonne, la structure est hétérogène, pouvant être interprétée comme résultant de flux de gènes avec les autres bassins, ou de sous-structures très locales (par exemple quelques allèles privés pour ds individus typés *A. heterocarpa* du bassin de la Dordogne pour les sites de Libourne, Genissac, Vayres et Brannes).

Absence de structure entre taxons :

Dans un second temps, nous avons analysé la sous-structure pour deux groupes homogènes constitués de plusieurs taxons : les groupes de l'Adour-Pyrénées et de la Charente. Pour les autres groupes, nous n'avons pas pu réaliser cette étude car pour Loire, l'échantillonnage est composé uniquement d'*A. heterocarpa*, pour la Seudre uniquement des *A. cf sylvestris*, et le bassin de la Gironde est très hétérogène.

Le groupe « Adour-Pyrénées » est constitué des 4 taxons *A. heterocarpa*, *A. sylvestris*, *A. razulii* et *A. sylvestris ssp bernardae* et des individus classés « confère ». L'analyse (figure 3) révèle l'absence de sous-structure sur l'ensemble des taxons de l'aire bassin de l'Adour-Pyrénées : dans aucun cas nous ne pouvons distinguer les taxons sur la base de leur structure multilocus.

Le groupe « Charente » comporte des *A. heterocarpa*, des *A. cf heterocarpa* et des *A. sylvestris*. L'analyse (figure 4) révèle là aussi l'absence de sous-structure sur l'ensemble des taxons du bassin de la Charente.

L'analyse dans le bassin de la Gironde est plus complexe du fait de l'hétérogénéité, mais ne semble pas non plus, dans une première analyse, faire apparaître de différences génétiques entre *A. heterocarpa* et *A. sylvestris*.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos résultats indiquent une **structuration géographique selon les bassins versants**, qui peuvent ainsi être considérés comme des **unités de conservation indépendantes**.

Par contre, nous n'observons **pas de différenciation entre les différents taxons** du genre *Angelica*, ce qui permet de les considérer comme un complexe d'espèces qui échangent des gènes. L'absence de structure observée entre taxons, étonnante dans un premier temps, ne veut pas dire que ces taxons ne sont pas de « bonnes espèces ». Les différences taxonomiques existent sur un plan morphologique et semblent correspondre à des adaptations locales aux environnements de berges pour *A. heterocarpa*. Une hypothèse est que ces différences soient dues à des gènes majeurs soumis à sélection, qui représentent une toute petite partie du génome alors que la plupart du génome est soumis à flux de gènes (comme les marqueurs neutres que nous avons utilisés) (Wu and Ting, 2004). Récemment, quelques cas de différences taxonomiques sans différenciation génétique sur les marqueurs neutres ont été mis en évidence pour des espèces sympatriques (Ochieng, *et al.*, 2010). Il s'agit probablement de cas en dynamique de spéciation sympatrique. En termes de protection, il serait donc probablement judicieux de préserver un continuum de milieu pour préserver cette dynamique évolutive.

L'analyse de ces résultats devrait être poursuivie dans les prochains mois. Nous travaillons actuellement à l'obtention de séquences d'ADN (marqueurs chloroplastiques et marqueurs nucléaires ITS) pour l'obtention de données phylogéographiques et répondre de façon complémentaire aux relations entre espèces. Les données écologiques pourront aussi être prises en compte.

Références bibliographiques :

Pritchard J., Stephens, M. et Donnelly P., 2000, *Genetics*. **155** , **945-959**

Ochieng J.W. *et al.*, 2010, Two sympatric spotted gum species are molecularly homogeneous. *Conservation Genetics*, **11(1)**, **45-56**

Wu C.I. and Ting C.T., 2004, Genes and speciation, *Nature Reviews Genetics* **5**, **114-122**

Figures :

Voir fichier figures en annexe



Figures :

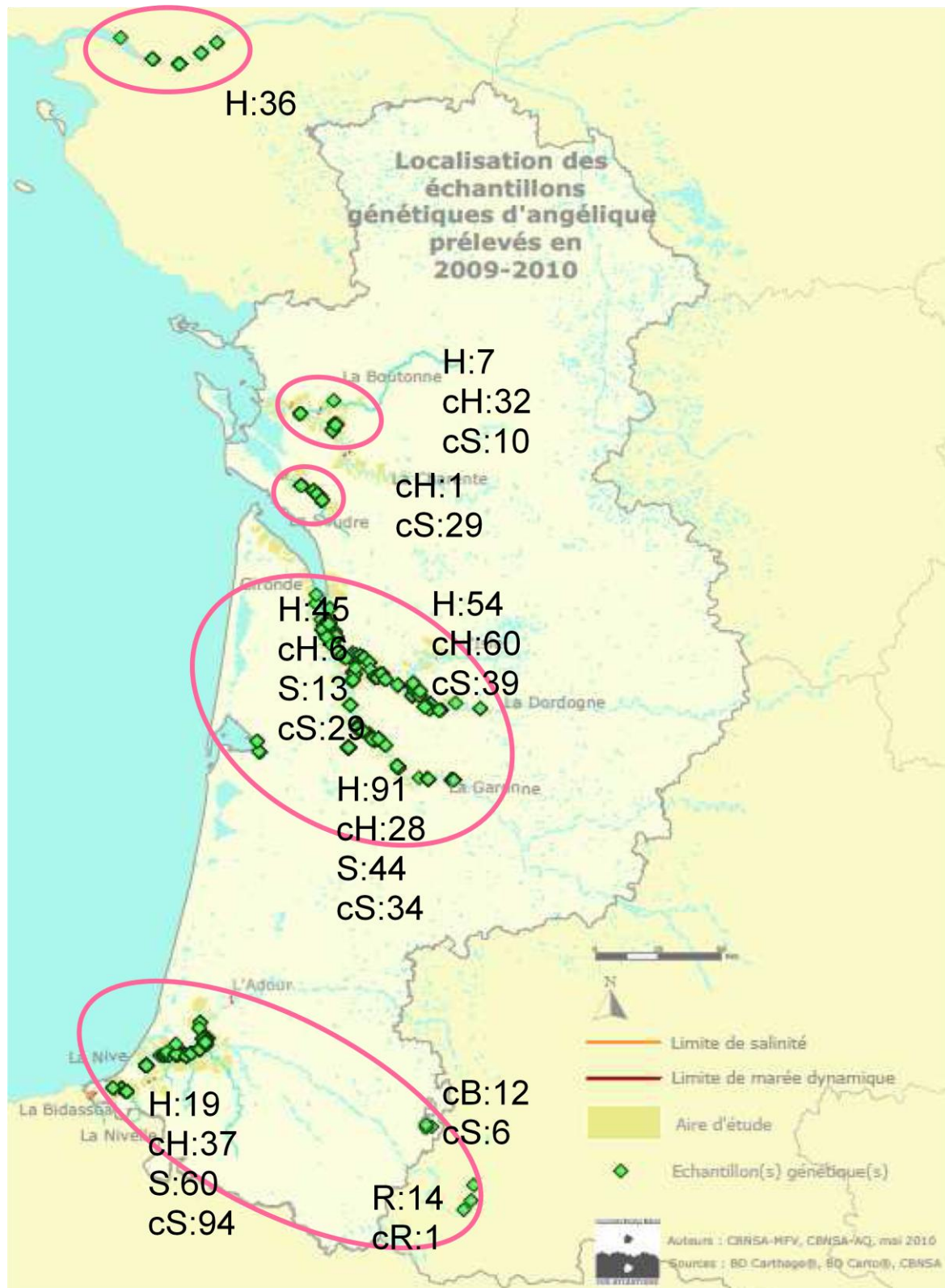


Figure 1. Répartition des échantillons analysés pour les marqueurs microsatellites nucléaires. Pour chaque bassin ou localité, les effectifs des différents taxons sont donnés avec l'abréviation indiquée dans l'encadré.



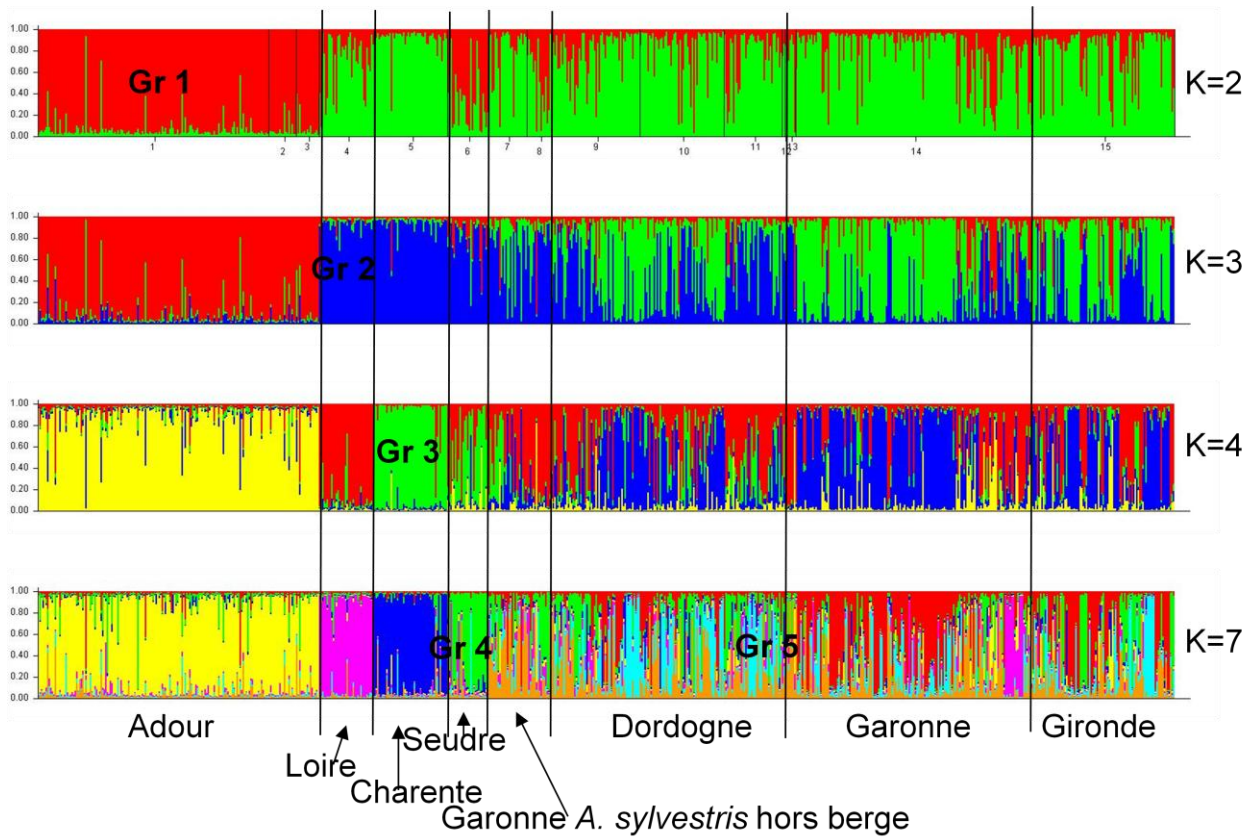


Figure 2. Structure des populations de l'ensemble des angéliques : Analyse bayésienne des données microsatellites nucléaires pour l'ensemble des pieds d'angéliques échantillonnés sur les différents bassins versants du Sud-Ouest de la France. Chaque individu est représenté par une fine barre verticale divisée en K segments de couleurs représentant la probabilité que chaque individu appartienne à un groupe sans *a priori*. Les assignements dans les différents groupes sont donnés pour des valeurs de K consécutives de K = 2 à K = 7, K étant le nombre de groupes imposé au logiciel (STRUCTURE, Pritchard et al, 2000).



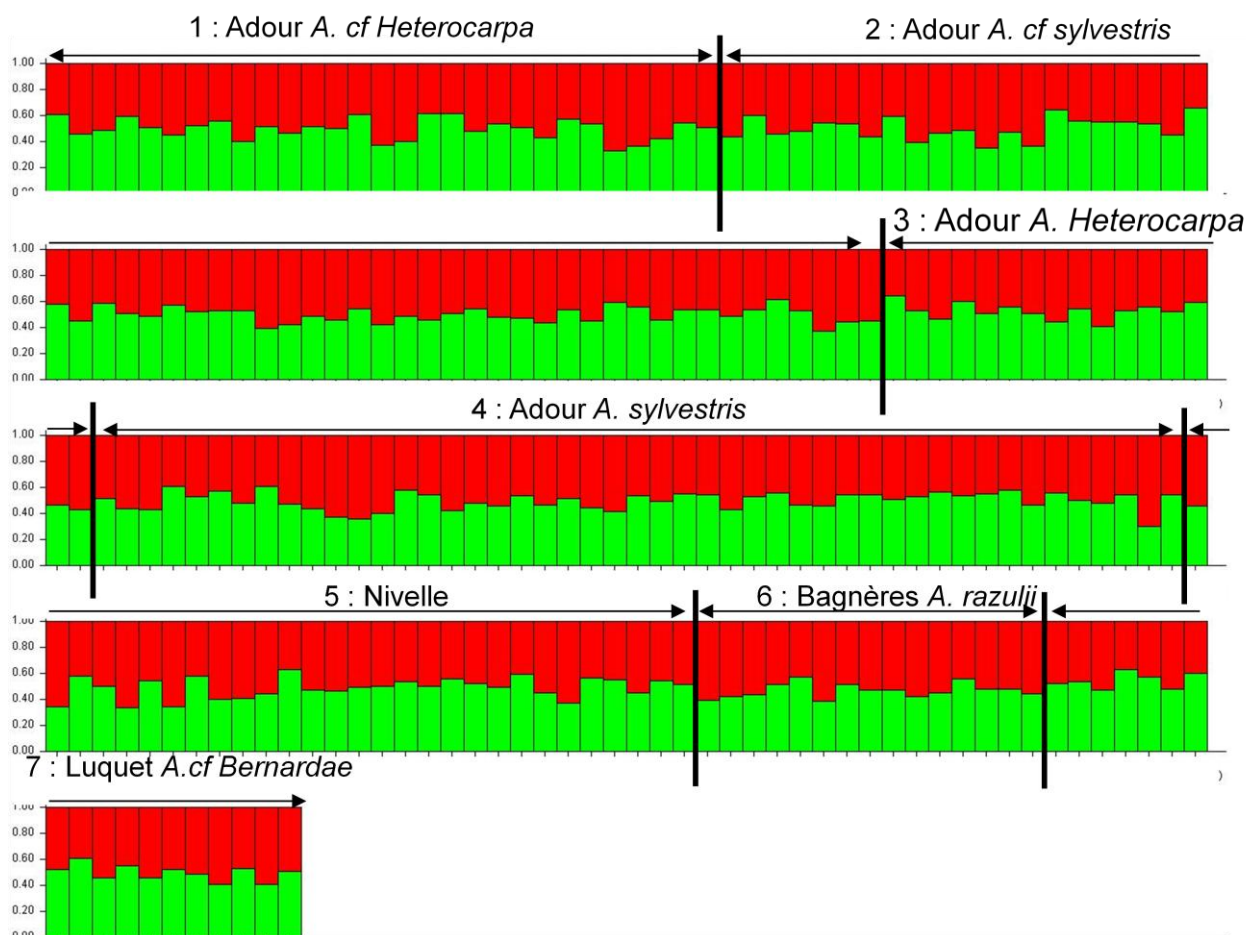


Figure 3. Sous-structure des populations sur le bassin de l'Adour et Pyrénées : Analyse bayésienne des données microsatellites nucléaires pour l'ensemble des pieds d'angéliques échantillonnés sur le bassin de l'Adour et les Pyrénées, à $K=2$. Chaque individu est représenté par une barre verticale divisée en segments de 2 couleurs représentant la probabilité que chaque individu appartienne à un groupe sans *a priori*.

1 : Adour *A. cf heterocarpa*, 2 : Adour *A. cf sylvestris*, 3 : Adour *A. heterocarpa*, 4 : Adour *A. sylvestris*, 5 : Nivelle (24 individus *A. cf sylvestris*, 4 *A. sylvestris*, 1 *A. cf heterocarpa*), 6 : Bagnères *A. razulii* (dont 1 *A. cf razulii*), 7 : Luquet *A. sylvestris cf ssp bernardae*.



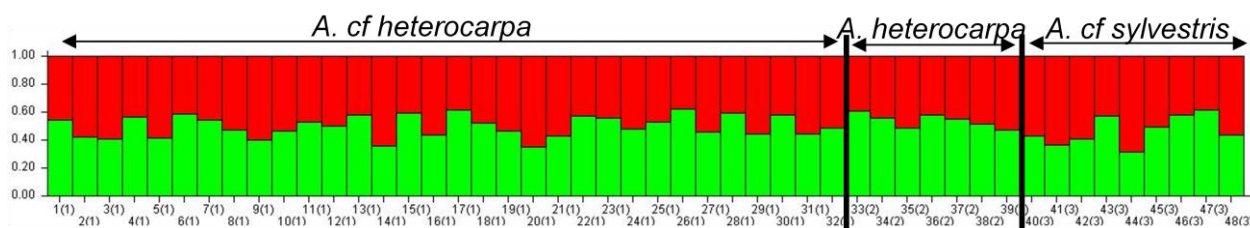


Figure 4. Sous-structure des populations sur le bassin de la Charente : Analyse bayésienne des données microsatellites nucléaires pour l'ensemble des pieds d'angéliques échantillonnés sur le bassin de la Charente, à $K=2$. Chaque individu est représenté par une barre verticale divisée en segments de 2 couleurs représentant la probabilité que chaque individu appartienne à un groupe sans *a priori*.

Erratum :

Dans le rapport du 29 novembre 2011, pour la figure 2, les légendes « Garonne » et « Dordogne » sont inversées. Cela ne change pas l'interprétation globale. Remplacer par la figure ci-dessous :

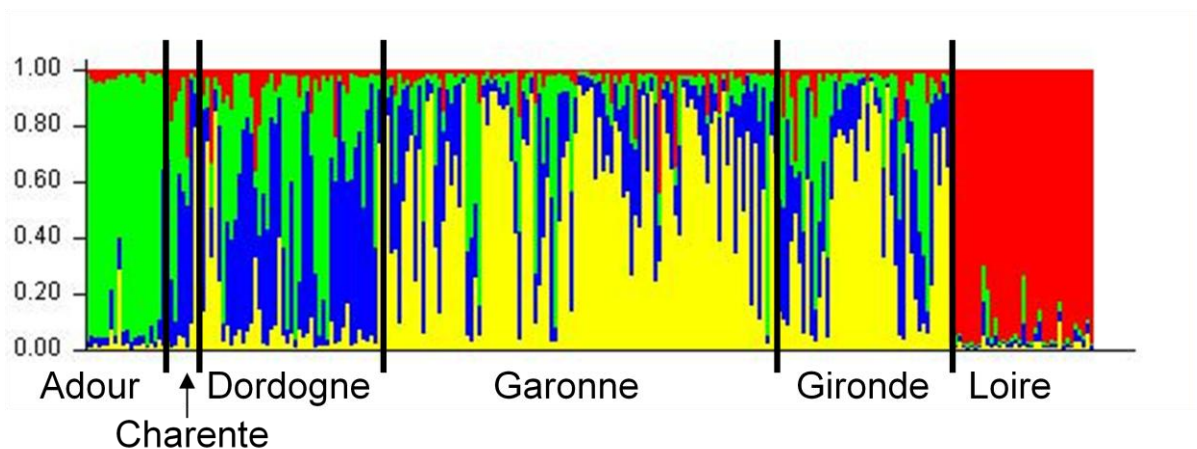


Figure 2. Analyse bayésienne de 257 pieds d'*Angelica heterocarpa* échantillonnés sur les différents bassins indiqués. Chaque plante est représentée par une fine barre verticale divisée en segments de 4 couleurs représentant la probabilité que chaque individu appartienne à un groupe sans *a priori* (logiciel STRUCTURE, Pritchard et al, 2000).

