



HAL
open science

Étude comparée de la structuration génétique des chênes à l'échelle d'un paysage

Olivier Lepais

► **To cite this version:**

Olivier Lepais. Étude comparée de la structuration génétique des chênes à l'échelle d'un paysage. [Stage] Université des Sciences et Technologies (Bordeaux 1), Talence, FRA.; Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2), Bordeaux, FRA. 2004, 23 p. hal-02832233

HAL Id: hal-02832233

<https://hal.inrae.fr/hal-02832233>

Submitted on 7 Jun 2020

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

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



Université Bordeaux I / Bordeaux II
Année universitaire 2003-2004

Rapport de stage présenté pour l'obtention du
Master Recherche Génétique et Développement des Plantes

Étude comparée de la structuration génétique des chênes à l'échelle d'un paysage.

Présenté le 11 juin 2004 par
Olivier LEPAIS

Responsable de stage :
Sophie GERBER

Institut National de la Recherche Agronomique
INRA Bordeaux - Aquitaine
UMR Biologie, Gènes et Écosystèmes
Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres
Forestiers
69, route d'Arcachon
33612 Cestas Cedex



Sommaire

Étude comparée de la structuration génétique des chênes à l'échelle d'un paysage.

Sommaire.....	2
Introduction.....	5
Matériels et méthodes.....	8
Echantillonnage.....	8
Extraction d'ADN.....	8
PCR-RFLP ADN chloroplastique.....	8
Microsatellites nucléaires.....	9
Résultats.....	10
Haplotypage de l'ADN chloroplastique.....	10
Microsatellites nucléaires.....	11
Comparaison interspécifique.....	12
Fréquences alléliques.....	12
Diversité génétique.....	14
Différenciation interspécifique.....	14
Comparaison des différenciations entre espèces.....	15
Analyse factorielle des correspondances.....	16
Différenciation inter-bois.....	16
Structuration génétique.....	17
Discussion.....	18
Répartition des variants chloroplastiques.....	18
Microsatellites nucléaires.....	19
Données écologiques.....	20
Différenciation interspécifique.....	20
Structuration génétique.....	20
Conclusion.....	21
Bibliographie.....	22

Résumé

Une grande partie des forêts européennes est dominée par les chênes (genre *Quercus*). Ces espèces ont longtemps été étudiées d'un point de vue taxonomique et écologique. Récemment, l'étude du polymorphisme de l'ADN chloroplastique a permis de mieux comprendre la taxonomie du genre ainsi que l'histoire de la recolonisation postglaciaire de ces espèces. Des flux de gènes intenses entre espèces ont été mis en évidence grâce au développement de marqueurs nucléaires très polymorphes (microsatellites). Cette caractéristique des chênes à s'hybrider entre espèces a conduit à les considérer comme appartenant à un complexe d'espèces. La zone étudiée ici est située dans le canton d'Aurignac (Haute Garonne). Elle se distingue par son étendue relativement restreinte (échelle du paysage), sa composition en espèce (trois espèces de chênes représentés : chênes pédonculés, sessile et pubescent) et la structuration fragmentée de ces peuplements forestiers. L'analyse du polymorphisme de l'ADN chloroplastique indique la fixation d'un variant chloroplastique à l'échelle du paysage malgré la diversité relativement forte de ce type de marqueur à l'échelle régionale. De plus, la structuration géographique des haplotypes correspond aux traces laissées par la recolonisation postglaciaire. Les massifs forestiers ont donc été régénérés naturellement ou par plantation de graines locales. La gestion en taillis sous futaie caractérisée par une multiplication asexuée peut avoir stabilisé la structuration géographique des haplotypes. Deux locus microsatellites connus pour différencier les chênes sessile et pédonculé ont été analysés au sein des populations. Ces locus discriminent le chêne pubescent ce qui indique que des processus communs discriminent les trois espèces. Un troisième locus ne présente pas de différenciation interspécifique. La structuration géographique de ces locus correspond à la répartition des espèces au sein du paysage. Les analyses de structuration intraspécifique montrent l'absence de phénomène d'isolement par la distance, résultat expliqué par le flux de pollen intense et à longue distance chez les chênes.

Mots-clefs : *Quercus*, ADN chloroplastique, microsatellites, différenciation génétique interspécifique.

Abstract

Most European forests are dominated by oaks (genus *Quercus*). These species have been studied for a long time for taxonomic and ecological issues. Recently, studies of chloroplast DNA polymorphism made it possible to better understand the taxonomy of the genus and the story of the postglacial colonisation of these species. Intensive gene flow between species was highlighted thanks to the use of highly polymorphic nuclear markers (microsatellites). Since most white oak species are hybridising, they are considered as part of a species complex. The studied area is located close to Aurignac (Haute Garonne). It is characterised by its relatively restricted extent, its species composition (three oak species are present: pedunculate, sessile and pubescent oaks) and the fragmented structure of these forests. Analysis of chloroplast DNA polymorphism shows the fixation of one single haplotype at the local level, despite the relatively strong diversity observed at the regional scale. Moreover, the geographical structure of haplotypes corresponds to the postglacial colonisation process. The forests were thus likely regenerated naturally or by local seed plantation. Management in coppice is characterised by an asexual multiplication and may have stabilised the geographical structure of haplotypes. Two microsatellite loci known to differentiate sessile and pedunculate oaks were analysed within these populations. These loci discriminate also pubescent oaks, indicating that common processes are acting to maintain the three species. A third locus does not differentiate the three species. The geographic structure of the three loci corresponds to the distribution of species within the landscape. Analyses of intra-specific structure show an absence of isolation by distance, due to intensive and long distance pollen flow in oaks.

Keywords : *Quercus*, chloroplast DNA, microsatellites, interspecific genetic differentiation.

Remerciements

Je remercie Antoine Kremer de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Merci à Sophie Gerber qui a su me guider tout au long de mon stage et m'accompagner de l'échantillonnage au laboratoire, de la lecture d'articles à l'écriture de ce rapport.

Grand merci à Maya Gonzalez pour l'échantillonnage des chênes autour d'Aurignac et les multiples informations tant écologiques qu'historiques.

Je remercie Rémy Petit pour avoir partagé ses connaissances « cytoplasmiques » et son aide pour la construction de la carte des haplotypes.

Je tiens à remercier Sabine Dumas qui m'a appris les différentes étapes de la PCR-RFLP ainsi que toutes les personnes qui m'ont apporté une aide technique lors des manip, du traitement des données ou qui m'ont tout simplement fait partager leurs connaissances : Marie-Hélène Pemonge, Christian Burban, Guy Roussel, Manuella Casasoli, Jean Marc Louvet, Alexis Ducouso, Carlos Magni, Jeff, David Chagné, Fabiano Salgueiro.

Merci à Manuella pour l'expérience SSCP, à Iria pour l'expérience DGGE ;-), et finalement à Rémy pour m'avoir fait comprendre que la recherche de polymorphisme, ce n'était pas si simple... Décidemment, parfois l'ADN chloroplastique n'est pas très polymorphe !

Enfin merci à tous les pierrotonnais, dans les labos comme dans les bureaux, qui font de cet endroit un lieu de travail stimulant, convivial et humain.

Étude comparée de la structuration génétique des chênes à l'échelle d'un paysage.

Introduction

Des chênes...

Les chênes (genre *Quercus*) appartiennent à la famille des Fagacées et sont représentés par plusieurs centaines d'espèces réparties dans tout l'hémisphère nord. Ils constituent une part importante des peuplements forestiers en Europe et plus particulièrement dans la zone tempérée. Quatre espèces y prédominent : *Quercus robur* (chêne pédonculé), *Q. petraea* (chêne sessile), *Q. pubescens* (chêne pubescent) et *Q. pyrenaica* (chêne tauzin). Chaque espèce possède ses propres exigences vis-à-vis des caractéristiques écologiques du milieu. Ainsi, il est fréquent de rencontrer des chênes de façon continue sur une zone très contrastée du point de vue écologique : le chêne pédonculé dans les zones humides, le chêne pubescent dans les zones sèches... La présence des différentes espèces est aussi dépendante de la dynamique forestière. Les chênes pédonculés et pubescents sont des arbres post-pionniers qui ont de bonnes capacités pour coloniser de nouveau milieu en déprise car ils aiment bien les milieux éclairés et ont une dissémination des glands favorisée par le geai des chênes (Ducouso et coll., 1994). A l'inverse, le chêne sessile est connu pour succéder aux chênes pédonculés dans les peuplements forestiers plus âgés notamment en raison de sa préférence pour les milieux moins éclairés et franchement forestiers. Malgré ces caractéristiques écologiques différentes, le chêne pédonculé et le chêne sessile sont sympatriques à l'échelle de l'aire de répartition et coexistent au sein de forêts mixtes. De plus, une des particularités de ces espèces est d'être interfertile en condition naturelle (Kleinschmit et Kleinschmit, 2000), l'hybridation donnant à priori des chênes de morphologie intermédiaire ce qui pose de nombreux problèmes de détermination.

Lors de la dernière glaciation, les chênes se sont retirés dans trois zones refuges situées au sud du continent européen (péninsules ibérique, italienne et balkanique) et y sont restés séparés pendant 100000 ans. L'expansion des chênes en Europe s'est produite à la fin de la dernière glaciation, il y a environ 12000 ans. Cette colonisation s'est effectuée en quelques milliers d'années seulement et l'aire de répartition actuelle a été atteinte il y a 6000 ans ce qui représente une vitesse de recolonisation moyenne d'environ 400 mètres par an (Petit et coll., 1997). Parallèlement, la déforestation a commencé avec l'apparition de l'agriculture au Néolithique (il y a 10000 ans) et la surface boisée en France a été considérablement réduite à l'époque romaine et au Moyen Age. Néanmoins, depuis la fin du XVIII^{ème} siècle, la surface forestière française augmente sous l'effet de la déprise agricole en raison des gains de productivité et de la revalorisation de la forêt.

Les chênes sont des espèces familières pour les hommes de par leur abondance en forêt tempérée. Plus qu'une simple cohabitation, les exemples d'utilisation des chênes par les hommes sont nombreux au cours de l'histoire. De nos jours, l'homme gère les chênaies en fonction de ses besoins : des futaies de chêne sessile pour le bois d'œuvre, au taillis sous futaie mixte pour le bois de chauffage. Des modes de gestions moins classiques sont fréquents notamment dans les petites forêts nombreuses qui constituent un élément courant du paysage de nos campagnes, car outre la production de bois proprement dite, la forêt est appréciée pour les activités diverses qu'elle permet grâce à sa riche biodiversité (chasse, cueillette, tourisme vert...). Dans le cadre de la gestion forestière, le statut taxonomique des chênes est une information importante. Les espèces ayant des préférences écologiques contrastées, il est possible d'éviter l'utilisation de graines non adaptées aux conditions du milieu ce qui requiert des critères fiables de détermination taxonomique (Muir et coll., 2000).

... de la génétique...

Depuis quelques années, de nombreuses études de la diversité chez les chênes ont été menées grâce à différents marqueurs génétiques neutres nucléaires et cytoplasmiques.

A l'échelle de l'aire de répartition, les marqueurs nucléaires révèlent une forte variabilité entre individus d'une même population mais une faible différenciation entre populations (Kremer et coll., 1993 ; Degen et coll., 1999). Des recherches de paternité effectuées à l'échelle d'une parcelle (Streiff et coll., 1999) ont permis d'estimer la distance de dispersion du pollen et ont démontré un flux de pollen important.

Le génome chloroplastique représente un outils original pour étudier les populations car il est transmis maternellement et de façon clonale (très faible taux de mutation et absence de recombinaison) (Petit et coll., 1997). Ainsi, il a longtemps été utilisé uniquement dans des analyses phylogénétiques interspécifiques, n'étant pas considéré comme assez variable pour étudier des relations génétiques entre individus appartenant à la même espèce. L'étude de l'ADN chloroplastique, dont la transmission exclusivement maternelle chez les chênes a été vérifiée par croisements contrôlés (Dumolin et coll., 1995), permet de retracer la dispersion des graines au cours du temps. A l'échelle de l'Europe, l'analyse de régions intergéniques relativement variables permet d'observer une forte différenciation interpopulation mais une faible diversité à l'échelle de l'aire de répartition (Petit et coll., 1993). Des études phylogéographiques ont montré que plusieurs haplotypes regroupés en lignée, selon le nombre de mutations séparant chaque haplotype, proviennent d'un même refuge glaciaire (Dumolin-Lapègue et coll., 1997 ; Petit et coll., 2002a). Le résultat le plus frappant est la forte structuration géographique observée qui, avec l'aide de données paléopalynologiques, permet de reconstituer les voies de recolonisation postglaciaires (Petit et coll., 2002b). Des études à une échelle régionale mettent en évidence de façon nette une fixation d'un haplotype au sein de chaque population qui témoigne du mécanisme de migration des graines au cours de la colonisation (Petit et coll., 1997 ; Le Corre et coll., 1997). A l'échelle de la parcelle, l'utilisation de ce type de marqueur a permis de mettre en évidence des plantations de glands d'origine non locale au sein de populations autochtones (forêt de Fontainebleau). La mise au point d'une technique d'extraction de l'ADN du bois a ouvert la voie à des applications en terme de test de l'origine des bois utilisés en tonnellerie et d'études archéologiques (Deguilloux et coll., 2003).

L'absence de différenciation locale entre espèces pour les marqueurs à hérédité maternelle ainsi que la synthèse de nombreuses études portant sur les flux de gènes interspécifiques chez les chênes a permis la construction d'un modèle d'invasion du chêne pédonculé par le chêne sessile (Petit, 2003). L'hybridation entre ces deux espèces serait préférentiellement unidirectionnelle et les hybrides subiraient une introgression de par leur plus grande réceptivité au pollen du chêne sessile (Bacilieri et coll., 1996). Ce mécanisme permettrait au chêne sessile de se propager rapidement grâce à son pollen en utilisant le chêne pédonculé comme "vecteur" sur des territoires déjà colonisés par cette espèce (post-pionnière).

Bien que la différenciation interspécifique cytoplasmique et nucléaire soit faible à l'échelle des populations (Kremer et Petit, 1993), de nombreuses études sur les différences génétiques entre espèces ont été entreprises. Le phénotype des espèces est apparu nettement plus différencié que ce qu'indique la génétique car seuls quelques marqueurs montrent une différence interspécifique (AFLP, Coart et coll., 2002 ; SCAR, Bodénès et coll., 1997 ; isozyme, Gömöry et coll., 2001 ; microsatellites, Muir et coll., 2000). Néanmoins, aucun marqueur spécifique des espèces n'a été trouvé, et seules les fréquences alléliques permettent de les différencier. Une détection de QTLs (Quantitative Trait Loci) liés aux caractères morphologiques des feuilles différenciant le chêne pédonculé et sessile a mis en évidence des régions polygéniques réparties sur l'ensemble du génome impliquées dans la différence de morphologie foliaire (Saintagne et coll., 2004). Les marqueurs

généétiques qui colocalisent avec ces QTLs doivent pouvoir être utilisés en populations naturelles pour discriminer les deux espèces.

...dans un paysages.

Les principales conséquences de l'occupation humaine des terres sont la destruction d'habitats d'une part et la fragmentation des milieux naturels d'autres part. La perte de connectivité entre fragments forestiers a des conséquences importantes pour la survie de nombreuses espèces liées à ces milieux. Un effet direct de la fragmentation des forêts est l'augmentation des lisières et donc une diminution des milieux forestiers proprement dit. Une des conséquences de la fragmentation des massifs pour les chênes est la diversification des conditions du milieu conduisant à favoriser la diversité spécifique. En outre, les petites forêts sont plus ouvertes sur l'extérieur et donc plus sensibles aux espèces invasives et aux changements des conditions du milieu ou climatiques.

La plupart des études de génétiques des peuplements de chênes ont été menées dans des forêts continues principalement gérées en futaie régulière. Le paysage des milieux ruraux où se pratique la polyculture, ou des espaces périurbains, est souvent constitué de petites forêts et bois privés dont la gestion est généralement irrégulière (taillis sous futaie voire taillis simple). Ce type de peuplement forestier n'a pas encore été analysé d'un point de vue génétique.

On se propose d'étudier la diversité génétique des chênes au sein de telles populations fragmentées dans un site atelier situé à proximité d'Aurignac (grande région toulousaine) où des études en écologie du paysage sont menées notamment sur les interactions agriculture – forêt et sur la diversité potentielle des milieux naturels. Le paysage de polyculture est composé de coteaux et de vallées étroites (bassin versant de la Nère) et la surface boisée représente environ 12% du territoire sous forme de petites forêts et de bosquets. La zone d'étude couvre 8000 ha et englobe la forêt de Fabas au nord et la forêt de Mauboussin au sud et comprend de nombreux îlots forestiers de taille variable. La composition spécifique est originale puisque trois espèces du genre *Quercus* cohabitent : le chêne pédonculé, sessile et pubescent. Leur répartition dépend essentiellement des conditions écologiques locales et de l'histoire des massifs forestiers.

L'objectif de ce travail est d'étudier de façon comparative la structuration génétique de trois espèces de chênes (chêne pédonculé, chêne sessile et chêne pubescent) situés dans un paysage où les peuplements forestiers sont fragmentés. La première approche consiste à analyser l'ADN chloroplastique afin de définir les différents haplotypes présents au sein de la zone d'étude (échantillonnage local) et au-delà (échantillonnage régional). Une cartographie faisant apparaître la localisation des haplotypes donnera des indications quant à la nature des flux de graines. Une seconde analyse utilisant des marqueurs nucléaires microsatellites connus pour différencier le chêne pédonculé et le chêne sessile (Saintagne et coll., 2004 ; Scotti-Saintagne et coll., sous presse) va permettre de calculer la diversité génétique au sein des bois de l'échantillonnage local. Enfin, le pouvoir discriminant de ces marqueurs pour le chêne pédonculé et le chêne sessile sera vérifié et sera testé pour le chêne pubescent, ce qui n'a jamais été fait.

Matériels et méthodes

Echantillonnage

La zone d'étude est située au sud-ouest de Toulouse et s'étend d'une ligne Toulouse – Auch au nord jusqu'aux Pyrénées au sud.

Dans le canton d'Aurignac (bassin versant de la Nère), 254 chênes (120 *Quercus robur*, 67 *Q. petraea* et 67 *Q. pubescens*) ont été échantillonnés sur une étendue d'environ 8000 ha. Un point d'échantillonnage a été effectué suivant une maille de 500 mètres lorsque cela était possible et des feuilles des trois chênes ont été récoltées à chaque point dans un rayon de 50 mètres.

Au niveau régional, l'échantillonnage a été effectué dans une zone de 60 km de diamètre centrée sur Aurignac pour un total de 66 chênes échantillonnés (feuilles ou bourgeons – 26 *Q. robur*, 22 *Q. petraea* et 18 *Q. pubescens*) en 22 points d'échantillonnages espacés d'environ 10 kilomètres.

Extraction d'ADN

L'ADN total a été extrait à partir de feuilles ou de bourgeons. Le matériel végétal frais (1 cm² de feuille ou 3 à 5 bourgeons) est placé dans un tube Eppendorf de 2 mL numéroté. Chaque échantillon est broyé au moyen d'un vibrobroyeur en présence de 100µL de tampon d'extraction (CTAB 20g.L⁻¹ ; EDTA 0,02M ; Tris HCl 0,1M ; NaCl 1,4M ; PVP soluble 10g.L⁻¹ ; DTT 7,5 g.L⁻¹), une pincée d'alumine et de PVP insoluble ainsi d'une bille de titane. Après 2 minutes de broyage mécanique à 30 vibrations par seconde, chaque tube reçoit 900µL de tampon d'extraction et est placé une heure dans l'étuve à 55°C provoquant la lyse des cellules et le complexe des polysaccharides. Un rajout de 400µL de dichlorométhane par échantillon permet une déprotéinisation. Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 13000 rpm et le surnageant est transféré dans de nouveaux tubes Eppendorf 1,5 mL numérotés. Après avoir rajouté 400 µL d'isopropanol froid, les échantillons sont stockés au moins une heure à -20°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 13000 rpm, le culot conservé subit un second rinçage avec 1 mL d'éthanol 76%. Après une dernière étape de centrifugation, les culots d'ADN sont séchés et resuspendus dans 100µL d'eau distillée et les solutions stock sont conservées à -20°C. La concentration de l'ADN extrait est estimée par migration sur gel d'agarose 1% en présence de témoins dont la concentration d'ADN est connue et les solutions de travail à environ 3ng.µL⁻¹ d'ADN sont réalisés dans des plaques ELISA 96 puits.

PCR-RFLP ADN chloroplastique

Pour chaque individu quatre régions intergéniques de l'ADN chloroplastique sont étudiées. Quatre paires d'amorces universelles (DT, TF, AS et clpp-psbB) développées à partir de la séquence du génome chloroplastique disponible notamment chez le tabac (*Nicotiana tabaccum*) sont utilisées (voir tableau 1). Les amorces sont toutes localisées dans la région large simple copie du génome chloroplastique connue pour être relativement variable. Les paires d'amorces DT, TF et AS ont été choisies car elles permettent d'identifier l'ensemble des haplotypes présents en France (Petit et coll., 2002a) alors que la paire d'amorce clpp-psbB est susceptible de pouvoir subdiviser l'haplotype 10 d'origine ibérique, très fréquent dans le sud-ouest (S. Dumas, communication personnelle).

L'amplification PCR est menée à partir de 15 ng d'ADN génomique dans un milieu réactionnel de 25µL contenant 2,5µL de tampon 10X Eurogentec, 100µM de chaque dNTP, 1,8mM de MgCl₂, 5µg de BSA, 0,192µM de chaque amorce (sauf pour clpp-psbB à 0,384µM par amorce) et 0,2u de Taq polymérase (Goldstar – Eurogentec). Le thermocycleur RoboCycler Gradient 96 (Stratagene) est programmé comme suit : un cycle de dénaturation initiale à 94°C pendant 1 minute, 30 à 40 cycles (en fonction de la paire d'amorce considérée) d'amplification comprenant une minute de dénaturation à 94°C, une minute d'hybridation à la température spécifique au couple d'amorces

considéré (voir Tm tableau 1), une étape d'élongation à 72°C à raison de 1 minute par kb à amplifier (soit 2 minutes pour DT et TF, 3 minutes pour clpp-psbB et 4 minutes pour AS – voir tableau 1). Après un cycle d'élongation terminale de 10 minutes à 72°C, les échantillons sont conservés à 4°C avant de vérifier que l'amplification a fonctionné par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Tris HCl 44,5mM ; acide borique 44,5mM ; EDTA 1mM ; agarose 1%).

Amorce 1 [séquence]	Amorce 2 [séquence]	Abr.	Tm (°C)	Taille (pb)	Digestion	Référence
trnD [ACCAATTGAACACTACAATCCC]	trnT [CTACCACTGAGTTAAAAGGG]	DT	54	1650	TaqI	Demesure et coll. (1995)
trnT [CATTACAAATGCGATGCTCT]	trnF [ATTGAACTGGTGACACGAG]	TF	57	1850	HinfI	Taberlet et coll. (1991)
psaA [ACTTCTGGTTCGGCGAACGAA]	trnS [AACCACCTCGCCATCTCTCCTA]	AS	57	3700	HinfI	Demesure et coll. (1995)
clpp [ATAAWAAGAAGACTAGCAGGT]	psbB [ATAYACCAATGCCARATAG]		50	2700	TaqI	Grivet et coll. (2001)

Tableau 1 Caractéristiques des amorces ADN chloroplastique. Tm : température d'hybridation. Pour chaque fragment, l'enzyme de digestion utilisée est indiquée.

Les produits d'amplification sont digérés par une enzyme de restriction prédéfinie (Petit et coll., 2002a) : TaqI pour les fragments DT et clpp-psbB et HinfI pour TF et AS. Le milieu de digestion de 25µL contient 2,5µL de tampon 10X, 1,5u d'enzyme de restriction et 5µL d'ADN. L'ADN est clivé pendant 5 heures à 37°C pour HinfI ou 2h30 à 65°C pour TaqI, temps à l'issue duquel 3µL de tampon de charge (bleu de bromophénol 1mg.mL⁻¹ ; EDTA 12,1 mg.mL⁻¹ ; saccharose 400mg.mL⁻¹) est rajouté dans chaque échantillon.

Les fragments d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse sur des petits gels de polyacrylamide 8% non dénaturants (TBE 1X, acrylamide/bis-acrylamide 37,5:1 8%, TEMED 0,08%, APS 0,05%), du marqueur 1kb est utilisé pour connaître la taille des différents fragments. La migration s'effectue à 400 pendant 2h30 dans des cuves de migration verticales réfrigérées à 15°C. Les gels sont colorés au bromure d'éthidium, les fragments d'ADN double brin révélés aux UV et l'acquisition s'effectue grâce à un bioimageur (Syngene – Gene Genius).

Des témoins dont l'haplotype est connu sont utilisés pour identifier plus rapidement les profils des individus échantillonnés. De plus, des profils de référence sont accessibles (Petit et coll., 2003) pour confirmer la caractérisation de l'ADN chloroplastique de chaque arbre. A partir des coordonnées relevées sur le terrain pour chaque prélèvement, une cartographie des haplotypes est construite grâce au logiciel MapInfo. Les coefficients de différenciation (G_{ST} de Nei) sont calculés grâce au logiciel libre Haplodiv (Pons et Petit, 1995).

Microsatellites nucléaires

Deux locus microsatellites (ssrQrZAG96 et ssrQrZAG112) connus pour discriminer les chênes pédonculé et sessile mais non encore testés sur le chêne pubescent ont été analysés. De plus, le pouvoir discriminant d'une troisième amorce (ssrQrZAG111) va être testé. Les informations concernant la séquence des amorces sont issues de Kampfer et coll. (1998). Les locus ssrQrZAG96, ssrQrZAG111 et ssrQrZAG112 (notés par la suite respectivement Qr96, Qr111 et Qr112) sont caractérisés par des motifs répétés GA (voir tableau 2). Selon Saintagne et coll. (2004) ces marqueurs sont liés à des QTL (Quantitative Trait Locus) impliqués dans la morphologie des feuilles (Qr96 : longueur relative du pétiole, Qr111 : longueur du pétiole, Qr112 : forme du limbe), principal critère distinguant les espèces du genre *Quercus*. D'autre part, Qr111 colocalise avec un QTL impliqué dans l'efficacité d'utilisation de l'eau, critère écophysologique distinguant le chêne sessile et pédonculé (Saintagne, 2003). Ces locus sont chacun situés sur un chromosome différent (respectivement, chromosome 10, 11 et 12).

L'amplification PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 20µL contenant 2µL de tampon 10X Invitrogen, 2mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 0,2µM de chaque amorce (une

amorce marquée par un fluorochrome IR-125 et une amorce non marquée) et 0,5 μ M de Taq polymérase (Invitrogen). L'amplification a été menée grâce à un thermocycleur GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) avec les conditions suivantes : 4 minutes de dénaturation à 94°C suivi de 35 cycles comprenant 45 secondes de dénaturation à 94°C, 45 secondes d'hybridation à la température spécifique de chaque paire d'amorces (voir Tm tableau 2) et 45 secondes d'élongation à 72°C. 4 μ L de chaque produit d'amplification est additionné de 4 μ L de tampon de charge dénaturant (EDTA 10mM ; xylène cyanol 0,1% ; bleu de bromophénol 0,1% ; formamide 78%) puis l'ADN est dénaturé pendant 4 minutes à 94°C.

Locus	Motif répété	Séquence des amorces	Intervalle de taille d'allèle	Tm (°C)
ssrQrZAG96	(GA) _n	CCAGTCACATCCACTACTGTCC GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA	135-194 pb	55
ssrQrZAG111	(GA) _n	CATCCAAACCTCTGCGATCT GGTGGTGATGTTTCTTTAATTTTG	123-142 pb	56
ssrQrZAG112	(GA) _n	TTCTTGCTTTGGTGCGCG GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATTC	85-96 pb	58

Tableau 2 Caractéristiques des amorces microsatellites. Tm : température d'hybridation.

Les microsatellites amplifiés et dénaturés sont mis à migrer sur un gel polyacrylamide 6% dénaturant (urée 6M ; acrylamide 19:1 8% ; TBE 0,4X ; APS et TEMED assurant la polymérisation) dans un séquenceur automatique Li-cor (modèle 4000 et 4000L IRD40, Li-cor Inc) permettant de séparer les différents allèles. La migration s'effectue à 1500V à 45°C pendant environ 2 heures. La détection des fragments d'ADN marqués s'effectue lorsque ceux-ci passent devant le laser (800 nm) qui excite les fluorochromes. Un marqueur de taille (Li-cor 50-350 pb Concentration Sizing Standard) est utilisé pour connaître la taille des différents allèles.

Les images obtenues sont analysées par deux méthodes : manuellement et grâce au logiciel RFLPScan (Scanalytics). Le logiciel en ligne Genepop (Raymond et Rousset, 1995) est utilisé pour calculer les fréquences alléliques ainsi que les coefficients de différenciation F_{ST} et $Rho(st)$. L'analyse factorielle des correspondances est construite avec le logiciel libre Genetix (Belkhir et coll., 1996). Les analyses d'autocorrélations spatiales sont menées grâce à SPAGeDI (Hardy et Vekemans, 2002).

Résultats

Haplotypage de l'ADN chloroplastique

L'échantillonnage effectué à l'échelle européenne (Petit et coll., 2002a) montre une diversité haplotypique importante dans la région ouest toulousaine. Chaque lignée est représentée dans la région : haplotype 1 provenant de la péninsule italienne, haplotype 7 provenant des Balkans et haplotypes 10 et 11 en provenance de la péninsule ibérique.

Ces différents haplotypes ont été retrouvés lors de l'échantillonnage régional (figure 1) dans un rayon de 30 km autour d'Aurignac, cependant l'haplotype 10 est le plus représenté. Au nord de la zone, on trouve un sous-ensemble de l'haplotype 10 (haplotype 10b) qui semble fixé dans quelques populations mais qui est absent de l'échantillonnage local.

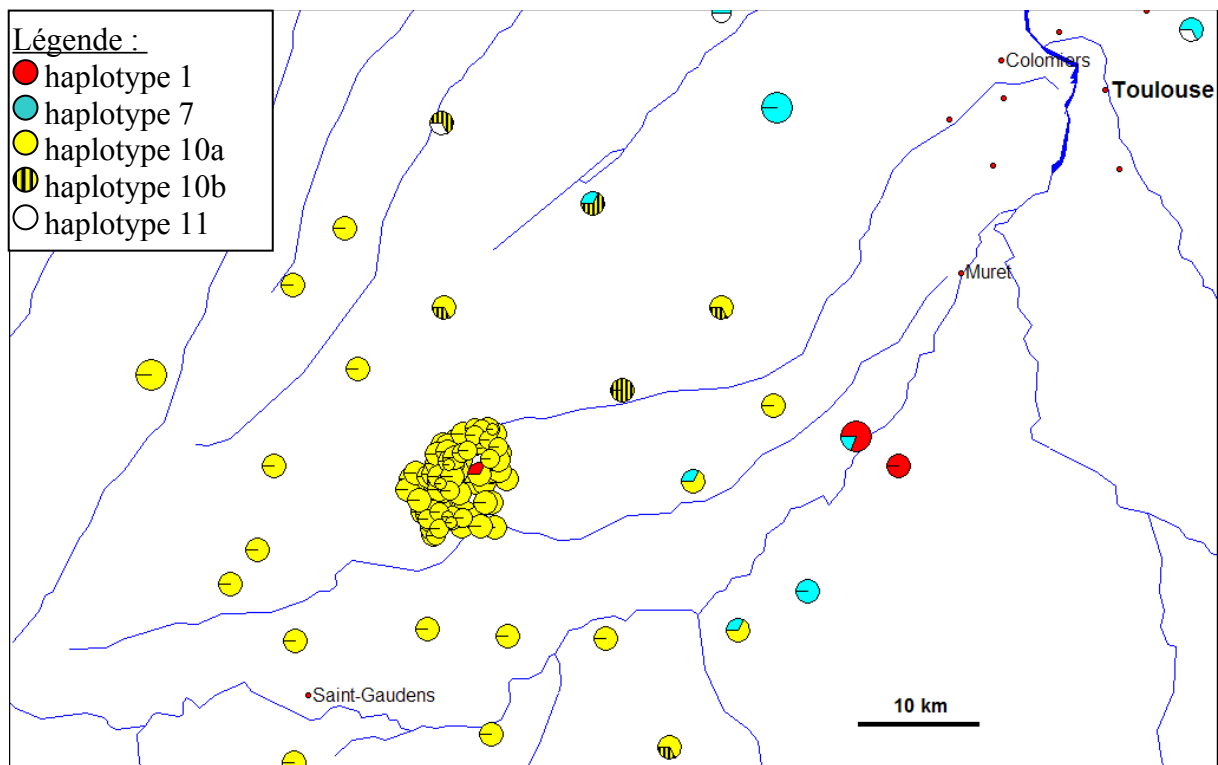


Figure 1 Carte de répartition des haplotypes dans la région sud-ouest toulousaine. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'arbres échantonnés. Comprend les données de l'échantillonnage effectué à l'échelle de l'Europe (points périphériques sur la carte avec 5 arbres par point, Petit et coll., 2002), l'échantillonnage régional (66 chênes parmi 22 populations) et l'échantillonnage local (260 chênes répartis sur 8000 ha).

Au niveau local, sur les quelques 250 arbres analysés, seul un individu a un haplotype différent du 10a. La population échantillonnée la plus proche où on retrouve ce même haplotype est situé à 30 km à l'est. Cette observation correspond à un événement de dispersion à longue distance d'au moins 3 km (distance arbre – limite de la zone locale intensément échantillonnée), probablement dû à un transport par les geais. Sur l'ensemble du dispositif, la différenciation interpopulation (G_{ST}) est de 0,6025 alors que la différenciation interspécifique est de 0,0092. La structuration haplotypique (un haplotype fixé au sein des populations sur une zone d'environ 40 à 60 km) correspond au processus de recolonisation post-glaciaire mis en évidence par Petit et coll. (1997).

Microsatellites nucléaires

Deux locus microsatellites connus pour discriminer les espèces *Q. robur* et *Q. petraea* ainsi qu'un nouveau locus microsatellite ont été analysés au sein des chênes de l'échantillonnage local. Le polymorphisme observé est très élevé avec 27 allèles par locus microsatellites en moyenne et des valeurs d'hétérozygotie théorique allant de 70% à 94% (voir tableau 3).

Locus	Nombre d'allèles	Taille en pb (<i>nombre de répétitions</i>)	Hétérozygotie théorique	Indice de fixation
Qr96	25	134-182 (67-91)	0,84	0,2472
Qr111	32	102-174 (51-87)	0,94	0,4429
Qr112	24	72-128 (36-64)	0,70	0,1123

Tableau 3 Caractéristiques des locus microsatellites analysés. Indice de fixation = (hétérozygotie théorique – hétérozygotie observée) / hétérozygotie théorique.

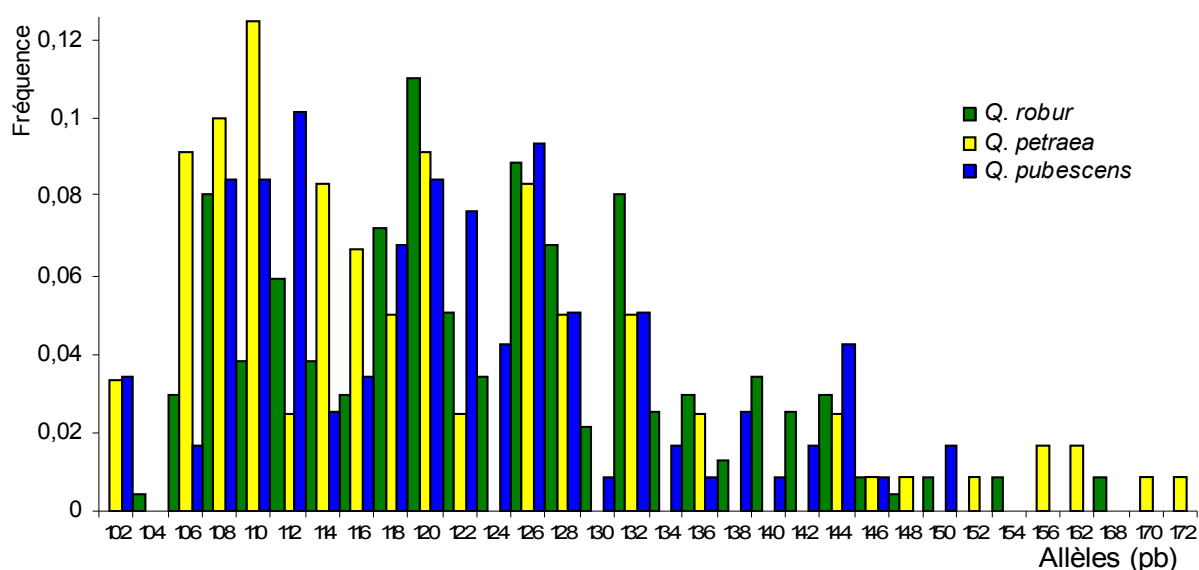
L'indice de fixation élevé indique un déficit d'hétérozygotie pour l'ensemble des locus. La présence d'allèles nuls en particulier pour Qr111 pourrait en partie expliquer ce résultat. Les locus étudiés ne sont pas liés physiquement car ils sont localisés sur des chromosomes différents et ne présentent pas de déséquilibre de liaison (probabilité $p > 0,99$), c'est-à-dire que le génotype à un locus est indépendant du génotype aux autres locus.

Comparaison interspécifique

Sachant que ces locus sont capables de différencier les chênes pédonculés et les chênes sessiles, il est intéressant de comparer leurs caractéristiques entre les différentes espèces présentes dans l'échantillonnage (chênes pédonculés, sessiles et pubescents).

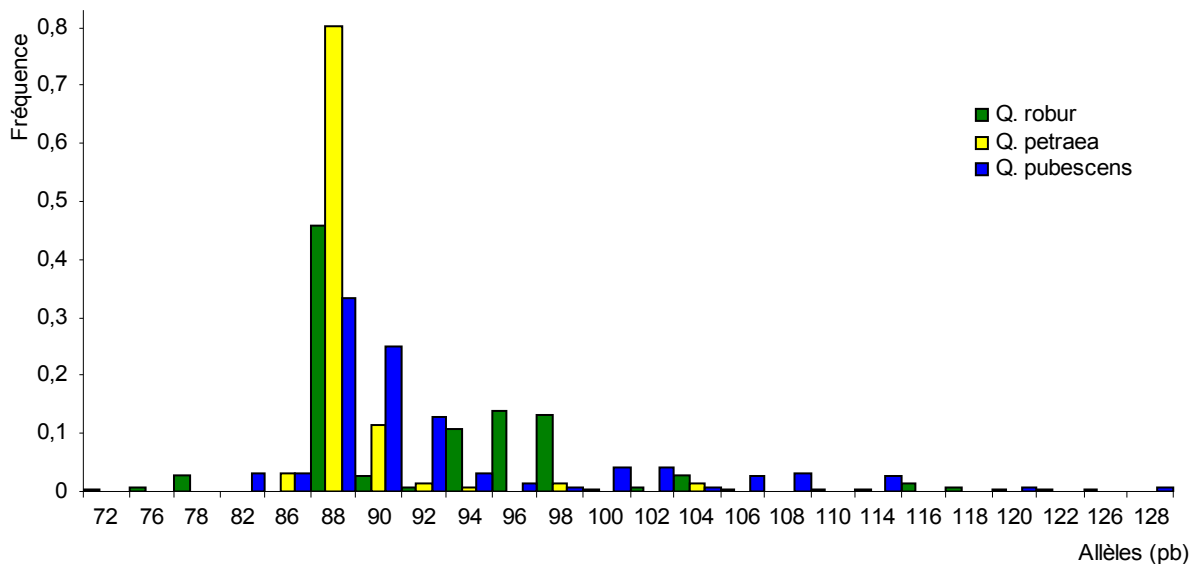
Fréquences alléliques

Qr111 a beaucoup d'allèles au sein des populations analysées (graphique 1). L'allèle le plus fréquent se retrouve parmi 12% des chênes sessiles. Les profils observés avec ce locus sont complexes et on peut seulement remarquer que les allèles de grande taille (supérieur à 153 pb) ne se retrouvent pas chez le chêne pubescent.



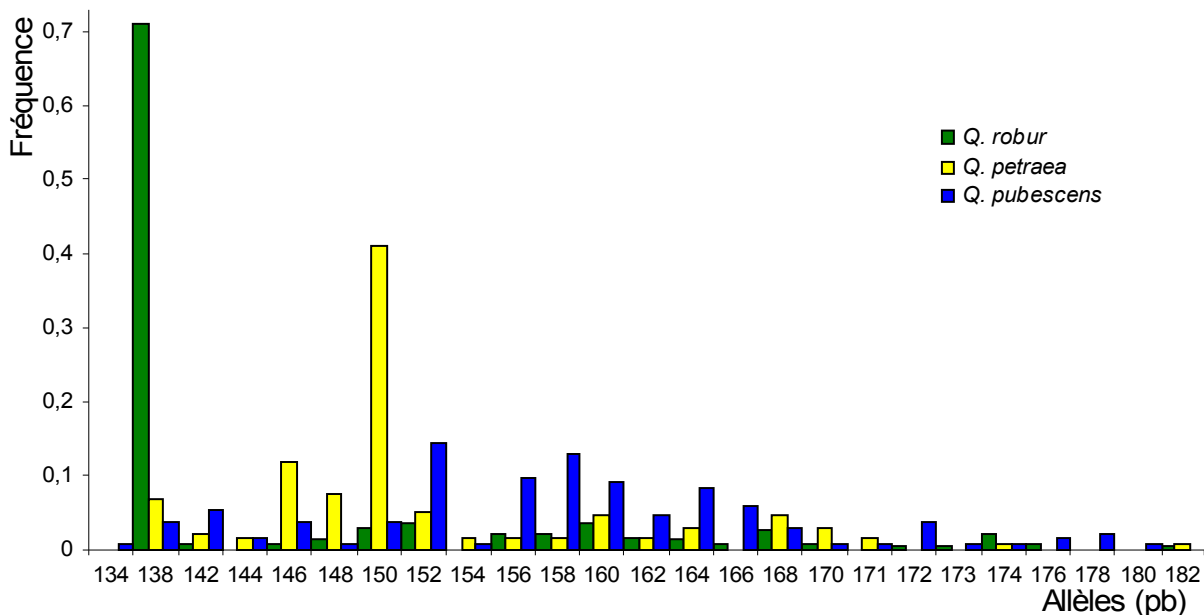
Graphique 1 Fréquences alléliques du locus Qr111 en fonction des espèces.

Le profil de Qr112 est bien différent (graphique 2). Un allèle (89 pb) est particulièrement représenté chez les trois espèces avec une fréquence élevée (80%) au sein des chênes sessiles (contre 45% chez les pédonculés et 32% chez les pubescents). On peut remarquer deux allèles rares (à 97 et 99 pb) chez les chênes sessiles et pubescents mais relativement fréquents chez les chênes pédonculés (plus de 10% chacun).



Graphique 2 Fréquences alléliques du locus Qr112 en fonction des espèces.

La répartition des allèles de Qr96 en fonction des espèces est particulièrement intéressante car chaque espèce a des profils distincts (graphique 3) : *Q. robur* présente un allèle très fréquent (70%) de 138 pb, *Q. petraea* possède un allèle fréquent (40%) de 150 pb alors que *Q. pubescens* est caractérisé par des allèles de plus grande taille qui sont rares chez les autres espèces. La spécificité des profils observés est telle qu'il est pratiquement possible de déterminer l'espèce du chêne analysé sur la base de cette seule information.



Graphique 3 Fréquences alléliques du locus Qr96 en fonction des espèces.

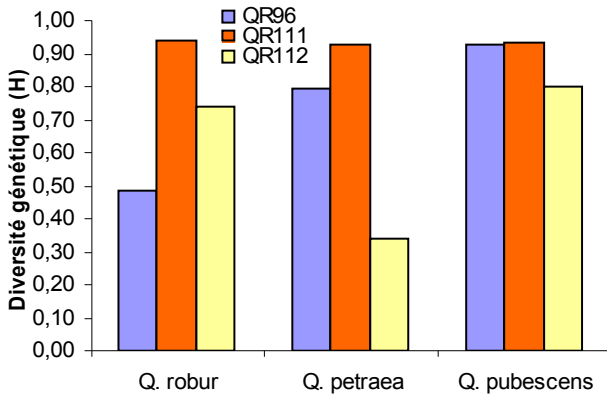
Diversité génétique

La diversité génétique varie selon les espèces à un locus donné (tableau 4, graphique 4).

	<i>Q. robur</i>			<i>Q. petraea</i>			<i>Q. pubescens</i>			Toutes espèces		
	A	A _e	H	A	A _e	H	A	A _e	H	A	A _e	H
Qr96	19	1,95	0,4878	18	4,92	0,7968	24	13,72	0,9271	25	6,14	0,8372
Qr111	26	16,71	0,9401	22	13,74	0,9272	23	15,44	0,9353	32	17,26	0,9421
Qr112	20	3,83	0,7391	7	1,52	0,3406	16	5,04	0,8018	24	3,39	0,7047

Tableau 4 A: nombre d'allèles ; H : diversité génétique de Nei ($H = 1 - \sum p_i^2$) avec p = fréquence de chaque allèle au locus considéré ; A_e : nombre d'allèles efficaces ($A_e = 1/(1-H)$).

Ainsi la diversité génétique des chênes pédonculés pour le locus Qr96 et des chênes sessiles pour le locus Qr112 est relativement faible. A contrario, Qr111 présente un niveau de diversité génétique très élevé chez toutes les espèces. Les chênes pubescents quand à eux sont caractérisés par une grande diversité génétique pour l'ensemble des locus étudiés.



Graphique 4 Diversité génétique de Nei calculée pour chaque espèce et pour chaque locus.

Locus	G _{ST}	Rho(st)
Qr96	0,1794	0,3235
Qr111	0,0003	0,0208
Qr112	0,0763	0,0891
Multilocus	0,0843	0,1604

Tableau 5 Différenciations interspécifiques.

Différenciation interspécifique

Dans un premier temps, l'hypothèse que les allèles sont distribués au hasard entre les différentes espèces est testée (test de Fisher). Cette hypothèse est invalidée car sa probabilité est inférieure à 1% pour tous les locus. Les espèces ont donc des compositions alléliques significativement différentes.

Au sein des trois espèces, le coefficient de différenciation (G_{ST}, Nei, 1973) est variable selon les locus (tableau 5) : alors que Qr96 et Qr112 sont assez discriminants (18% et 8%), Qr111 ne semble pas différencier les espèces. Si on tient compte de la taille des allèles microsatellites (coefficient de différenciation Rho(st), Rousset, 1996), le pouvoir discriminant des locus augmente encore car chaque espèce possède des tailles d'allèles plus ou moins spécifiques.

Comparaison des différenciations entre espèces

Multilocus	G _{ST}		Rho(st)	
	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>
<i>Q. petraea</i>	0,1036	-	0,1194	-
<i>Q. pubescens</i>	0,0780	0,0566	0,2264	0,0685

Tableau 6 Différenciation interspécifique par paire

En prenant en compte les trois locus, *Q. robur* et *Q. petraea* sont les espèces les plus différenciées suivies du couple *Q. robur* – *Q. pubescens*, enfin, *Q. petraea* et *Q. pubescens* sont les espèces les moins différenciées (tableau 6). Ce résultat concorde avec la différenciation morphologique de ces espèces. En effet, *Q. petraea* et *Q. pubescens*, les deux espèces les moins différenciées, constituent un continuum morphologique qui les rend parfois difficilement discernables.

Vu les distributions des fréquences alléliques différentes entre les trois espèces, il est intéressant de comparer la différenciation des espèces deux à deux pour chacun des locus (tableau 7).

Locus Qr96	G _{ST}		Rho(st)	
	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>
<i>Q. petraea</i>	0,2393		0,2121	
<i>Q. pubescens</i>	0,2016	0,0643	0,4387	0,1623

Locus Qr111	G _{ST}		Rho(st)	
	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>
<i>Q. petraea</i>	0,0031		0,0369	
<i>Q. pubescens</i>	-0,0025	0,0003	0,0195	-0,0089

Locus Qr112	G _{ST}		Rho(st)	
	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>
<i>Q. petraea</i>	0,0840		0,1613	
<i>Q. pubescens</i>	0,0476	0,1262	-0,0053	0,1755

Tableau 7 Différenciation interspécifique par locus et par paire d'espèces.

Le locus Qr111 différencie peu quel que soit le couple d'espèces considéré.

Le locus Qr96 est très différencié entre les chênes pédonculés d'un côté et les chênes sessiles et pubescents d'autre part (respectivement G_{ST} = 0,2393 et 0,2016) alors que si on tient compte de la taille des allèles, le couple pédonculé / pubescent apparaît comme étant le plus différencié (Rho(st) = 0,4387). En effet, pour ce locus, les chênes pédonculés et les chênes sessiles ont un allèle majoritaire différent alors que les chênes pédonculés et pubescents ont surtout des allèles de tailles très différentes.

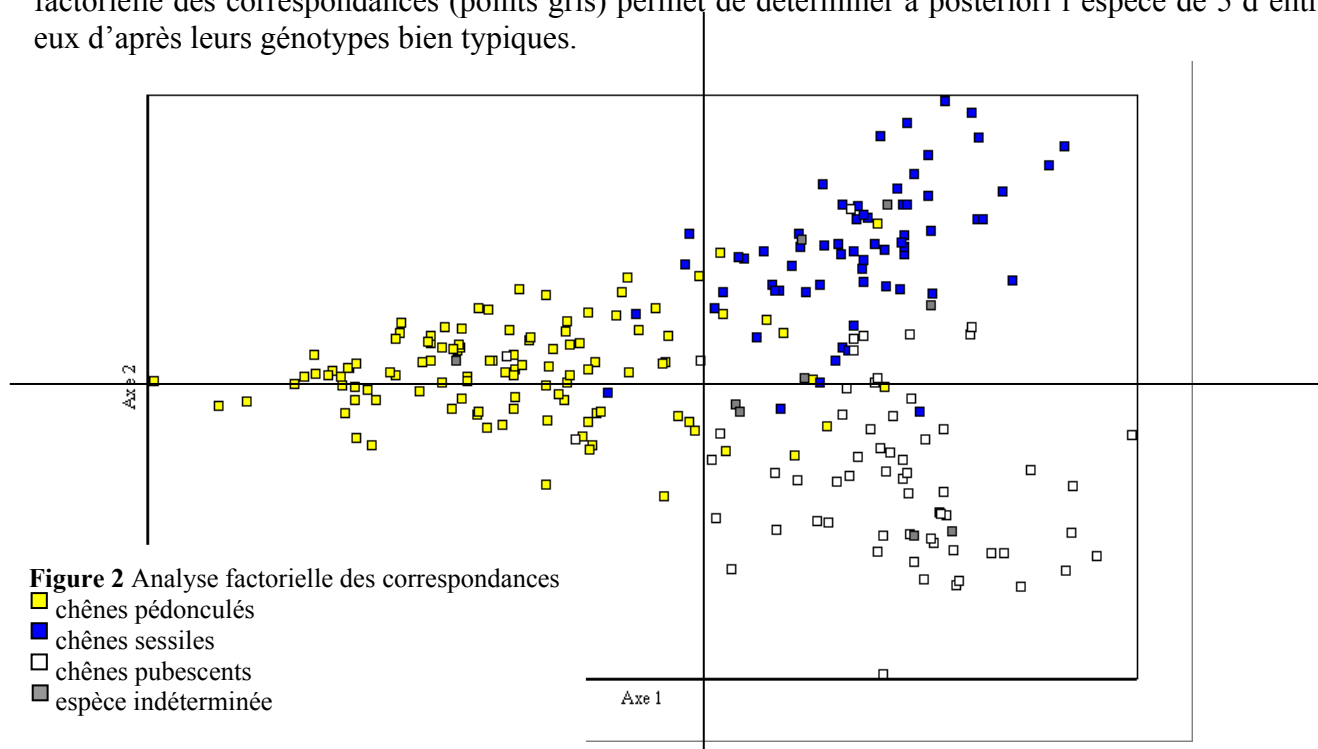
Les chênes sessiles et pubescents se différencient essentiellement par le locus Qr112 (G_{ST} = 0,1262). Par contre, si on considère le coefficient de différenciation Rho(st) qui intègre le nombre de répétitions du motif microsatellite, on constate que *Q. robur* et *Q. pubescens* sont les espèces les plus différenciées. Ceci vient du fait que les chênes pubescents possèdent des allèles de taille plus élevée que les chênes pédonculés ou sessiles (en particulier pour les locus Qr96 et Qr112).

Il est intéressant de remarquer que les motifs microsatellites Qr96 et Qr112 ont des caractéristiques distinctes chez les espèces étudiées. Alors que d'un point de vue morphologique les espèces *Q. petraea* et *Q. pubescens* sont connues pour être particulièrement proches, les motifs microsatellites étudiés, pourtant liés à des QTL intervenant dans des caractères morphologiques, sont discriminants pour toutes les paires d'espèces prises deux à deux.

Analyse factorielle des correspondances

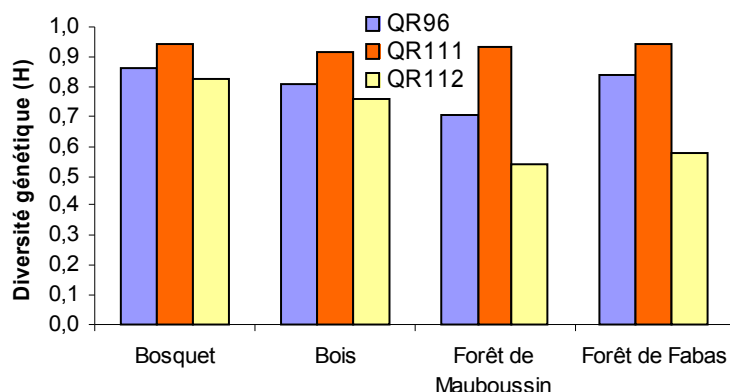
L'analyse factorielle des correspondances (figure 2) utilisant les allèles des trois locus étudiés pour l'ensemble des chênes échantillonnés met en évidence une séparation nette des trois espèces. La frontière entre les trois zones est progressive, ce qui indique que les trois locus utilisés ne permettent pas une discrimination totale des espèces étudiées. En outre, cette zone transitoire peut correspondre à des hybrides caractérisés par des génotypes intermédiaires. D'autre part, l'hybridation interspécifique étant un phénomène fréquent chez les chênes, la détermination de l'espèce pour des chênes à morphologie intermédiaire peut amener des erreurs. On peut remarquer que des individus identifiés morphologiquement comme appartenant à une espèce présentent des caractères génétiques prononcés d'une autre espèce (cas de trois arbres).

Un total de 8 chênes dont l'espèce n'avait pas pu être déterminée avec certitude par leurs critères morphologiques a été analysé pour les trois locus microsatellites. Leur intégration à l'analyse factorielle des correspondances (points gris) permet de déterminer à posteriori l'espèce de 5 d'entre eux d'après leurs génotypes bien typiques.



Différenciation inter-bois

Pour étudier la part éventuelle de variation liée à la localisation géographique des chênes, quatre catégories ont été définies selon le facteur taille des bois : les bosquets (taille (T) < 10 ha ; nombre d'arbres (N) = 91), les bois (T entre 10 et 500 ha ; N = 28), le forêt de Mauboussin (T = 510 ha ; N = 48) et la forêt de Fabas (T = 623 ha ; N = 79). Ces différents bois sont caractérisés par des compositions en espèce de chêne variables. Les bois de petite taille sont notamment riches en chênes pubescents ou en chênes pédonculés alors que les forêts sont composées d'un mélange de chênes pédonculés et sessiles.



Locus	G _{ST}	Rho(st)
Qr96	0,0203	0,0450
Qr111	0,0004	0,0069
Qr112	0,0328	0,0194
Multilocus	0,0167	0,0236

Tableau 8 Différenciation inter-bois

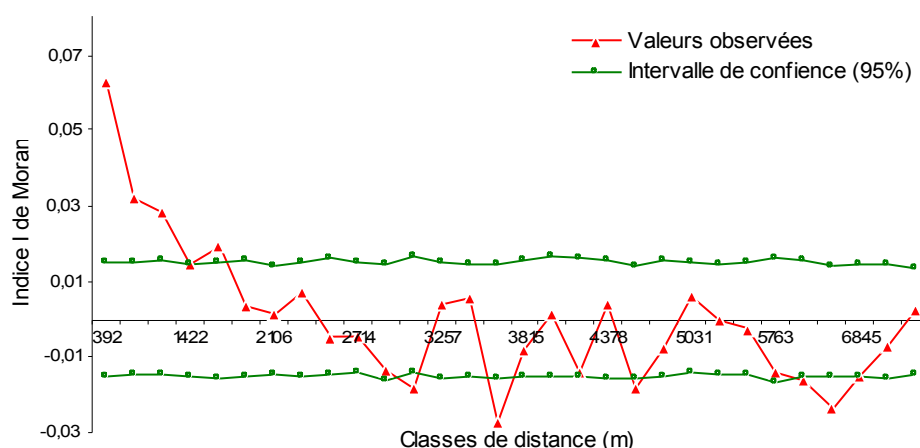
Graphique 5 Diversité génétique de Nei calculée pour tous les peuplements forestiers et pour tous les locus

La diversité génétique des forêts est globalement inférieure à celle des bois de plus petite taille (graphique 5). Les valeurs de diversité pour les locus QR96 et QR112 sont représentatives de la composition en espèces des différents peuplements. Les forêts étant riches en chênes sessiles, leur diversité génétique pour QR112 est plus faible que les bois ou les bosquets. Les peuplements plus petits sont caractérisés par la présence de chêne pubescent caractérisé par une diversité importante pour tous les locus. Le locus QR111, dont la variabilité est indépendante des espèces, a une forte diversité génétique indépendamment de la taille du peuplement.

La faible différenciation qui apparaît pour Qr96 et Qr112 entre les bois de différentes tailles (tableau 8) est due à cette différence de répartition des espèces entre les bois. En outre, le locus Qr111 qui ne présente pas de différenciation spécifique n'est pas plus différencié entre les bois. Des analyses intraspécifiques conduisent à des effectifs trop faibles et souvent déséquilibrés entre les catégories ce qui ne permet pas des analyses fiables. Néanmoins, les chênes sessiles et pédonculés des forêts de Fabas et Mauboussin ne montrent pas de différenciation génétiques intraspécifiques significatives (données non présentées).

Structuration génétique

En combinant données génotypiques et coordonnées spatiales de chaque chêne échantillonné, il est possible d'effectuer des analyses géostatistiques et notamment des auto-corrélations spatiales. L'indice I de Moran permet d'estimer la structuration génétique pour différentes classes de distances.

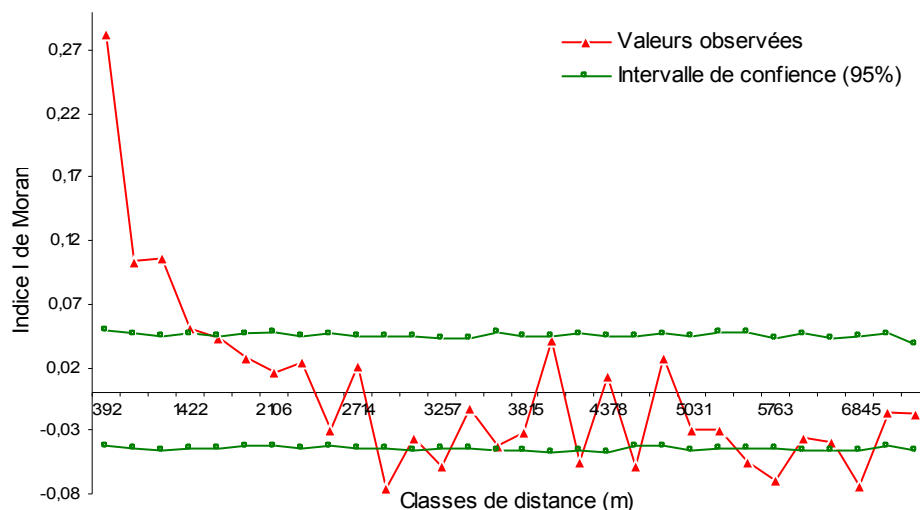


Graphique 6 Indice I de Moran pour tous les locus calculé pour 30 classes de distance.

Une structuration génétique significative apparaît pour les faibles classes de distance (entre 0 et 1800 mètres, graphique 6). Les chênes séparés de moins de 1,8 km sont donc génétiquement plus

proches que des chênes plus éloignés. Les ressemblances génétiques significatives pour des arbres éloignés d'environ 3,3 km, 4 km, 4,8 km et 7 km semblent liées au hasard.

Le génotype d'un chêne étant dépendant de son espèce, il faut estimer la part de la répartition des espèces au sein du paysage pour pouvoir interpréter ce résultat. Pour cela, on fait correspondre à chaque couple de coordonnées spatiales non pas des génotypes mais la donnée correspondant à l'espèce de l'arbre codée comme un locus haploïde (exemple : 1 pour chêne pédonculé, 2 pour chêne sessile et 3 pour chêne pubescent). Le logiciel paramétré de la même façon que précédemment peut ainsi être utilisé.



Graphique 7 Indice I de Moran pour les espèces calculé pour 30 classes de distance.

La structuration de la répartition des espèces correspond à celle observée pour la ressemblance génétique (graphique 6 vs. 7). Deux arbres proches ont plus de chance d'être de la même espèce et donc se ressemblent plus que deux arbres pris au hasard, ce qui explique la structuration génétique observée.

Des autocorrélations spatiales menées pour les différents locus et pour chaque espèce ne montrent pas de structurations génétiques significatives (données non présentées).

Discussion

Répartition des variants chloroplastiques

La faible diversité de l'ADN chloroplastique à l'échelle locale a de quoi surprendre. En effet, les peuplements forestiers du canton d'Aurignac sont très fragmentés et mis à part les forêts de Fabas et Mauboussin, leur taille excède rarement 10 ha. Ces forêts paysannes font l'objet d'une gestion intense avec des rotations des parcelles relativement fréquentes (Guyon et coll., 1996). Malgré cet aspect dynamique important, la diversité et la structuration des haplotypes ne semble pas avoir changé depuis l'arrivée des chênes à l'issue de la recolonisation postglaciaire (il y a environ 9000 ans). La plupart des parcelles boisées ont donc été régénérées soit naturellement ou par plantation de graines d'origine locale. Une partie importante des chênes est régénérée par rejet de souche (multiplication asexuée caractéristique du taillis) ce qui peut aussi contribuer à stabiliser la structuration haplotypique.

La faible différenciation interspécifique correspond à ce qui est couramment observé chez les espèces sympatriques à l'échelle d'un peuplement. Cette caractéristique des marqueurs cytoplasmique chez les chênes est actuellement expliquée par des croisements interspécifiques

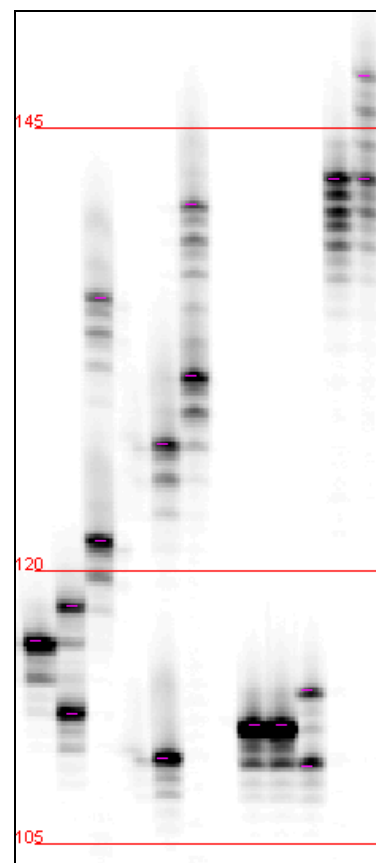
unidirectionnels et récurrents qui conduiraient à l'introgession du génome nucléaire, alors que les génomes cytoplasmiques à transmission maternelle resteraient fixés (Kremer et coll., 2002). La diversité et la structuration haplotypique semblent donc liées essentiellement à des facteurs historiques et biologiques. L'action de l'homme sur ces peuplements n'a pas laissé de traces visibles avec ce type de marqueurs, de même que la fragmentation des forêts ne semble pas influencer la structuration géographique des haplotypes (Petit et coll., 2002c).

Microsatellites nucléaires

Les trois locus microsatellites analysés sont caractérisés par un déficit d'hétérozygotie. Le locus Qr111 présente un tel taux d'homozygotie au sein des trois espèce qu'il est possible d'invoquer la présence d'allèles nuls non amplifiés suite à une mutation dans la séquence flanquant le microsatellite, ciblée par l'amorce PCR (Jarne et Lagoda, 1996). D'autre part, les gels ont été particulièrement difficiles à lire pour ce locus car les profils sont complexes de par le nombre d'allèles important. De plus, les allèles de grande taille sont souvent apparus sous forme de bandes multiples, phénomène nommé slippage (voir ci-contre). Cette interférence est due à un glissement d'un motif de la Taq polymérase lié aux répétitions dinucléotidiques. Cette erreur d'élongation peut se produire plusieurs fois conduisant à l'amplification de plusieurs bandes parasites plus courtes d'un à plusieurs motifs (Ellegren, 2004). Le fragment pris en compte pour l'analyse est celui de plus grande taille (les autres étant des sous-produits d'amplification), qui correspond vraiment à l'allèle. Cependant, dans le cas de deux allèles de taille très proches, il peut arriver qu'un allèle soit masqué par ces bandes parasites. Ce phénomène de glissement se produit également *in vivo* : l'ADN polymérase est souvent trompée par une dissociation temporaire du brin en cours de réplication suivie d'une réassociation décalée d'un motif. Néanmoins, ce mécanisme de mutation n'est pas si fréquemment observé *in vivo* car le système de réparation des erreurs de réplication corrige le plus souvent ce type de décalage.

Les profils des deux autres locus (Qr96 et Qr112) se sont avérés plus lisibles et le déficit d'hétérozygotie observé peut être dû à un effet Wahlund lié à un mélange de populations distinctes. En effet, lorsque chaque espèce est considérée comme une population, il apparaît que ce déficit d'hétérozygotie est bien inférieur pour ces deux locus (données non montrées).

Les profils des fréquences alléliques en fonction de la taille des allèles montrent clairement une diversification des allèles de grande taille (beaucoup d'allèles de grandes tailles à de faible fréquences) ce qui indique que ceux-ci sont soumis à des taux de mutation plus élevé que ceux de petite taille.



Exemple de gel microsatellite montrant le phénomène de **slippage**. Chaque colonne représente un individu, l'échelle de taille en pb est représentée par les traits horizontaux. Les tirets roses représentent l'allèle pris en compte alors que les bandes répétées de tailles inférieures illustrent le phénomène de slippage (voir explications dans le texte).

Données écologiques

D'une façon générale, l'analyse des résultats tenant compte des données écologiques recueillies sur la zone (Maya Gonzalez, thèse au laboratoire DYNAFOR – INRA Castanet) nécessite un échantillonnage plus intense. En effet, l'intégration de données écologiques se fait en constituant des groupes (populations) à analyser séparément. L'échantillonnage qui favorise la diversité spécifique permet de faire des comparaisons interspécifiques aisément mais dès qu'il faut effectuer d'autres regroupements, le nombre d'arbres par espèce et par catégorie devient rapidement trop faible ou les groupes se révèlent trop hétérogènes en terme d'effectif pour pouvoir fournir des analyses fiables.

Néanmoins, les données écologiques expliquent la répartition des espèces au sein de la zone étudiée. Les chênes pubescents sont situés dans des petits bois à exposition sud. Les chênes sessiles se trouvent à l'intérieur des massifs de plus grande taille, préférentiellement dans les zones à exposition sud. Le chêne pédonculé n'a pas d'exposition préférentielle et se situe en bordure des grands massifs ou dans les bois de plus petite taille.

Différenciation interspécifique

Les coefficients de différenciation obtenus dans cette étude sont particulièrement élevés. Une étude comparant le couple chêne sessile – chêne pédonculé dans le cadre du projet européen OAKFLOW (Pablo Goikoetxea, données non publiées) montrait des valeurs de G_{ST} de 0,055 pour Qr96 et 0,074 pour Qr112 pour des chênes provenant de l'ensemble de l'aire européenne. Pour les chênes échantillonnés autour d'Aurignac, le pouvoir discriminant de ces deux locus est inversé (Qr96 étant le plus discriminant) mais surtout le pouvoir discriminant est bien supérieur (0,239 et 0,084 respectivement). Ces résultats confirment que le degré de différenciation interspécifique varie localement (Bodénès et coll., 1997). Lors de la dernière glaciation, les chênes appartenant aux différents refuges sont restés isolés pendant plus de 100000 ans. Le degré de différenciation interspécifique à la fin de la glaciation n'est pas connu mais il a pu varier entre refuges. Le fait que la région abrite principalement des chênes provenant du refuge ibérique (voir carte des haplotypes) peut conduire à augmenter localement la différenciation interspécifique par rapport à la différenciation entre espèces qui proviennent de l'ensemble des refuges à l'échelle européenne.

Le chêne pubescent se différencie génétiquement des deux autres espèces alors que d'un point de vue morphologique il est plus en continuité avec le chêne sessile et se distingue nettement du chêne pédonculé. Le plus étonnant est le pouvoir discriminant du locus Qr112 qui différencie le couple chêne sessile – chêne pubescent en premier lieu. Il apparaît donc que certaines régions génomiques impliquées dans la différenciation chêne sessile – chêne pédonculé sont aussi impliquées dans la différenciation interspécifique entre ces trois espèces. Cette observation peut être liée à une pression de sélection spécifique au niveau local ou bien plus probablement à une intervention de ces régions génomiques dans l'isolement reproducteur. Cette dernière hypothèse impliquerait que les régions génomiques différenciant ces espèces soient les mêmes quelle que soit l'origine géographique des chênes.

Le locus Qr111 lié à un QTL d'efficacité d'utilisation en eau ne discrimine pas les différentes espèces de chênes. Le fait que ce locus soit aussi lié à un QTL impliqué dans la longueur du pétiole complique l'interprétation de ce résultat. Néanmoins, il est possible que la sélection pour le critère d'utilisation en eau soit moindre localement ce qui diminuerait la différence entre espèces pour ce trait à l'échelle du paysage étudié.

Structuration génétique

L'absence de structuration génétique indépendante de la répartition des espèces montre que les flux de gènes sont très importants entre les différents fragments forestiers. Aucun phénomène

d'isolement par la distance n'est mis en évidence ce qui est logique si on considère que le pollen des chênes, produit en grande quantité, est capable de migrer sur plusieurs kilomètres. Néanmoins, l'échantillonnage n'est pas adapté pour détecter d'éventuels apparentements génétiques pour de faible distance (intra-bois).

Conclusion

D'après les résultats obtenus dans le canton d'Aurignac, il apparaît que la diversité et la structuration génétique des chênes est principalement liée à des facteurs historiques et écologiques. La gestion intense au cours des temps ainsi que la fragmentation des peuplements forestiers semble avoir eu peu de conséquences visibles au niveau génétique. Cette étude s'intègre dans un projet 2004-2005 soutenu par le Bureau des Ressources Génétiques intitulé « Impact de l'écologie, de l'histoire et du mode de gestion sur la diversité génétique des chênes en forêts fragmentées » et mené en collaboration avec l'INRA de Toulouse (UMR DYNAFOR). Dans le cadre de ce projet, les conséquences génétiques d'une gestion en taillis sous futaie vont être étudiées en procédant à un échantillonnage exhaustif d'une parcelle. D'autre part, une étude de la diversité haplotypique parmi un peuplement fragmenté de chênes au sein du massif landais va être entreprise prochainement. Des résultats préliminaires indiquent une diversité haplotypique supérieure. La comparaison des résultats obtenus sur ces sites va permettre de mieux comprendre les processus influençant la diversité génétique chez les chênes au niveau d'un paysage.

Malgré la faible différenciation interspécifique au sein du complexe des chênes blancs, l'étude systématique des locus entre espèces permet d'identifier des marqueurs génétiques discriminants ces espèces. Ce type de marqueurs est un outil précieux pour mieux comprendre l'évolution au sein du complexe d'espèces des chênes. Ainsi, au vu des résultats obtenus, le chêne pubescent se différencie des chênes pédonculé et sessiles au niveau des mêmes régions génomiques. D'autre part, la différenciation interspécifique varie géographiquement et la forte différenciation observée ici peut être liée à l'origine postglaciaire commune des chênes analysés (essentiellement refuge ibérique). D'autres espèces, notamment le chêne tauzin, pourraient dans l'avenir être intégrés aux analyses afin de mieux comprendre l'origine génétique de la différenciation des espèces au sein du complexe. De plus, une autre approche complémentaire à la recherche de QTL pourrait être entreprise en ciblant des gènes candidats susceptibles d'intervenir dans les différences morphologiques ou écophysiologiques entre espèces.

L'erreur de détermination d'espèce à partir de l'analyse factorielle présentée dans cette étude prenant en compte trois locus est d'environ 10 %. L'utilisation de plusieurs locus supplémentaires, dès à présent disponibles, permettrait d'affiner la détermination. De plus, il serait intéressant d'étudier le degré de discrimination interspécifique de ces marqueurs à l'échelle de l'aire de répartition pour estimer la variabilité géographique de la différenciation interspécifique. Ce préalable est indispensable à l'utilisation de ces marqueurs comme outils pour déterminer l'espèce d'origine de lots de bois (le bois de chêne sessile et pédonculé ayant des propriétés très différentes pour la vinification par exemple) ou de graines (gestion des forêts).

Bibliographie

- Bacilieri R., Ducouso A., Petit R. J., Kremer A., 1996.** Mating system and directional gene flow in a mixed oak stand. *Evolution*, **50**, 900-908.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F., 1996.** GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bodénès C., Labbé T., Pradère S., Kremer A., 1997.** General vs. local differentiation between two closely related white oak species. *Molecular Ecology*, **6**, 713-724.
- Coart E., Lamote V., De Loose M., Van Bockstaele E., Lootens P., Roldan-Ruiz I., 2002.** AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species [*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] in Flemish populations. *Theoretical and Applied Genetics*, **105**, 431-439.
- Degen B., Streiff R., Ziegenhagen B., 1999.** Comparative study of genetic variation and differentiation of two pedunculate oak (*Quercus robur*) stands using microsatellite and allozyme loci. *Heredity*, **83**, 597-603.
- Deguilloux M. F., Pemonge M. H., Bertel L., Kremer A., Petit R. J., 2003.** Checking the geographical origin of oak wood : molecular and statistical tools. *Molecular Ecology*, **12**, 1629-1636.
- Demesure B., Sodzi N., Petit R. J., 1995.** A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**, 129-131.
- Ducouso A. et Petit R. J., 1994.** Le geai des chênes, premier reboiseur européen. *Forêt-entreprise*, **97**, 60-64.
- Dumolin S., Demesure B., Petit R. J., 1995.** Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics*, **91**, 1253-1256.
- Dumolin-Lapègue S., Demesure B., Fineschi S., Le Corre V., Petit R. J., 1997.** Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, **146**, 1475-1487.
- Ellegren H., 2004.** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews*, **5**, 435-445.
- Gömöry D., Yakovlev I., Zhelev P., Jedinakova J., Paule L., 2001.** Genetic differentiation of oak populations within the *Quercus robur/Quercus petraea* complex in Central and Eastern Europe. *Heredity*, **86**, 557-563.
- Guyon J.-P., Bessière F., Faignaert O., Bois J.-C., 1996.** Evolution des formations boisées sur le territoire de deux communes du canton d'Aurignac (Haute Garonne) de 1942 à 1992. *Etudes et Recherches sur les Systèmes Agraires et le Développement*, **29**, 139-152.
- Hardy O. J., Vekemans X., 2002.** SPAGeDi : a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 618-620.
- Jarne P., Lagoda P. J. L., 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree*, **11**, 424-429.
- Kampfer S., Lexer C., Glössl J., Steinkellner H., 1998.** Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas*, **129**, 183-186.
- Kleinschmit J., Kleinschmit J. G. R., 2000.** *Quercus robur* – *Quercus petraea* : a critical review of the species concept. *Glasnik Za sumske Pokuse*, **37**, 441-452.
- Kremer A., Petit R. J., 1993.** Gene diversity in natural populations of oak species. *Annales de Sciences Forestière*, **50**, 203-207.
- Kremer A., Petit R. J. et Ducouso A., 2002.** Biologie évolutive et diversité génétique des chênes sessile et pédonculé. *Revue Forestière Française*, **2**, 111-130.

- Le Corre V., Machon N., Petit R. J., Kremer A., 1997.** Colonization with long-distance seed dispersal and genetic structure of maternally inherited genes in forest trees : a simulation study. *Genetical Research*, **69**, 117-125.
- Muir G., Fleming C. C., Schlötterer C., 2000.** Species status of hybridizing oaks. *Nature*, **405**, 1016.
- Nei M., 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *PNAS*, **70**, 3321-3323.
- Petit R. J., 2003.** Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist*, **161**, 151-164.
- Petit R. J., Csaikl U. M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., van Dam B., Deans J. D., Dumolin-Lapègue S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Olalde M., Pemonge M.-H., Popescu F., Slade D. Tabbener H., Turchini D., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., Kremer A., 2002a.** Chloroplast DNA variation in European white oaks, phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, **156**, 5-26.
- Petit R. J., Brewer S., Bordács S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaikl U. M., van Dam B., Deans J. D., Espinel S., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Popescu F., Slade D. Tabbener H., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., de Baulieu J.-L., Kremer A., 2002b.** Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, **156**, 49-74.
- Petit R. J., Csaikl U. M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., van Dam B., Deans J. D., Dumolin-Lapègue S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Olalde M., Pemonge M.-H., Popescu F., Slade D. Tabbener H., Turchini D., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., Kremer A., 2003.** Corrigendum to “Chloroplast DNA variation in European white oaks, phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations”. *Forest Ecology and Management*, **176**, 595-599.
- Petit R. J., Latouche-Hallé C., Pemonge M.-H., Kremer A., 2002c.** Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *Forest Ecology and Management*, **156**, 115-129.
- Petit R. J., Kremer A., Wagner D. B., 1993.** Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**, 122-128.
- Petit R. J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducouso A., Kremer A., 1997.** Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 9996-10001.
- Pons O., Petit R. J., 1995.** Haplodiv. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 462-470.
- Raymond M., Rousset F., 1995.** Genepop : population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Rousset F., 1996.** Equilibrium values of measure of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*, **142**, 1357-1362.
- Saintagne C., 2003.** Distribution des régions génomiques différenciant deux espèces proches : le chêne sessile (*Q. petraea*) le chêne pédonculé (*Q. robur*). *Thèse*, Université Henri Poincaré – Nancy I.
- Saintagne C., Bodénès C., Barreneche T., Pot D., Plomion C., Kremer A., 2004.** Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. *Heredity*, **92**, 20-30.
- Streiff R., Ducouso A., Lexer C., Steinkellner H., Gloessl J., Kremer A., 1999.** Pollen dispersal inferred paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.. *Molecular Ecology*, **8**, 831-841.