

RAPPORT MÉMOIRE FIN D'ÉTUDES

Année 2012

Géraldine BIDEAU

Différenciation des espèces du genre *Tristaniopsis* par approche
« code-barres ADN »

Dans le cadre du Projet
ECOMINE BIO TOP



**istom****ISTOM****Ecole supérieure d'Agro-Développement International**

32, Boulevard du Port F.-95094 - Cergy-Pontoise Cedex
tél : 01.30.75.62.60 télécopie : 01.30.75.62.61 istom@istom.net

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Différenciation des espèces du genre *Tristanopsis* par approche
« code-barres ADN »**



(Endemia, Tristanopsis calobuxus)

SOUTENU EN OCTOBRE 2012

BIDAU Géraldine

P98

Stage effectué à Nouméa, Nouvelle-Calédonie

Du 12/02/2012 au 12/08/2012

Au sein de : Institut Agronomique néo-Calédonien

Maître de stage : MAGGIA Laurent

Tuteur dans l'organisme d'accueil : MAGGIA Laurent

**istom****ISTOM****Ecole supérieure d'Agro-Développement International**

32, Boulevard du Port F.-95094 - Cergy-Pontoise Cedex
tél : 01.30.75.62.60 télécopie : 01.30.75.62.61 istom@istom.net

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Différenciation des espèces du genre *Tristaniopsis* par approche
« code-barres ADN »**

SOUTENU EN OCTOBRE 2012

BIDAU Géraldine

P98

Stage effectué à Nouméa, Nouvelle-Calédonie

Du 12/02/2012 au 12/08/2012

Au sein de : Institut Agronomique néo-Calédonien

Maître de stage : MAGGIA Laurent

Tuteur dans l'organisme d'accueil : MAGGIA Laurent

Résumé

Du fait de sa flore exceptionnellement riche et de son fort taux d'endémisme, la Nouvelle-Calédonie est classée parmi les 25 *hotspots* du monde. Cependant, pour faire face au développement de l'activité minière, elle se doit d'associer intérêt économique et préoccupation écologique. C'est dans ce cadre que se développent les projets de restauration des sites dégradés par l'exploitation des mines, tel le projet Ecomine-Biotop dans lequel s'insère la problématique de mon stage au sein de l'Institut Agronomique néo-Calédonien. L'objectif de mon stage consiste, à trouver un outil moléculaire permettant de différencier les espèces de *Tristaniopsis* (espèce de référence pour la revégétalisation) qui sont très proches phénotypiquement. Le but principal de ce travail est de permettre une meilleure identification des espèces protégées du genre *Tristaniopsis*. Nous avons donc réalisé une approche code-barres ADN avec l'utilisation de plusieurs loci. Nous avons réussi à discriminer neuf espèces sur douze avec les locus nucléaires ETS et ITS. Trois espèces ne se différencient pas les unes des autres, dont une espèce protégée. Les résultats suggèrent que l'utilisation d'une approche moléculaire pourrait être pertinente pour affiner la taxonomie des végétaux. La mise au point d'un outil basé sur cette approche moléculaire permettrait un véritable appui à la prise de décisions dans le cadre des projets de conservation de la biodiversité.

Mots-Clefs : conservation, espèces protégées, Nouvelle-Calédonie, outil moléculaire, *Tristaniopsis*

Summary

Because of its exceptionally rich flora and its high rate of endemism, New Caledonia is ranked among the top 25 *hotspots* in the world. However, in order to facing with the development of mining activity, New Caledonia must combine economic interest and environmental concern. In this context, projects for the restoration of sites degraded by mining, as the Ecomine-Biotop project, tend to be developed. The topic and aim of my internship at the Institute of Agronomy in New Caledonia is to find a molecular tool allowing differentiating species of *Tristaniopsis* (considered as a species of reference in revegetation) which have very similar phenotypes. The primary purpose of this research is to enable identifying protected species of *Tristaniopsis* genera. We therefore carried out a DNA bar coding using multiple loci. We managed to distinguish nine species out of twelve with nuclear loci ETS and ITS. Three species did not differ from one another, including one protected species. Results suggest that molecular approach could be appropriate to refine plant taxonomy. Such tool could be a real contribution to support decision-making relating to biodiversity conservation projects.

Key-Words : conservation, protected species, New Caledonia, molecular tool, *Tristaniopsis*

Resumen

A causa de su flora excepcionalmente rica y su alto nivel de endemismo, la Nueva Caledonia se posiciona entre los 25 primeros *hotspots* del mundo. Sin embargo, para hacer frente al desarrollo de la minería, la isla se debe de combinar interés económico y preocupación ambiental. En este contexto, aparecen proyectos para la restauración de los suelos degradados, tal como el proyecto Ecomine-Biotop. Mi misión durante mi práctica en el Instituto de Agronomía en Nueva Caledonia, es encontrar un herramienta molecular para permitir diferenciar entre la especies de *Tristaniopsis* (especie de referencia para la revegetación), que son muy similares fenotípicamente. La meta principal de este trabajo es permitir la identificación de las especies protegidas de *Tristaniopsis*. Así que usamos un metodo de código de barras para el ADN con el uso de múltiples loci. Observamos que podemos distinguir nueve especies sobre doce con loci nucleares ETS e ITS. Tres especies no difieren entre sí, una de ellas especie protegida. Los resultados nos llevan a preguntarnos si el uso de un enfoque molecular no sería más adecuado para redefinir la clasificación de la taxonomía de las plantas. Tal herramienta sería sin duda un verdadero apoyo a la toma de decisiones en el cuadro de proyectos relativos a la conservación de la biodiversidad.

Palabras Llaves: conservación, especies protegidas, Nueva-Caledonia, herramienta molecular, *Tristaniopsis*

Sommaire

Résumé	1
Liste des Tableaux	4
Liste des Illustrations	5
Liste des Abréviations.....	6
Remerciements	7
Introduction.....	8
Partie 1 : Contexte et présentation de la mission de stage.....	9
I. Contexte	10
I.1. La Nouvelle-Calédonie et sa biodiversité	10
I.1.1 La Nouvelle-Calédonie	10
I.1.2. La biodiversité en Nouvelle-Calédonie	11
I.2. Une biodiversité menacée.....	13
I.3. Gestion de la biodiversité en Nouvelle-Calédonie.....	14
I.4. Les acteurs de la gestion de la biodiversité.....	16
II. Projet de revégétalisation	18
II.1. Le Projet CNRT Ecomine-Biotop.....	18
II.2. Le volet 4 du projet : Diversité génétique de quelques espèces des genres <i>Tristaniopsis</i> et <i>Scaevola</i> dans une perspective de conservation et de restauration écologique.....	19
II.3. Ma mission, présentation de la problématique et méthodologie.....	20
Partie 2 : Matériel et Méthode.....	22
I. Matériel Végétal.....	23
I.1. Présentation du genre <i>Tristaniopsis</i>	23
I.2. Matériel végétal et échantillonnage	24
II. « Code-barres ADN » et choix des locus.....	26
II.1. « Code-barres ADN »	26
II.2. Choix des locus	27
III. Expérimentation en laboratoire.....	30
III.1. Broyage et Extraction d'ADN.....	30
III.2. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	30
III.3. Séquençage	31
III.4. Génotypage.....	31
IV. Préparation des données	32
IV.1. Préparation des séquences	32
IV.1.1. Nettoyage des séquences.....	32
IV.1.2. Traitement des séquences sur BioEdit.....	33
IV.2. Lecture des données issus du génotypage.....	33
V. Analyse des Résultats.....	33

V.1. Réalisation d'une base de données sur les caractères morphologiques, phénologiques et écologiques.....	33
V.2. Analyse des données du séquençage	33
V.2.1. Création d'une base de données de séquence sur fichier Excel.....	33
V.2.2. Analyse des données.....	34
Partie 3 : Résultats et Discussion	35
I. Résultats.....	36
I.1. Réalisation d'une base de données des caractères morphologiques des espèces <i>Tristaniopsis</i>	36
I.2. Analyse des séquences	36
I.2.1. Résultats du séquençage et Base de données	36
I.2.2. Analyse comparative du degré d'information obtenu par marqueur ...	36
I.2.3. Approche cladistique	38
I.2.4. ACP	40
I.2.5. Analyse Bayésienne	40
I.2.6. Marqueurs testés sur les espèces non différenciées.....	42
I.3. Analyse génotypique (<i>T.calobuxus</i> , <i>T.capitulata</i> et <i>T.yateensis</i>).....	42
I.3.1. Analyse cladistique, ACP et analyse Bayésienne.....	43
I.3.2. AMOVA.....	43
II. Discussion	45
Conclusion.....	50
Bibliographie.....	51
Table des annexes	54

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Locus utilisés pour le séquençage des <i>Tristaniopsis</i>	28
Tableau 2 : Locus microsatellites utilisés pour le génotypage des <i>Tristaniopsis</i>	29
Tableau 3 : Récapitulatif du nombre de contigs obtenus sur les principaux marqueurs.	36
Tableau 4 : Niveau d'information obtenue par locus.....	37
Tableau 5 : Résultats des marqueurs testés sur <i>T.calobuxus</i> , <i>T.capitulata</i> et <i>T.yateensis</i>	42
Tableau 6 : Résultat de l'AMOVA réalisé sur <i>T.calobuxus</i> , <i>T.capitulata</i> et <i>T.yateensis</i>	44
Tableau 7 : Résultat des paires de Fst	44

Liste des Illustrations

Figure 1 : Localisation de la Nouvelle-Calédonie.....	10
Figure 2 : Carte de répartition des 25 <i>hotspots</i> . Source : Meyers et al, 2000.....	11
Figure 3: <i>Tristaniopsis colabuxus</i>	23
Figure 4 : <i>Tristaniopsis guillainii</i> var. <i>guillainii</i>	23
Figure 5 : Carte de la répartition des <i>Tristaniopsis</i> échantillonnés	25
Figure 6 : Cladogramme de 12 espèces de <i>Tristaniopsis</i> réalisé avec la combinaison des locus ETS et ITS combinés.....	39
Figure 7 : ACP sans <i>T.minituflora</i> et <i>T.glauca</i> avec la combinaison des marqueurs ETS et ITS.....	40
Figure 8 : Graphique représentant la distribution du DeltaK en fonction du K nombre de groupe testé.....	41
Figure 9 : Représentation graphique de la répartition des individus obtenus par la démarche bayésienne pour K = 4 groupes.....	41
Figure 10 : ACP du génotypage des espèces <i>T.calobuxus</i> , <i>Tcapitulata</i> et <i>T.yateensis</i>	43
Figure 11 : Les différentes catégories utilisées par l'UICN	48

Liste des Abréviations

ACP: Analyse des composantes principales	%: pourcentage
ADN: acide désoxyribonucléique	m: mètre
ADNc: ADN chloroplastique	km: kilomètre
ADNmt: ADN mitochondrial	km ² : kilomètre carré
ADNn: ADN nucléaire	°C: degrés
AMOVA: Analyse des Variances Moléculaires	ha: hectare
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool	
Cirad: Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement	
CNRS: Centre national de la recherche scientifique	
CNRT: Centre National de Recherche Technologique	
COXI: Cytochrome c Oxydase 1	
ddntp: nucléotides terminateurs de chaînes	Ni: Nickel
dntp: mélange des quatre désoxyribonucléotides	Cr: Chrome
IAC: Institut Agronomique néo-Calédonien	Co: Cobalt
IRD: Institut de Recherche pour le Développement	Fe: Fer
IUCN: Union Internationale pour la Conservation de la Nature	P: phosphore
PCR: Amplification par réaction de polymérisation en chaîne	K: potassium
PIB: Produit Interieur Brut	N: azote
SNP: Single –Nucleotide Polymorphism	
UNC: Université de Nouvelle-Calédonie	
Unesco: L'Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture	

Remerciements

Dans un premier temps je tiens à remercier Mr Laurent L'Huillier, Directeur général de l'IAC (Institut Agronomique néo-Calédonien) pour m'avoir accueilli au sein de l'IAC.

Un merci, tout particulier à Mr Laurent Maggia, chercheur au Cirad, responsable de l'axe II « diversité biologique et fonctionnelle des écosystèmes terrestres » et avant tout mon encadrant scientifique, qui m'a accompagné tout au long de mon stage et transmis son goût pour la recherche. Il a su se montrer disponible tout le long de mon stage, et surtout patient. Mais il a aussi permis que je réalise ce stage dans un cadre aussi chaleureux que rigoureux.

Je remercie aussi Anthony Pain et Alexandre Bouarate mais également le reste de l'équipe du CRES (IAC), pour leur disponibilité pour les sorties terrain. Ils m'ont permis de me familiariser avec le milieu minier de la Nouvelle-Calédonie et surtout à reconnaître mon espèce dans les débuts.

Un grand merci à l'équipe IAC de Nouméa, je pense à Laurent Millet, à Anthony Ollivier, à Fabian Carriconde, à Julie Goxe et à Laure Barrabé, sans qui la présente étude n'aurait pu être réalisée. Merci, de m'avoir enseigné les techniques de manipulations en laboratoire, la manipulation des logiciels et d'avoir pris le temps de répondre à mes questions, surtout concernant la rédaction de ce mémoire. Vous m'avez fait partager vos connaissances, vos compétences et vos conseils, ce qui m'a bien aidé du point de vu de ma formation. Mais surtout merci pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe comme l'une des votre, et d'avoir contribué au bon déroulement de mon stage autant au point de vu professionnelle, qu'humain.

Introduction

Actuellement la société humaine se développe au détriment de l'environnement. Nous assistons à une perte de biodiversité. Le taux d'extinction des espèces est estimé à 100 à 1000 fois plus important que par le passé, deux tiers des espèces de plantes et d'animaux pourraient disparaître en l'espace de 50 ans (Pimm *et al.*, 1995).

La conservation de la biodiversité constitue un enjeu social, politique, économique et scientifique majeur. Un des principaux objectifs pour la conservation de la biodiversité est de parvenir à déterminer la place et l'importance de la biodiversité afin qu'elle devienne un critère de décision dans l'organisation des sociétés humaine. C'est ainsi que Myers *et al.* (2000) ont mis en évidence 25 zones qu'ils considèrent comme des zones prioritaires pour la conservation, aussi appelés *hot-spot*. Ce critère est basé sur le taux de richesse spécifique, le taux d'endémisme et le danger de disparition de ces espèces.

Avec 3 350 espèces végétales, un taux d'endémisme de 74% (Meyers *et al.*, 2000) et à cause d'une forte dégradation des sols par l'exploitation minière, la Nouvelle-Calédonie fait partie d'une de ces zones *hot-spot*.

L'exploitation minière est implantée depuis des nombreuses années en Nouvelle-Calédonie, et le développement industriel de l'île c'est fait autour du minerai depuis sa découverte en 1864. Le paysage a été fortement modifié et impacté par l'exploitation minière. Les partis politiques ont pris pleinement position dans l'organisation de l'activité minière depuis les Accords de Nouméa en 1998. L'augmentation de la capacité d'exploitation, est inquiétante du fait de ses impacts néfastes sur l'environnement, notamment sur la destruction de la flore originale et spécifique des massifs ultrabasiques.

C'est dans ce contexte que l'IAC a répondu à l'appel d'offre du CNRT Ecomine-Biotp, en collaboration avec d'autres organismes de recherche. L'un des objectifs de ce projet concerne l'étude de la diversité génétique d'espèces minières notamment du genre *Tristaniopsis*, dans une perspective de conservation et de restauration des milieux.

L'objectif du stage a été de développer un outil moléculaire permettant dans un premier temps de différencier les espèces de *Tristaniopsis* protégées, et dans un deuxième temps de différencier toutes les espèces les unes des autres. Nous avons donc développé une approche « code-barres ADN », permettant de créer une base de donnée moléculaires de toutes les espèces de *Tristaniopsis* pour différents marqueurs moléculaires.

Dans le cadre de cette mission il a été réalisé un échantillonnage des espèces de *Tristaniopsis*, un travail en laboratoire utilisant des techniques biomoléculaires et une analyse des résultats.



1 *Tristaniopsis calobuxus*

2 Forêt sèche de Nouvelle-Calédonie

Partie 1 : Contexte et présentation de la mission de stage



3 Maquis minier de Nouvelle-Calédonie

I. Contexte

I.1. La Nouvelle-Calédonie et sa biodiversité

I.1.1 La Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie est un archipel qui se situe dans le Sud-Ouest de l'océan Pacifique, entre les 18^e et 23^e degrés de latitude Sud et entre les 163^e et 168^e degrés de longitude Est, 1500 km à l'Est de l'Australie et 1700 km au Nord de la Nouvelle-Zélande (Figure 1). L'archipel, d'une superficie de 19 100 km², est constitué d'une île principale nommée la Grande Terre qui s'étend sur environ 500 km de long et 50 km de large, et d'un ensemble d'îles de plus petites taille, les Belep au Nord, l'île des Pins au Sud et les îles Loyauté à l'Est : Ouvéa, Lifou, Tiga et Maré. (Jaffré, 1993). La Grande Terre est traversée du Nord au Sud par une chaîne de massifs montagneux dont les plus hauts sommets s'élèvent à 1 629 m (le mont Panié) et 1 618 m (le mont Humboldt). Son relief oscille entre 500 et 1 600 m sur 80% du territoire. L'archipel est entouré d'un lagon de 23 400 km² délimité par une barrière de récifs coralliens inscrite au patrimoine mondial de l'Unesco. La Nouvelle-Calédonie présente un climat tropical humide. Il y existe deux saisons : une période chaude de novembre à avril (période cyclonique) et une période fraîche de mai à septembre (saison plus sèche). Les températures varient entre un minimum de 5°C et un maximum de 37°C en fonction de l'altitude, avec des moyennes annuelles de l'ordre de 23°C à 25°C. (www.meteo.nc/climat/climat-en-nc).



Figure 1 : Localisation de la Nouvelle-Calédonie

Sur le plan politique, la Nouvelle-Calédonie est une collectivité française d'outre-mer dont le chef-lieu est Nouméa. Le territoire est subdivisé en trois provinces : les Provinces Sud et Nord qui coupent la Grande Terre dans sa largeur, et la Province des îles Loyauté.

Sa population s'élève à 245 580 habitants en 2009 (Isee-NC, 2009) composé de 40,34% Kanaks, 29,2 % d'Européens et de 34,46 % d'autres ethnies minoritaires (les Wallisiens et Futuniens, les Asiatiques, les Tahitiens et Ni-vanuatais).

La principale activité économique est l'activité minière et industrielle de nickel qui tient une place très importante dans l'économie de la Nouvelle-Calédonie. En effet, cette activité représente un PIB de 6 302 millions d'euros en 2010 (<http://www.croixdusud.info/economie/econ.php>), dont 34% concernent les services au sens large et 5% proviennent du secteur minier, secteur qui, il est utile de le rappeler, exploite 25% de la réserve mondiale de nickel. Le poids de ces deux secteurs est capital car le marché intérieur demeure très restreint compte tenu d'un taux d'ouverture de moins de 32% (<http://www.croixdusud.info/economie/econ.php>). Il est donc indispensable que la politique environnementale prenne en compte l'importance de l'activité minière dans l'économie locale.

I.1.2. La biodiversité en Nouvelle-Calédonie

Historiquement le socle géologique calédonien est un fragment du Gondwana proche de l'Australie, dont il a été séparé et se trouve dans sa position actuelle depuis environ 65 millions d'années (Lowry, 1996). En raison de son isolement géographique et de l'absence d'importantes variations climatiques (Morat, 1993), la pression sélective sur les plantes et les microorganismes associés peut être considérée comme hautement stable et constante depuis au moins 30 millions d'années (Paris, 1981). Ces caractéristiques établissent la Nouvelle-Calédonie en tant que système modèle unique permettant de comprendre le rôle de la contrainte du sol sur la structuration et la dynamique de la plante et les micro-organismes associés (bactéries et champignons mycorhiziens) de la biodiversité.

La biodiversité est la « *variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Elle inclut la variabilité génétique à l'intérieur des espèces et leurs populations, la variabilité des espèces et leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associées et leurs interactions, et celles des processus écologiques qu'ils influencent ou dont ils sont les acteurs* » (18^{ième} Assemblée Générale de l'IUCN, 1998).

La Nouvelle-Calédonie est classée parmi les 25 *hotspots* (Figure 2) pour la préservation de la biodiversité terrestre planétaire. Elle possède en effet une flore globale estimée à environ 3 350 espèces et un taux d'endémisme de 74% (Meyers et al, 2000).

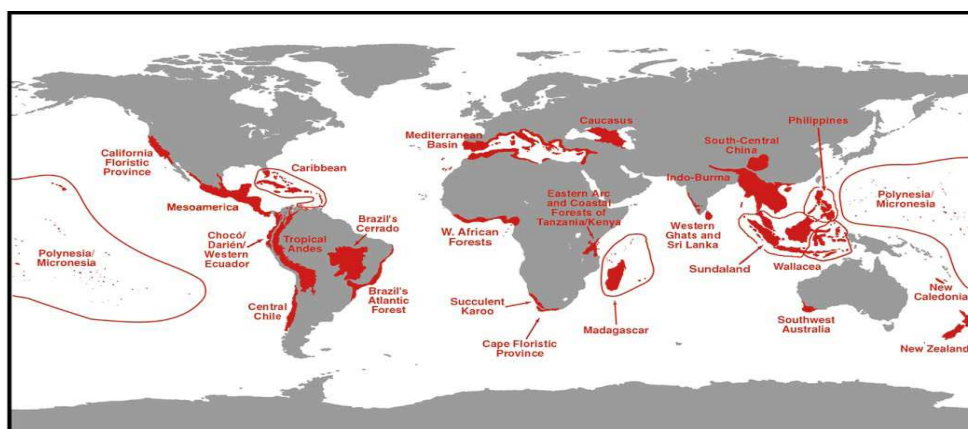


Figure 2 : Carte de répartition des 25 *hotspots*. Source : Meyers et al, 2000

Son climat sub-tropical chaud et humide, son isolement géographique, ses substrats géologiques et la grande variété de ses sols participent à la richesse et à l'originalité de la flore néo-calédonienne (Jaffré, 1980). Deux sortes de végétation sont présentes sur l'île : la végétation native qui occupe plus de 50% du territoire, avec plus de 3 000 espèces répertoriées et un taux de 76% d'endémicité et la végétation exotique occupant pour sa part moins de 50% du territoire, avec quelques centaines d'espèces.

On peut noter la présence de plusieurs roches-mères, ce qui signifie que l'on trouve une multitude de sols. Les principaux sols sont les sols ferrallitiques, les vertisols et les sols brunifiés. On distingue deux roches mères majoritaires : la roche volcanique et la roche ultramafique (Guillon J.H, 1975). Un tiers de la surface de l'île est composé de substrat ultramafiques présentant une forte concentration de nickel et de métaux lourds (Ni, Cr, Co, Fe...) qui peuvent s'avérer toxiques pour les plantes (Guillon J.H, 1975). Ces sols sont aussi caractérisés par la présence d'une faible concentration en éléments essentiels (P, K, N...) (Guillon, 1975), et par la faible disponibilité en eau pour les plantes (L'Huillier *et al.*, 2010). Par ailleurs, plusieurs études démontrent que ce sol est en grande partie à l'origine des grandes particularités floristiques du Territoire où l'on y recense de forts taux d'endémisme sur des superficies restreintes et très localisées (Jaffré *et al.*, 1980 ; Jaffré *et al.*, 1987, Jaffré *et al.*, 1997 ; Morat *et al.*, 1999). Par conséquent la végétation des substrats provenant de roches ultramafiques se distingue nettement de la végétation de l'ensemble des autres substrats géologiques. Cette particularité contraint la flore à se spécialiser et à s'adapter (Jaffré, 1996).

Plusieurs types de formations végétales peuvent être distingués sur substrat ultramafique : la forêt dense humide, la forêt sclérophylle (forêt sèche) et le maquis. (Jaffré, 1980).

La richesse floristique des sols ultramafiques rassemble approximativement 2 150 espèces dont 82% sont endémiques. Strictement liée à ces terrains, elle représente 35% de la flore autochtone de l'archipel et 45,5% de sa flore endémique totale (Jaffré *et al.*, 2010).

Parmi cette flore, la famille des Myrtaceae est la plus riche en espèces présentes sur terrains miniers. Sur 250 espèces autochtones, plus de 180 vivent sur sol à substrat ultramafique (L'Huillier *et al.*, 2010). La connaissance de cette flore au niveau biologique et phylogénétique est très incomplète.

En plus de constituer une réelle richesse naturelle, cette biodiversité présente de véritables dimensions sociale, culturelle et économique. En effet, plus du quart de la population néo-calédonienne vit en tribu (Isee-NC, 2012), en connexion avec la nature. Cette partie de la population vit principalement de ses récoltes (jardins), de la chasse et de la pêche et est donc particulièrement dépendante de son milieu naturel. Depuis les « accords de Nouméa » signés en 1998, il est convenu d'intégrer l'étude sociale des populations, vivant dans les zones ultramafiques, dans les projets de

recherche portant sur la revégétalisation. Ainsi, l'observation de l'activité minière est-elle désormais élargie à son impact sur la société humaine. De plus, certaines plantes sont utilisées dans la médecine traditionnelle (c'est en particulier le cas de l'aloès, de la fougère arborescente, du niaouli, ...). Quelques projets de recherche se concentrent sur la possibilité d'utiliser ces plantes à des fins médicales, tant pour le marché calédonien que national ou international (De la plante au médicament, Les dossiers thématique de l'Institut de Recherche pour le Développement).

I.2. Une biodiversité menacée

Toutes les menaces existantes et les dégradations subies par l'ensemble des écosystèmes fragiles de la Nouvelle-Calédonie sont principalement liées aux activités anthropiques (Morat *et al.*, 1999).

Les premiers occupants de la Nouvelle-Calédonie (regroupant les Kanaks, les colons...) amenèrent la technique de défriche par le feu afin de pouvoir créer l'espace nécessaire à la construction de leur habitat et au développement de leur élevage et de leurs cultures. Nombreux pratiquaient de surcroît la chasse et la cueillette (pour s'alimenter, mais aussi pour se soigner ou pratiquer des rites ancestraux). Toutes ces actions sur l'environnement ont profondément modifié l'environnement paysagé de la Nouvelle-Calédonie. La brusque augmentation de la population amenée par la colonisation a provoqué une amplification de ces effets, avec son cortège d'activités agro-pastorales, d'exploitation forestière et d'exploitation minière (Morat *et al.*, 1999).

Selon Morat, les principaux facteurs responsables de la dégradation de la biodiversité suivant l'importance de leur impact sont dans l'ordre : le feu, l'activité minière, les activités agropastorales et la surexploitation de certaines espèces qui engendre la formation d'une végétation de type secondaire.

Les feux : lors de feux répétés on constate un appauvrissement de la flore. Les terrains concernés deviennent des landes à fougère-aigle. Ils contribuent également à la régression des massifs forestiers au profit du maquis ainsi qu'à la fragmentation des milieux (en détruisant par exemple les corridors).

La dégradation par l'activité minière : la fragmentation des milieux miniers et la perte de diversité biologique spécifique constituent les principaux effets négatifs de l'exploitation minière sur ces milieux naturels. On observe des effets directement et indirectement liés à cette exploitation.

Les effets directs sont principalement le fait de la destruction du couvert végétal des maquis par l'exploitation qui ne laisse en fin d'activité qu'un sol nu profondément décapé de ses horizons supérieurs, exposé aux vents, à la sécheresse et aux fortes précipitations saisonnières. Ces sols sont donc propices à de fortes érosions (L'Huillier *et Jaffré*, 2010). Cette dégradation peut entraîner la destruction et la disparition de populations complètes de certaines espèces natives. Il n'est pas rare

de voir des surfaces décapées depuis de nombreuses années sans aucune colonisation spontanée de la végétation.

Les effets indirects sont du au fait que les sites miniers en Nouvelle-Calédonie sont situés dans la zone du littoral, contribuant ainsi à un report massif des particules de sol qui ont des répercussions profondes sur l'écosystème de la lagune voisine. Par conséquent, l'état de la mangrove, du lagon et des coraux dépend directement de la prise en charge de l'environnement des sites miniers.

Les activités agropastorales : celles-ci s'exercent presque exclusivement au détriment des forêts sèches (dont subsiste seulement 1%). En effet, après défrichage, brûlis et implantation de pâturages intervient un broutage sélectif et excessif qui rend difficile la régénération. De surcroît, le bétail importé (comme les cochons, les cerfs, les chats...) devient rapidement envahissant pour la faune locale (Morat *et al.*, 1999).

Le prélèvement abusif et sélectif est pour sa part pratiqué à des fins médicales, traditionnelles, voire rituelles, mais aussi pour les besoins de menuiserie et pour la construction de cases... (Morat *et al.*, 1999). Il concerne surtout les forêts humides et les maquis.

L'importance de ces différents impacts sur l'environnement a fait l'objet d'une véritable prise de conscience en de la Nouvelle-Calédonie. C'est ainsi que plusieurs dispositifs ont été mis en place afin de limiter les effets néfastes de ces impacts.

I.3. Gestion de la biodiversité en Nouvelle-Calédonie

La gestion de la biodiversité regroupe deux grands principes : la conservation (*ex-situ*, *in-situ*, protection, préservation) et la restauration des zones dégradées (revégétalisation, renforcement de population,...).

Il est donc préconisé de préserver les sites regroupant une forte biodiversité, de produire des plants (endémiques, adaptés à l'environnement minier) et de les réinsérer au sein d'aires protégées. Les surfaces nues générées par des activités d'exploitation anthropique sont peu propices à la régénération naturelle et ne possèdent pas un bon potentiel de revégétalisation avec l'utilisation d'espèces exotiques. Pour respecter au mieux l'état originel des sites concernés et afin d'obtenir un résultat adapté, il est nécessaire d'évaluer la biodiversité forestière par une approche estimative de la diversité génétique des espèces qui la compose et par la suite, de maintenir et favoriser cette diversité pour assurer les flux de gènes essentiels à la survie des populations résiduelles (Morat *et al.*, 1999).

Une véritable politique environnementale a été mise en place. Celle-ci est soutenue par un certain nombre de textes fondamentaux, le code de l'environnement (Délibération N° 2008-306/APN du 24 octobre 2008) ou encore le code minier. Par

ailleurs, les mines ont établi une charte des bonnes pratiques minières. C'est ainsi que certains des travaux d'aménagement, comme par exemple la réalisation de barrages rocheux pour retenir les déblais, ont été réalisés dans le but de limiter les rejets de l'exploitation minière. A cela s'ajoute la mise en place de dispositifs de protection des espaces naturels par la délimitation d'aires naturelles protégées et la constitution d'une liste d'espèces à conserver. De plus, les sociétés minières ont la double obligation de produire une étude d'impact avant exploitation et de réparer les dégradations dues à l'activité minière.

La revégétalisation vise à reconstituer un couvert végétal d'un terrain dénudé par l'action de l'homme ou par l'effet de catastrophes naturelles. Les espèces végétales utilisées devraient être adaptées aux conditions du site à revégétaliser et suffisamment diversifiées (Society for Ecological Restoration, 2004). Ce terme est souvent abusivement employé pour parler de restauration écologique (rétablir les écosystèmes naturels) ou encore réhabilitation.

Initialement, les travaux de revégétalisation n'étaient pas exigés en raison des difficultés de réalisation sur des sols impropre à la croissance des végétaux. Ce n'est plus le cas aujourd'hui, suite à une prise de conscience de la part des décideurs locaux. Aussi ce choix, accompagnée des travaux de recherche approfondis visant à proposer des solutions basées sur l'utilisation d'espèces endémiques adaptées (Jaffré *et al.*, 1997), se développe et s'amplifie.

Les premiers essais de revégétalisation ont débuté vers 1971. Jusqu'aux années 90, ils sont demeurés expérimentaux. Des inventaires ont été réalisés ainsi que des expérimentations *ex-situ*, afin de mettre en évidence les espèces endémiques potentiellement utilisables pour revégétaliser. Ces études ont finalement ouvert la voie en 1995 aux premières véritables actions de revégétalisation. Celles concernant les espèces endémiques typiques des terrains miniers, permettent désormais de recoloniser durablement les sites miniers (L'Huillier *et al.*, 2010).

Les années 2000-2006 ont été marquées par un dynamisme nouveau des acteurs miniers, notamment des grands groupes, mais également des collectivités locales en matière de restauration de site minier. C'est également durant ces années que certaines techniques ont pu évoluer. (Ayrault, 2001).

Les trois principales techniques de revégétalisation permettant d'initier les processus de restauration d'un site dégradé sont la plantation, l'ensemencement et la régénération naturelle. La première consiste en l'apport de jeunes plants élevés en pépinières. C'est une méthode coûteuse en main d'œuvre mais les résultats sont rapidement visibles et fiables. La deuxième technique consiste au dépôt de graines directement au sol, la technique la plus répandue étant l'ensemencement hydraulique (projection d'un mélange de mulch, de colle végétale, de nutriments, d'engrais minéraux et organiques et de semences de diverses espèces) Les résultats de cette

technique sont assez aléatoire et le temps d'implantation est long. Enfin la dernière technique, utilise le *topsoils* pour une régénération naturelle. Cette méthode utilise ma technique de l'implantation et le développement de plantes à partir de graines, rejets de souche, propagules ou de boutures. Le *topsoil* est un terme désignant la partie superficielle du sol dans laquelle l'activité biologique est la plus active, renfermant notamment semences et spores (L'Huillier *et al.*, 2010). La régénération du sol dépend beaucoup de la ressource déjà existante dans ce sol. Elle permet l'implantation naturelle d'espèces indigènes parfaitement adaptées et enrichie la diversité spécifique.

Aujourd'hui, les stratégies mises en œuvre par les sociétés minières et les organismes de recherche en Nouvelle-Calédonie préconisent une diversification des espèces locales utilisées, en utilisant en particulier des plantes endémiques pionnières. De façon à réduire les coûts très élevés de la méthode de plantation, des études ont été entreprises pour tenter de remplacer les plantations manuelles par l'ensemencement en utilisant le plus possible la technique du semis hydraulique. En 2000 déjà, plus de la moitié des surfaces revégétalisées l'avaient été par la technique du semis hydraulique. L'utilisation des *topsoils* conviendrait pour amorcer la reconstitution de l'écosystème originel mais c'est une technique encore peu développée. Des résultats intéressants ont été observés à l'étranger (Australie, Europe, Etats-Unis, Afrique...) (Amir *et al.*, 2009).

I.4. Les acteurs de la gestion de la biodiversité

Le gouvernement, les provinces et les collectivités

Les pouvoirs publics ont démontré leur volonté de poursuivre la réhabilitation des anciennes mines délaissées. Le gouvernement et les provinces sont pour leurs part responsables du soutien du bon fonctionnement de l'industrie minière, responsabilité qu'il exerce de manière indirecte en soutenant financièrement les programmes de recherche et en mettant en place des réglementations fiscales avantageuses pour l'implantation des grandes exploitations minières. Aujourd'hui, grâce aux transferts de compétences consentis à la Nouvelle-Calédonie, ce sont les provinces qui sont détentrices de la compétence environnementale et qui doivent par conséquent gérer et orienter leurs politiques de réhabilitation des terrains miniers, de préservation et de conservation des ressources biologiques et écologiques.

Les politiques environnementales sont apparues récemment, faisant l'effet d'une sorte de « rattrapage ». Assurément, la question de l'environnement n'a pris de l'importance en termes de politique publique que depuis quelques années, et le retard accumulé est considérable. Un exemple frappant est par exemple quelques mois à peine avant le dépôt de la demande de l'inscription des lagons au patrimoine mondial, on y déversait encore des huiles usagées, activités polluantes non contrôlées... (Rapport de l'atelier 6, environnement et cadre de vie, Nouvelle-

Calédonie 2025 : Schéma d'Aménagement et de Développement de la Nouvelle-Calédonie, Mr Yves Magnier).

L'implication des sociétés minières

Ces dernières doivent concilier les projets d'extension progressive de l'activité minière afin d'augmenter la production pour répondre à la demande sur le marché mondial et les projets de restauration des sols. Pour cela les mines s'engagent à respecter le code minier qui régit l'ouverture et la surveillance des mines à ciel ouvert et doivent s'impliquer dans les projets de restaurations. C'est ainsi qu'elles financent de nombreux projets de revégétalisation.

Les organismes de recherche et autres

Ces derniers travaillent en collaboration et en partenariat avec d'autres acteurs sur le thème de la préservation de la biodiversité calédonienne et de la restauration des milieux :

- **L'Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC)** est un organisme de recherche Calédonien qui a pris suite au mandat de gestion du Cirad. C'est un organisme de recherche au service du développement rural. Cet établissement public est placé sous le contrôle des trois Provinces, du gouvernement de la Nouvelle Calédonie et de l'Etat français. L'IAC est divisé en trois axes de recherche (Axe I : Connaissance et Amélioration des Agrosystèmes, Axe II : Diversités Biologiques et Fonctionnelles des Ecosystèmes Terrestres et l'Axe III : Ruralité et Politiques Publiques). L'institut se compose de six centres de recherche et d'expérimentation répartis sur l'ensemble du territoire. Il oriente ses programmes de recherche exclusivement sur la restauration de sites dégradés, sur la connaissance et la gestion d'espèces animales et végétales envahissantes, sur la connaissance et la conservation de la faune et de la flore sauvage endémiques ainsi que sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes.

- L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Nouvelle-Calédonie, dont les recherches ciblent particulièrement les thématiques suivantes : les écosystèmes et ressources naturelles (biodiversité marine et terrestre), le changement climatique et aléas naturels, les enjeux sociétaux et la santé.

- L'Université de Nouvelle-Calédonie intervient à travers deux laboratoires sur la connaissance, connaissance des la biologie des plantes, des sols et microorganismes, des biomolécules et de l'écologie marine.

Pour autant, en dépit d'une indiscutable prise de conscience par tous les acteurs concernés, confirmée par de véritables actions de réhabilitation de surfaces minières, les surfaces revégétalisées demeurent négligeables par rapport aux surfaces décapées. De 1971 à 2008 environ 296 ha de terrains miniers ont fait l'objet de

travaux de revégétalisation avec la plantation de plus de 1 083 millions de plants. La progression est d'environ 20 à 30ha par an (Laroche, 2011). Mais les surfaces dégradées sont bien plus nombreuses et l'activité minière continue sa progression. En 2007 environ 20 000 ha de sols nus se sont vus dégradés par l'activité minière (ce qui représente 1,2% de la surface du territoire). Le rythme de dégradation entre 2003 et 2006 a été de 30 à 40ha par an (Laroche, 2011).

II. Projet de revégétalisation

II.1. Le Projet CNRT Ecomine-Biotop

Le CNRT Nickel et son environnement est un groupement d'intérêt public, qui a pour objet la mise en commun et la gestion de moyens pour réaliser des programmes de recherche ou de développement technologique, pour une exploitation durable des ressources minières compatible avec la préservation de l'environnement naturel et humain de la Nouvelle-Calédonie.

L'utilisation du *topsoil* comme méthode de restauration des sites miniers dégradés est encore peu répandue en Nouvelle-Calédonie. Malgré les résultats plutôt encourageants des expérimentations dans d'autres pays (cf Partie I.I) ne sont pas extrapolables en Nouvelle-Calédonie car les sols miniers ultrabasiques et la flore associée sont différents (Amir et al.,2009). La connaissance concernant le potentiel du *topsoil* en Nouvelle-Calédonie pour la restauration écologique des sites miniers demeure à ce stade encore très limitée. C'est dans ce contexte que l'IAC, comme d'autres organismes (Cirad, IRD, CNRS, UNC ou encore le SIRAS (organisme privé)) ont répondu à l'appel d'offre du CNRT sur le «Nickel et son environnement » et ont conditionné le projet CNRT Ecomine-Biotop.

L'appel à projet Ecomine a pour objet : la caractérisation et le fonctionnement de sols de surface (*topsoils*), d'espèces végétales et des mycorhizes associés, des maquis miniers de Nouvelle-Calédonie, pour une application à la restauration écologique des terrains dégradés. Le projet est donc centré sur l'étude du fonctionnement des *topsoils* afin d'aboutir à des recommandations pratiques sur les méthodes de leur gestion de mycorhization des plantes et de gestion de la biodiversité génétique pour la restauration écologique pour la restauration écologique. (Source : Site CNRT Nickel et son environnement, http://www.cnrt.nc/index.php?page=attribue_details&attr_id=11&attr=2&year=2009&month=&curpage=).

C'est dans une approche multidisciplinaire (botanique, écologique, pédologique, géochimique, génétique, biologie moléculaire, microbiologique) que le projet rassemble plusieurs équipes de recherche. Des espèces de plantes, mycorhizes, microorganismes et systèmes symbiotiques ont été choisis comme modèles d'étude dans le but de mieux comprendre l'organisation actuelle des écosystèmes sur sols ultramafiques et mieux appréhender leur dynamique spatiale.

Le projet comporte quatre volets :

- Volet 1 : Caractérisation du *topsoil* et de son évolution pendant son stockage avec suivi du potentiel séminal, du potentiel mycorhizogène, de l'activité microbienne et de la dynamique des métaux en relation avec l'activité microbienne.
- Volet 2 : Approfondissement des connaissances et utilisation des champignons mycorhiziens à arbuscule et ectomycorhiziens (diversité, potentiel, effets...)
- Volet 3 : Etude de la dynamique des métaux potentiellement toxiques et du devenir de la matière organique et de quelques éléments minéraux.
- Volet 4 : Etude de la diversité génétique de quelques espèces de *Tristaniopsis* et *Scaevola* dans une perspective de conservation et de restauration des milieux.

Ma mission de stage à l'IAC avec l'équipe de l'axe II (Diversités Biologiques et Fonctionnelles des Ecosystèmes Terrestres) s'insère dans le 4^{ième} volet de ce projet.

II.2. Le volet 4 du projet : Diversité génétique de quelques espèces des genres *Tristaniopsis* et *Scaevola* dans une perspective de conservation et de restauration écologique

Afin de respecter au mieux l'état originel des sites concernés, il est nécessaire d'évaluer la biodiversité forestière par une approche estimative de la diversité génétique des espèces qui la composent et par la suite, de maintenir et favoriser cette diversité pour assurer les flux de gènes essentiels à la survie des populations résiduelles.

Parmi les espèces minières calédoniennes, celles des genres *Tristaniopsis* et *Scaevola* sont particulièrement bien représentées. C'est pourquoi elles ont été choisies pour cette étude.

Dans le but d'optimiser leur emploi dans les campagnes de restauration, il convient d'approfondir nos connaissances sur leur dynamique spatiale (effet de l'impact de la fragmentation des milieux) et leur dynamique temporelle, en mettant en évidence, s'il y a lieu, l'érosion dans le temps de la diversité génétique que les populations naturelles peuvent subir en milieu minier.

L'organisation du volet 4 du projet CNRT Ecomine se divise en plusieurs tâches :

- Tâche 1: Etudes de la diversité génétique des populations de *Tristaniopsis* et de *Scaevola*.

Il s'agit d'évaluer la diversité génétique des populations de *Tristaniopsis* et de *Scaevola* présentes sur des sites miniers impactés de "référence", pour les comparer

à celles observées à l'échelle du territoire. Cette tâche permettra d'estimer l'impact de l'exploitation minière sur leurs diversités génétiques et leur évolution temporelle. Ces niveaux de diversité génétique seront définis à partir de l'analyse de la diversité alléliques de locus variables (microsatellites) à identifier pour chacune des espèces étudiées.

- Tâche 2 : Etudes de descendance.

Conduire des études de descendance dans le but d'identifier les distances de pollinisation de l'espèce qui permettront de définir les écarts maxima entre deux populations, ou plantations, favorisant les flux de gènes entre elles.

- Tâche 3 : Identification des distances de dissémination des graines.

A partir des études de démo-génétique faites sur les populations modèles ainsi que celles conduites sur la structuration de la diversité génétique à l'échelle du territoire, il s'agira de retracer un modèle de dynamique spatiale susceptible d'estimer les distances de dissémination de graines pour chacune des espèces considérées.

- Tâche 4 : Outil moléculaire d'identification des différentes espèces calédoniennes de *Tristaniopsis*.

A l'échelle du territoire et de toutes les espèces de *Tristaniopsis*, conduire une approche *barcoding* permettant de différencier entre elles les différentes espèces de *Tristaniopsis* présentes en Nouvelle-Calédonie.

II.3. Ma mission, présentation de la problématique et méthodologie

Le thème de mon stage regroupait deux objectifs : l'étude de la structuration de la diversité génétique inter-génération (tâche 2) à l'échelle de deux sites et l'élaboration de marqueurs moléculaire permettant d'identifier les différents taxons du genre *Tristaniopsis* en Nouvelle-Calédonie (tâche 4).

- Etude de la descendance sur deux sites et sur l'espèce *T.calobuxus*.

L'identification d'une vingtaine de reproducteurs a été faite sur deux sites (Tontouta et Crève-Cœur). La récolte des graines est effectuée sur ces vingt pieds-mère afin d'élever en pépinière une trentaine de descendance par pied-mère. L'analyse génétique des descendance et des pieds-mères devra être effectuée, et le profil des pères déduit par différence. Il s'agira d'analyses classiques de génétique des populations (fréquences alléliques, indices de diversité, indices de distance génétiques, ...) conduites à partir des profils alléliques (génotypes) individuels obtenus.

La création d'une banque microsatellite a permis l'identification et le développement de 43 paires d'amorces microsatellites. Sur ce total cinq couples d'amorces

facilement amplifiables et polymorphes ont été retenus pour mener l'étude (B03, B06, E05, A10a et D03).

A la suite de soucis de germination (70% des graines n'ont pas germé et les 30% restant n'ont pas survécu lors du repiquage), aucun descendant n'a survécu. Nous avons donc pu réaliser le génotypage seulement des pieds-mère. Le protocole de germination a été revu pour la suite de l'étude pour l'an prochain (car il faut attendre la prochaine période de floraison afin de récolter de nouvelles graines).

J'ai donc fait le choix de ne pas détailler dans ce mémoire cette mission, et de détailler ma deuxième mission qui traite d'une problématique assez différente.

- Identification moléculaire spécifique à chaque espèce.

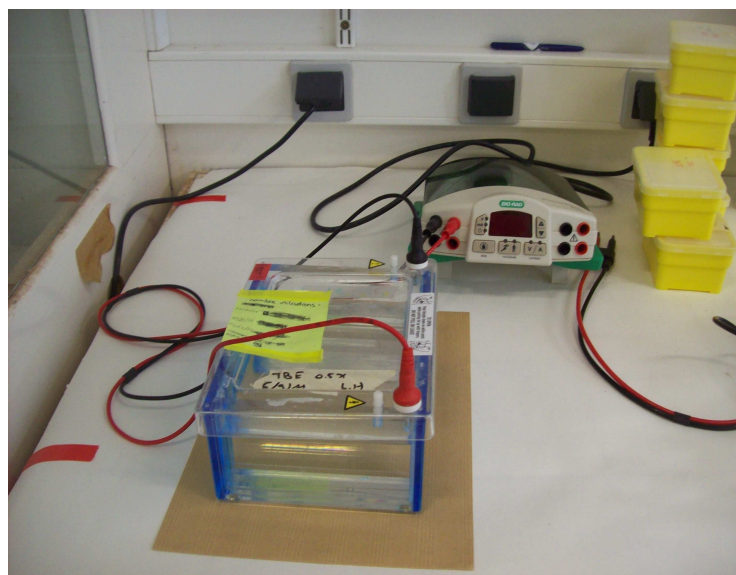
Cette identification par outil moléculaire est une solution prometteuse permettant de contourner la difficulté d'identification des différentes espèces de *Tristaniopsis* quand les plantes ne sont pas en fleur, où qu'elles sont trop jeunes pour l'identification. Elle consiste à intégrer les séquences d'ADN en tant que source d'information complémentaire à une classification morphologique. Il s'agit d'effectuer une taxonomie par approche moléculaire du groupe des *Tristaniopsis* calédoniens. Cet outil (considéré comme base de données de profils d'identité moléculaire spécifique) permettrait à terme d'identifier à toutes les époques de l'année l'espèce à laquelle appartient le ou les individus rencontrés sur le terrain. Pour cela, il faut constituer une base de données par marqueurs moléculaires de chacune des espèces considérées. On appelle cette approche « code-barres ADN ». Par la suite, et à la demande, l'identification d'individus rencontrés sur le terrain, à partir d'échantillons végétaux qui leur seront prélevés à des fins d'analyses comparatives en laboratoire, pourra être effectuée.

Existe-t-il un marqueur moléculaire capable de différencier dans un premier temps les espèces protégées des autres et dans un deuxième temps les espèces de *Tristaniopsis* entre elles ?

Seules treize espèces du genre *Tristaniopsis* sont présentes en Nouvelle-Calédonie. Il convient alors de prélever quelques individus de plusieurs populations par espèce. Une fois le matériel végétal obtenu il faudra réaliser des séquençages avec des couples d'amorces universelles pour mettre en évidence la variabilité génétique entre les populations et les espèces. Préalablement il est important de se familiariser avec la biologie de *Tristaniopsis* ainsi qu'avec l'approche de « code-barres ADN ».



5 : Thermocycleur



4 : Cuve à électrophorèse

Partie 2 : Matériel et Méthode



6 : Séquenceurs capillaire

I. Matériel Végétal

I.1. Présentation du genre *Tristaniopsis*

La famille des Myrtaceae est la plus riche en espèces de la flore Calédonienne (250 espèces autochtones, endémiques en grande majorité). Elle est largement représentée dans les forêts et dans les maquis (180 espèces présentes sur substrats ultramafiques). Ce sont des arbres ou arbustes, possédant pour la plupart des feuilles aromatiques, à glandes pellucides et nervures marginales. Les fleurs sont hermaphrodites ou unisexuées (Suprin, 2011).

Le genre *Tristaniopsis* appartenant à la famille des Myrtaceae (plantes dicotylédones) comprend une quarantaine d'espèces. *Tristaniopsis* est une plante angiosperme sous forme d'arbre, d'arbuste ou d'arbrisseau à feuilles alternes. Ses fleurs sont généralement jaunes, rarement oranges ou blanches. Les graines sont de type ailé. On le trouve principalement en Birmanie, en Australie et en Nouvelle-Calédonie. Treize espèces sont endémiques à la Nouvelle-Calédonie, la plupart étant des espèces d'écotype minier. Les espèces présentes sont : *T.jaffrei*, *T.polyandra*, *T.calobuxus* (Figure 3), *T.glauca*, *T.macohersonii*, *T.capitulata*, *T.lucida*, *T.vieillardii*, *T.minutiflora*, *T.reticulata*, *T.nindoensis*, *T.yateensis*, *T.guillanii* dont on distingue pour cette dernière deux variétés : *var blansana* et *var guillanii* (Figure 4).



Figure 3: *Tristaniopsis colobuxus*

Source : Endemia [On-line].[05/03/2012]



Figure 4 : *Tristaniopsis guillainii* var. *guillainii*

Source : Endemia [On-line].[05/03/2012]

<URL : <http://www.endemia.nc/flore/fiche1402.html>>

La phénologie de ce genre est très variable et diffère suivant les espèces. C'est ainsi par exemple que la période de floraison couvre toute l'année pour *T.calobuxus* alors que pour *T.vieillardii* elle ne s'étend que de Septembre à Novembre. Par ailleurs, certaines espèces admettent une grande diversité dans leur expression phénotypique, en fonction des stades de croissance et des sites de distribution rencontrés. Il est alors difficile, voire quasiment impossible, de les distinguer les unes

des autres par approche morphologique en l'absence de fleurs et/ou de fruits (Dawson J.W, 1992).

D'une manière générale, et quelque soit l'espèce, la plupart des fruits sont vides ou parasités (80% à 95%), ce qui leur confère un potentiel reproductif faible. (L'Huiller et al, 2010).

Au niveau des aires de distribution, certaines espèces comme *T.calobuxus* sont largement répandues sur toute la Grande Terre avec des effectifs conséquents, alors que d'autres comme *T.yateensis*, *T.polyandra* ou encore *T.nindoensis*, sont micro-endémiques et représentées que par un nombre restreint d'individus. De ce fait, ces dernières apparaissent plus fragiles face aux menaces qui pèsent sur l'environnement en général. Parmi elles, *T.yateensi* et *T.polyandra* sont déjà identifiées par l'UICN comme espèces en danger (Annexe 1). (<http://www.iucnredlist.org>).

I.2. Matériel végétal et échantillonnage

Au total, 12 espèces sur 13 on été échantillonnées (*T.jaffei* observé *in situ* par Tanguy Jaffré en 1985, n'ayant pu être retrouvés sur le terrain), à partir de 264 individus répartis en 23 sites (Figure 5).

Les *Tristaniopsis* de Nouvelle-Calédonie sont le plus souvent présents sur substrat ultramafique, avec la possibilité pour *T.lucida* et *T. calobuxus* d'être également présent sur sol volcano-sédimentaire. Seule *T.nindoensis* échappe à cette règle et ne se trouve que sur sol volcano-sédimentaire.

Possédant moins de métabolites secondaires, qui pourraient entraver la suite des travaux et notamment la technique d'amplification d'ADN par PCR, des jeunes feuilles sont prélevées sur les individus échantillonnés, séchées et conservées dans des sachets individuels contenant du silica gel (capacité dessicative) en attente des travaux de laboratoire qui suivront.

Sont également prélevés, sur chaque individu échantillonné, des parts d'herbier constituées de : branches feuillues ainsi que, lorsque cela est possible, fleurs et fruits. Elles serviront, en cas d'incertitude sur l'identification botanique conduite sur le terrain, de conduire une expertise plus poussée en laboratoire. Chaque échantillon récolté est identifié par un point GPS.

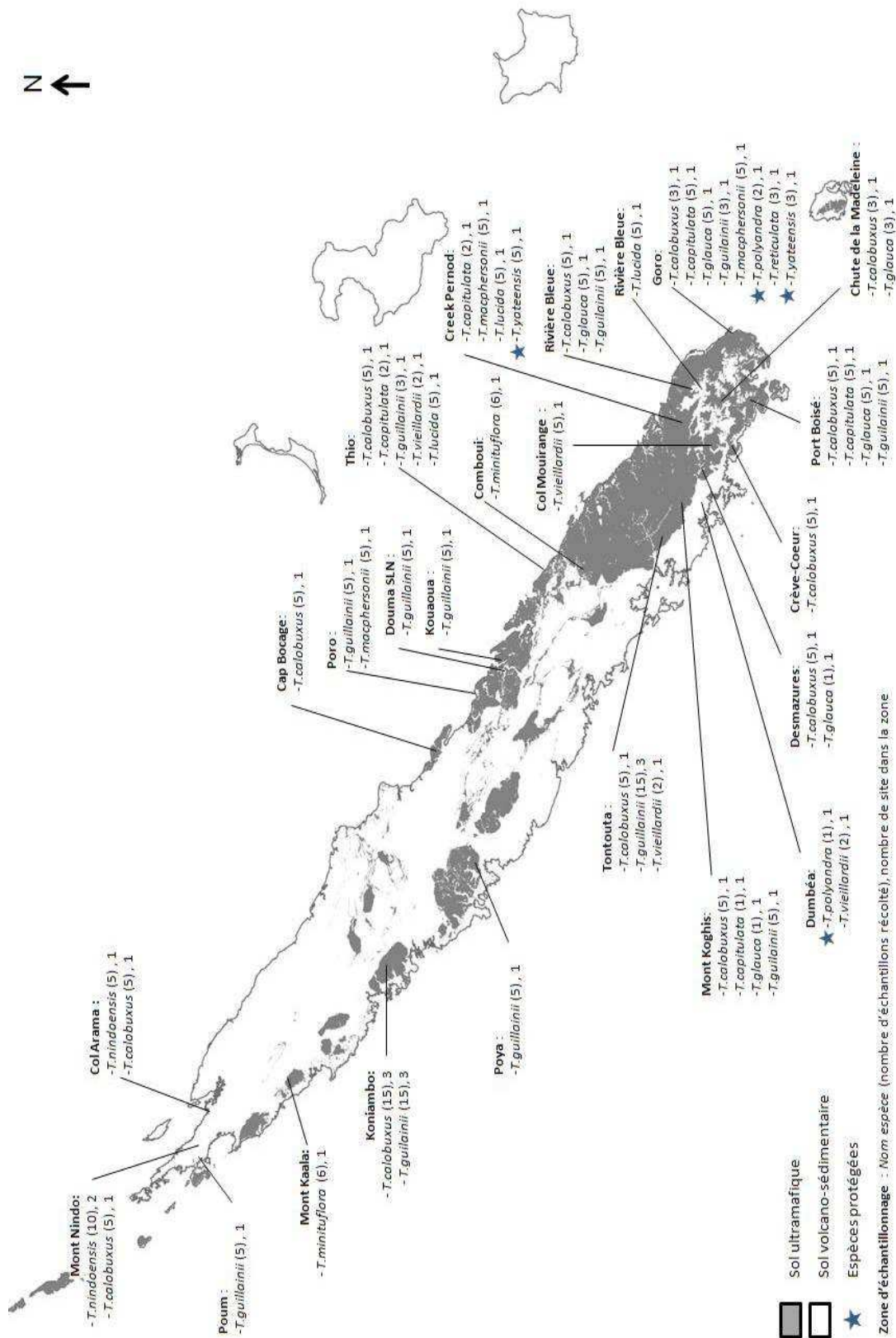


Figure 5 : Carte de la répartition des *Tristaniopsis* échantillonnés

II. « Code-barres ADN » et choix des locus

II.1. « Code-barres ADN »

Depuis les années 1980, les séquences ADN sont utilisées comme moyen d'identification des espèces, notamment chez les organismes pour lesquels l'information morphologique et/ou écologique est insuffisante (ex des bactéries) (Herbert et *al.*, 2003).

Partant du principe que l'analyse comparative inter-taxons d'une ou plusieurs séquences d'ADN admettrait suffisamment de divergence entre elles pour permettre leur discrimination, il a été proposé de standardiser la méthode en privilégiant un choix restreint de séquences d'ADN (marqueurs) et de constituer une base de données, accessible à tous, regroupant l'ensemble des séquences obtenues. Cette approche s'est vulgarisée au cours des dernières années, en ce qui concerne essentiellement des niveaux taxonomiques supérieurs, sous l'appellation de « codes-barres ADN » en faisant référence au système commercial de code-barres dans lequel chaque entité est identifiée par une unique combinaison de chiffres (Herbert et *al.*, 2003).

Cette nouvelle approche permet de rattacher un spécimen non identifié par voie classique à un groupe déjà répertorié dans la base, sans avoir besoin d'attendre un stade de vie particulier de l'organisme à étudier, et l'appui d'un expert *ad hoc*. L'analyse des similarités, ou dissimilarités, entre groupes de séquences comparées peut amener à supposer l'existence de nouveaux niveaux taxonomiques, ou *a contrario*, le réagencement de groupes antérieurement définis.

Cette méthode a pu être validée dans divers groupes de bactéries, d'animaux, de plantes (Herbert et *al.*, 2003) mais présente bien évidemment des limites, il faut donc la considérer comme une aide précieuse pour la détermination d'espèces, complémentaire aux approches plus classiques.

Certaines bases de données ont été développées et sont aujourd'hui consultables sur le web, en particulier sur le site NCBI. Concernant le genre *Tristaniopsis*, aucune base de données n'est actuellement référencée. Il a donc été nécessaire, dans le but de calibrer notre base, de s'adjoindre l'appui de botanistes pour identifier plus sûrement une grande partie de nos échantillons.

II.2. Choix des locus

Le choix des marqueurs est très important. Parmi les différents locus, marqueurs potentiels, déjà identifiés et disponibles dans la littérature, il s'agit de choisir ceux qui permettront, par leur degré de polymorphisme, l'analyse au niveau taxonomique auquel l'étude s'attache, le genre *Tristaniopsis* réduit aux espèces néo-calédoniennes. L'utilisation de locus plus adaptés à des niveaux taxonomiques supérieurs pourrait biaiser notre analyse en ne permettant pas la discrimination des groupes locaux étudiés, car trop peu variables aux regards de notre sous-ensemble d'espèces. Inversement, l'utilisation de locus trop variables, comme ceux couramment utilisés à l'échelle de fratries par exemple, pourrait là encore biaiser l'analyse par risque d'homoplasie.

A quelques exceptions près, trois types de génome caractérisent le monde des végétaux : mitochondrial, chloroplastique, et nucléaire.

Le génome mitochondrial des plantes montre un taux de variation 100 fois plus faible que celui des animaux. Il est haploïde. Des études ont été réalisées pour transposer l'utilisation de COX1 (marqueur de référence chez les animaux, Cytochrome c Oxydase 1) en tant qu'outil « code-barres ADN » chez les plantes, mais il apparaît comme très peu variable chez ces dernières (Lahaye *et al.*, 2007, Hollingsworth *et al.*, 2011).

Le génome chloroplastique est le plus utilisé en « code-barres ADN » chez les plantes. C'est aussi un génome haploïde. Il est hérité le plus souvent de la mère chez les végétaux supérieurs et est présent en de nombreuses copies dans les cellules végétales.

Le génome nucléaire est celui qui admet le plus de variabilité du fait de son caractère diploïde. Sa région ITS (Internal Transcribed Spacer) est largement utilisée dans le « code-barres ADN » chez les plantes (Kress *et al.*, 2005).

D'une manière générale, il faut noter que les régions codantes des génomes seront moins variables que les régions non codantes, du fait de la pression de sélection qui s'exerce sur elles (Hollingsworth *et al.*, 2011).

La plupart des études menées sur le « code-barres ADN » des plantes ont montré qu'il fallait souvent une combinaison de marqueurs afin de pouvoir différencier le plus d'espèces possibles entre elles (Hollingsworth *et al.*, 2011).

Le choix des marqueurs a été réalisé suivant la disponibilité des amorces dans les bases de données et au laboratoire, la qualité de l'amplification effectuée par PCR, et celle du séquençage obtenu (Tableau 1).

Tableau 1 : Locus utilisés pour le séquençage des *Tristaniopsis*.

Locus	Type de marqueur	Primer		Taille moyenne (pb)	T°C d'hybridation	Bibliographie
		Forward	Reverse			
ETS	ADNn**	Myr-F	ETS 18S	400	57	Wright & al., 2001, Lucas et al., 2007 ; Murillo et al., 2011
HA	ADNcp*	trnH(GUG)	psbA	550	57	Hamilton (1999), Saltonstall (2001)
MatK	ADNcp	MatK1R	Matk3F	860	52	Johnson & Soltis (1994), Wilson et al., 2001
trnTF	ADNcp	trnTF-F	trnTF-C	760	55	Taberlet et al., 1991
cox I	ADNmt***			1700	55	
HK1	ADNcp	trnH	trnK1	1935	59	
NTCP9	µsat chloro	NTCP9F	NTCP9R	360	57	
CS	ADNcp	psbC	trnS	1356	59	
QS	ADNcp	trnQF	trnScR	1326	59	
K1K2	ADNcp	trnK1	trnK2	2548	63	
ccmp3	microsat cp	ccmp3F	ccmp3R	130	57	
ccmp5	microsat cp	ccmp5F	ccmp5R	125	57	
ITS	ADNn	ITS-2F	ITS-3F	800	52	
CD	ADNcp	trnC	trnD	4813	52	
DT	ADNcp	trnD	trnT	3096	50	
ML	ADNcp	trnM	rbcl	2853	52	
ST	ADNcp	trnS	trnT	1264	50	

*ADNcp : ADN chloroplastique

** ADNn : ADN nucléaire

***ADNmt : ADN mitochondrial

pb : paire de base

Par ailleurs, l'analyse des profils de locus microsatellites a également été conduite à l'aide de cinq couples d'amorces définies, pour l'espèce *T. calobuxus*, à l'occasion de précédents travaux de l'équipe d'accueil (Tableau 2). Les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN très variables, composées de motifs nucléotides répétés admettant un fort taux de polymorphisme. Ces marqueurs sont neutres, donc non directement liés à une quelconque pression de sélection. Ils sont couramment utilisés dans les études de génétiques des populations : effets de la dérive génétique, des mutations et des flux de gènes (Pastorino et Gallo, 2009). Ils peuvent se révéler être spécifique d'une espèce, ou partagés entre espèces phylogénétiquement proches. D'où leur utilisation dans cette étude, afin d'estimer les degrés de proximité pouvant exister entre certaines espèces étudiées.

Tableau 2 : Locus microsatellites utilisés pour le génotypage des *Tristanopsis*.

Locus	Motif répété	Taille (pb)	T°C d'hybridation	Fluorochrome
A10a	GA ₃₄ +AG ₂₈	194	57	VIC
B03	AG ₉ +AG ₆	431	60	PET
B06	GA ₁₃	235	54	NED
D03	AG ₁₅	419	54	VIC
E05	TC ₁₁ +CT ₄	334	60	NED

* Les Primers n'étant pas encore publiés, ils ne seront pas décrits dans ce mémoire

pb : paire de base

VIC : fluorochrome vert, PET : fluorochrome rouge, NED ; fluorochrome jaune

III. Expérimentation en laboratoire

III.1. Broyage et Extraction d'ADN

La première étape en laboratoire consiste à extraire l'ADN total des feuilles récoltées. Afin de faciliter le broyage, on travaille sur de la matière sèche (si l'échantillon n'est pas sec on le mets à l'étuve à 37°C pendant un à de ux jours). On broie ensuite 20mg de matière sèche à l'aide d'un broyeur à billes (Retsh MM400). En attendant l'extraction le broyat obtenu est conservé au congélateur à -80°C (pour inhiber les réactions enzymatiques pouvant dégrader l'ADN).

Les extractions d'ADN sont réalisées à partir du kit d'extraction d'ADN génomique de la plante : Dneasy Plant Mini Kit QIAGEN® suivant la technique de Doyle et Doyle (1990) (méthode basée sur une technique d'extraction sur colonne chromatographique). Le protocole, préconisé par le fournisseur du kit, se décompose en plusieurs étapes successives. Dans un premier temps, il convient de réaliser la lyse cellulaire des tissus végétaux. Ensuite vient l'étape de précipitation des protéines qui est suivie par l'élimination des précipités et débris cellulaires. Puis l'ADN est fixé et purifié sur une mini-colonne de résine de silice présentant une affinité pour l'ADN. Enfin, lors de la dernière étape d'extraction, l'ADN est décroché de la colonne par élution à l'aide de 100 µl de tampon d'élution et conservé à -80°C.

Afin de mesurer la concentration et vérifier la qualité des ADN, les extractions sont dosées au Nanodrop (*spectrophotomètre ND-1000*) et contrôlé sur gel d'agarose (1%) avant d'être diluée à 10 ng/µl et stocké à -20°C.

III.2. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification permet d'obtenir, à l'aide d'amorces flanquantes, de multiples copies de la région ciblée. Elle nécessite l'usage d'une enzyme synthétase : la Taq polymérase.

Le mélange réactionnel contient de l'ADN, du tampon de réaction, du MgCl₂, des désoxyribonucléotides (DNTP), un jeu de deux amorces, et de la Taq polymérase (GoTaq® Flexi DNA polymerase, Promega). Suivant les objectifs visés (séquençage ou génotypage), le mélange réactionnel ne sera pas élaboré de la même manière. Pour le séquençage, les amorces, en quantité équivalente, sont la « forward » et la « reverse » qui se situent respectivement en amont et en aval du locus ciblé (Tableau 1). Pour le génotypage une des deux amorces utilisées est marquée par un fluorochrome. Les concentrations des différents produits du mélange réactionnel sont présentées en Annexe 2.

Les produits amplifiés sont mis à migrer par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. Puis ils sont visualisés sous Ultra-Violet (UV) afin de vérifier la qualité et la quantité de l'amplification. La taille des fragments obtenus est comparée avec un marqueur de taille de référence.

III.3. Séquençage

Une fois la PCR obtenue, tous les échantillons amplifiés seront séquencés. On commence par une étape de purification sur membrane Sephadex (MultiScreen®). Cette membrane permet de bloquer les grosses molécules (comme les sels, les tampons,...) et de récupérer les petites molécules comme nos amplifiats. On quantifie ensuite les amplifiats au Nano-Drop® afin de les diluer à 20 ng/µl pour la réaction de séquence.

Cette réaction consiste à effectuer une polymérisation de l'amplifiat en présence de nucléotides terminateurs de chaînes (ddntp) portant un fluorochrome dont la couleur est fonction de la base ajoutée (A vert, T rouge, G noir, C bleu). La solution de réaction de séquence comprend le tampon de réaction, des dntp, des ddntp, de la Taq polymérase et une seule amorce. Il est nécessaire de répéter l'opération avec l'autre amorce d'amplification afin d'obtenir la séquence du brin complémentaire. Les réactions de séquence sont réalisées dans un thermocycleur. Ce principe repose sur la méthode de Sanger. Lorsqu'un ddntp est incorporé, à la place d'un dntp, à la réaction de synthèse, celle-ci s'arrête. La synthèse d'un grand nombre de copies du brin complémentaire au brin matrice utilisé permet de couvrir toutes les tailles de fragment possibles relatives à chacun des ddntp utilisés. Les concentrations du mélange réactionnel et le programme du thermocycleur sont présentés dans Annexe 3. Suite à la réaction de séquence, une ultime étape de purification sur Sephadex est nécessaire.

Les fragments ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse en fonction de leur taille, et leur séquence lue, à l'aide du séquenceur 3130xl Genetic Analyser® (Applied Biosystems®) de la Plateforme du Vivant de la Nouvelle-Calédonie. A l'extrémité terminale des capillaires de migration, un laser excite les fluorochromes de chaque fragment, en mobilité dans la matrice, qui se succèdent en fonction de leur taille, du plus petit au plus grand. Une caméra CDD (Charge-Coupled Device) lie la réponse du fluorochrome à l'excitation qui est enregistrée chronologiquement dans la base de données du séquenceur. Un logiciel dédié, Séquencing Analyse 5.3.1., recrée l'enchaînement des nucléotides correspondant à la séquence du brin d'ADN matrice et présente les résultats sous forme d'un électrochromatogramme.

III.4. Génotypage

L'amplification par PCR pour le génotypage est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques au locus microsatellite ciblé (Tableau 2). Le génotypage de chaque individu est effectué par analyse des tailles de fragments microsatellites sur génotypeur à capillaire (*3130xl genetic analyzer®*, *Applied Biosystems®*). Dans le but de faciliter les analyses postérieures, les 5 marqueurs inclus à l'étude sont répartis en 2 multiplex. Un multiplex correspond au mélange de produits PCR, chacun relatif à l'amplification de différents locus pour un même individu. Pour faciliter la

lecture il est souhaitable de multiplexer des amplifiats de tailles non recouvrables afin d'éviter des erreurs de lecture, et/ou d'aménager le marquage au fluorochrome de manière à pouvoir les distinguer clairement. Chaque multiplex est dilué au 125^{ième} avec de l'eau ultrapure (milliQ), puis un aliquote de chaque solution est déposé dans un puits sur une plaque de dépôt (96 puits), auquel est ajouté, par puit, un marqueur de taille co-migrant (GeneScanTM-500 LIZ, Applied Biosystems).

La plaque de dépôt est chauffée à 94°C durant 4 min dans le but de dénaturer les ADN présents, puis mis à incuber 1 min sur de la glace pour empêcher le ré-appariement des brins. La plaque est alors positionnée sur son support dans le génotypeur et l'analyse lancée. Lors de l'électrophorèse, les échantillons sont électro-aspirés dans des capillaires où ils migrent en fonction de leur taille. A l'extrémité des capillaires, un laser excite les fluorochromes lors de leur passage et la longueur d'onde émise en réponse est captée par une cellule de détection. Le signal est alors enregistré en fonction de son temps de migration et de la couleur du fluorochrome qui le caractérise.

IV. Préparation des données

IV.1. Préparation des séquences

IV.1.1. Nettoyage des séquences

Le nettoyage des séquences « forward » et « reverse » (correspondant aux deux brins d'un même fragment d'ADN) a été conduit à l'aide du logiciel Sequencher. Ce logiciel permet de « nettoyer » les séquences, c'est-à-dire enlever les parties correspondantes aux amorces à chacune des extrémités des séquences, traduire les nucléotides non lisibles en données manquantes, et vérifier les zones d'insertion ou de délétion (« gaps »). Parfois les homologies entre les séquences sont difficiles à établir, c'est pourquoi avant l'analyse comparative des séquences, les zones trop ambiguës sont exclues des analyses.

Une fois les séquences nettoyées, on assemble la « forward » et la « reverse » d'un individu en « contigs » afin de n'avoir plus qu'une seule séquence complète. Afin de vérifier que nous avons amplifié le bon fragment d'ADN, les contigs sont ensuite comparés à la base de données internationale libre d'accès (GeneBank, ...) par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Enfin, nous exportons tout nos contigs sous format texte afin de les aligner et de comparer tout les contigs les uns aux autres à l'aide d'autres logiciel d'alignement (BioEdit, ...).

IV.1.2. Traitement des séquences sur BioEdit

BioEdit 5.0.9 est un éditeur d'alignement des séquences. Son interface rend l'alignement et la manipulation des séquences facile. Il permet également d'enregistrer l'ensemble des séquences en un seul fichier dans un format utilisable pour les analyses statistiques.

IV.2. Lecture des données issus du génotypage

Les données issues du génotypage sont analysées à l'aide du logiciel GeneMapper® Software V4.0 (Applied Biosystems®). Elles sont présentées sous forme d'électrophorégrammes. Chaque allèle est représenté par un pic dont la position correspond à la taille du fragment amplifié et à la couleur du fluochrome utilisés.

On peut ainsi définir le profil allélique de chaque individu pour chaque locus étudié. On traite les résultats marqueur par marqueur, individu par individu. Les résultats finaux sont regroupés dans un tableau présentant la taille des allèles par individus et par marqueur. Ce tableau est exporté du logiciel et constitue le jeu de données qui sera utilisé pour les analyses.

V. Analyse des Résultats

V.1. Réalisation d'une base de données sur les caractères morphologiques, phénologiques et écologiques

Un tableau synthétisant les caractères morphologiques discriminant les espèces a été réalisé. Ce tableau, permet d'appuyer notre discussion et de comparer nos résultats à ceux obtenus via une approche classique de la taxonomie des espèces.

V.2. Analyse des données du séquençage

V.2.1. Création d'une base de données de séquence sur fichier Excel

Afin d'avoir une plus grande visibilité des résultats obtenus, une base de données sur Excel a été créée. Seules les données acquises à partir de matériel végétal confirmé dans son identification par un botaniste, ont été utilisées pour ce faire. Elle est constituée de l'alignement par locus des différentes séquences obtenues pour chaque échantillon, et organisée par groupe de similitude afin d'évaluer rapidement et visuellement la structuration totale de l'ensemble ainsi que la diversité moléculaire qui la soutient (insertion/délétion, SNP : Single –Nucleotide Polymorphism). Les marqueurs, qui discriminent le mieux les espèces de *Tristanopsis*, seront considérés comme les marqueurs les plus pertinents pour l'approche « code-barres ADN ».

V.2.2. Analyse des données

Trois types d'approches ont été utilisés pour l'ensemble des données de génotypage et de séquençage, prises séparément. Une méthode cladistique qui procède par comparaison des caractères étudiés, et regroupe les individus, ou groupes d'individus, en fonction de leur degré d'homologie. Une approche statistique multivariée, l'Analyse en Composante Principale (ACP). En dernier lieu, une approche probabiliste, méthode Bayésienne. Une analyse complémentaire (AMOVA) a été conduite à partir des données du génotypage obtenues pour un groupe d'espèces très fermé, non distinguable avec les précédentes approches.

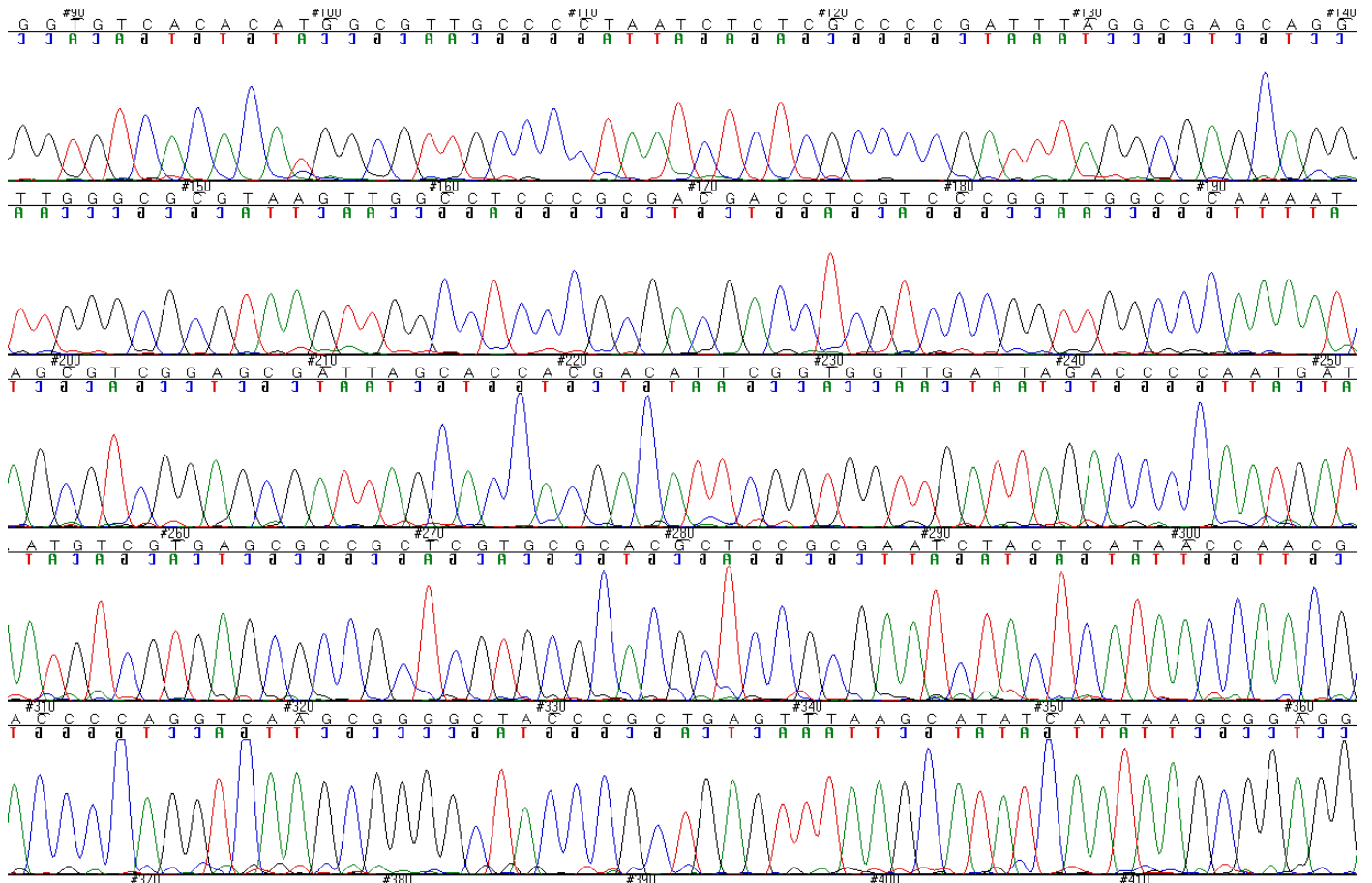
L'approche cladistique nécessite au préalable l'élaboration de matrices de distances, pour chaque type de données obtenues, qui ont chacune été réalisées à l'aide du logiciel Mega5. Leur robustesse a été testée par la méthode des bootstraps (1000 ré-échantillonnages aléatoire des données). Les résultats obtenus sont présentés sous forme de cladogramme.

L'ACP est une méthode descriptive. Les analyses ont été conduites, à l'aide du logiciel DARwin 5.0.158 (Perrier *et al.*, 2006), séparément pour chacun des deux types de données, séquençage et génotypage. Une image de la structuration existante au sein de l'ensemble des échantillons peut être ainsi obtenue pour chacun des types de données utilisés.

Une autre méthode d'analyse pour la discrimination des espèces étudiées est l'approche bayésienne. C'est une méthode sans *a priori* qui permet d'obtenir le nombre (K) de groupe le plus probable dans lesquels se répartissent nos individus (Evanno *et al.*, 2005). Le groupe K le plus vraisemblable est déterminé à l'aide du logiciel Structure 2.3.1 (Falush *et al.*, 2000), il correspond au delta K maximum. Les paramètres choisis sont : pour la période de burning, 100 000 itérations ; pour la chaîne de Markov via la méthode de Monte Carlo, 200 000 itérations ; 10 répétitions sont réalisées par groupes testés, et le modèle utilisé est un modèle sans admixture. Chaque individu est représenté graphiquement par sa probabilité d'appartenance à chacun des K groupes.

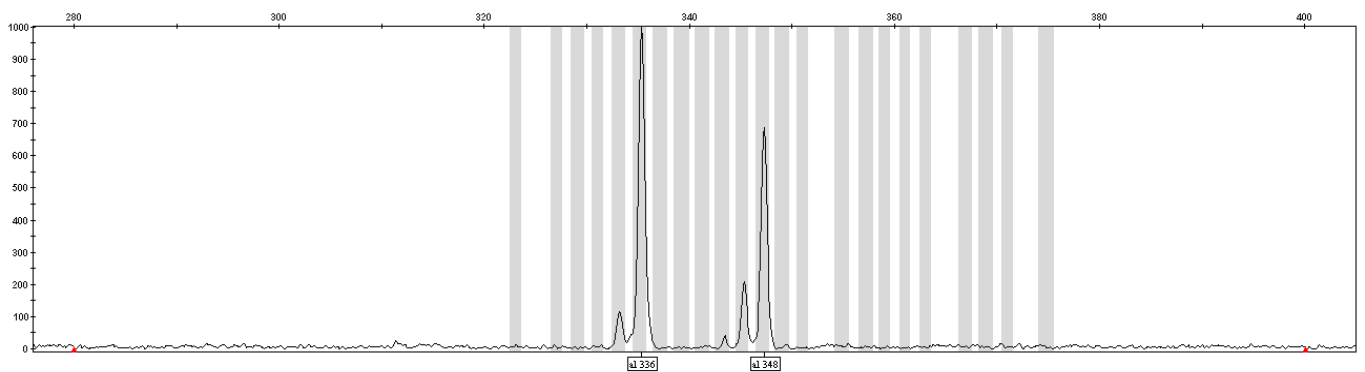
L'AMOVA (Analyse des Variances Moléculaires) a pour but d'estimer la part de variabilité inter et intra-espèces (Excoffier *et al.* 1992). Elle est conduite à l'aide du logiciel Arlequin (Schneifer *et al.*, 2000). Cette analyse nous informe également sur le degré global de structuration (Fst) de l'ensemble des données analysées.

Le logiciel Arlequin permet également de comparé chaque espèce deux à deux par calcul des paires de F_{ST} (Wright, 1978) afin d'évaluer les distances génétiques deux à deux. Ce qui a également été conduit dans notre étude.



7: Electrochromatogramme de l'individu 1 *T. guillainii* à Thio avec le marqueur ITS

Partie 3 : Résultats et Discussion



8 : Allèles de l'individu 1 de *T. capitulata* à Thio pour le microsatellite E05

I. Résultats

I.1. Réalisation d'une base de données des caractères morphologiques des espèces *Tristaniopsis*

La base de données a été réalisée grâce à la Flore (Dawson J.W, 1992) Seuls les caractères discriminant les espèces ont été retenus. Le tableau récapitulatif se trouve en Annexe 4.

I.2. Analyse des séquences

I.2.1. Résultats du séquençage et Base de données

Environ 1 200 séquences ont été réalisées (soit 600 contigs) tous marqueurs confondus. Sur ces 600 contigs, 419 contigs sont de bonne qualité et ont donc pu être traités (Tableau 3). Soit un taux de réussite de 70% pour le séquençage.

Sur les six locus testés sur l'ensemble des espèces (Tableau 3), le marqueur mitochondrial COX I, n'admettant de la variabilité interspécifique que pour un très petit nombre d'espèces, n'a pas été retenu pour la suite de l'analyse.

Les amplifications PCR conduites avec les marqueurs chloroplastiques n'ont pas tous donné de bons résultats, et les premières séquences obtenues ne se sont révélées que peu performantes pour l'identification de taxons, ou groupe de taxons.

Les marqueurs nucléaires (ETS et ITS) sont ceux qui ont permis les meilleurs résultats, tant au niveau PCR qu'au niveau séquençage avec un nombre respectifs de contigs obtenus de 214 et 55 (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif du nombre de contigs obtenus sur les principaux marqueurs.

Locus	Nombre d'espèces testées	Nombre de contigs obtenus
ETS	12	214
ITS	12	55
HA	12	60
matK	10	25
trnTF	7	20
cox I	11	45

I.2.2. Analyse comparative du degré d'information obtenu par marqueur

Une première approche comparative des séquences obtenues (Annexe 5) pour l'ensemble des 5 locus retenus, fait apparaître une hétérogénéité dans l'expression de la diversité en fonction du type de génome concerné. Certains locus apparaissent plus informatifs que d'autres (Tableau 4) sur la base du nombre de SNP et

d'insertions/délétions qu'ils admettent. C'est ainsi que l'on observe globalement une diversité exprimée plus importante au niveau des locus nucléaires (ADNn) relativement à celle des chloroplastes (ADNcp). De même, les régions codantes (*matK*, *trnTF*), sujettes aux pressions de sélection, apparaissent, comme attendu, plus conservées que les non codants (ETS, ITS, HA). Pour preuve, aucune sous-unité spécifique n'y est observée *a contrario* des autres locus.

En ce qui concerne plus particulièrement les locus chloroplastiques, les unités taxonomiques observées ne se recoupent que peu avec les espèces étudiées puisqu'au maximum trois des ces dernières seulement, sur les 7 à 12 testées selon les locus, sont reconnues. De fait, le nombre de supra-unité spécifique affiché, et/ou le nombre d'espèces que chaque supra-unité couvre, y est plus élevé. Le locus HA, non codant, exprime quant à lui une forte diversité intra-spécifique, la plus forte même. Ce résultat s'explique par le fait que le génome chloroplastique admet, chez les végétaux supérieurs en général, une hérédité maternelle, marquant ainsi des lignées maternelles qui sont, dans la plupart des cas, non unique pour une espèce donnée.

Les locus qui discriminent le mieux les espèces entre-elles, tel que définies par les botanistes, sont ceux du génome nucléaires (ADNn). Dans notre cas, les deux locus utilisés, ETS et ITS, permettent d'identifier neuf des douze espèces étudiées. Seules les trois espèces *T.calobuxus*, *T.capitulata* et *T.yateensis* ne peuvent être différenciées avec l'outil mis en place dans notre étude.

Enfin, il apparaît que *T.minituflora* se détache nettement des autres espèces de *Tristaniopsis* néo-calédoniens. Ce sont ses séquences, quelque soit le locus étudié, qui admettent le plus d'événements (SNP, insertion/délétion) spécifiques à l'espèce (ex. : 67 sur 122 rien que pour le marqueur ETS).

Tableau 4 : Niveau d'information obtenue par locus

Locus	ETS	ITS	HA	<i>matK</i>	<i>trnTF</i>
Nombre d'espèce testée	12	12	12	10	7
Nombre d'unité taxonomique observée	16	12	13	7	2
Nombre d'espèce non différenciée	3	3	9	7	6
Nombre d'espèce différenciée	9	9	3	3	1
Nombre d'espèce divisée en 2 sous-unités	2	3	3	0	0
Nombre d'espèce divisée en 3 sous-unités	0	0	1	0	0
Nombre d'espèce divisée en 4 sous-unités	0	0	1	0	0
Nombre d'espèce divisée en 5 sous-unités	1	0	0	0	0
Nombre de supra-unité regroupant différentes espèces	1	2	3	4	1

I.2.3. Approche cladistique

Différentes analyses ont été conduites, une pour chaque marqueur (non reprises dans ce rapport car peu informatives), une rassemblant les marqueurs les plus informatifs, ETS et ITS, (Figure 6), et une pour l'ensemble des marqueurs combinés excepté *trnTF* qui n'amène pas d'information supplémentaire par rapport aux autres (Annexe 7).

L'analyse relative au quatre locus ETS, ITS, HA et *matK*, combinées, aboutie sur l'élaboration d'un cladogramme (Annexe 7). Elle a été conduite à partir du sous-ensemble des échantillons pour lesquels une séquence a été obtenue pour chacun de ces quatre locus, ce qui s'est révélé possible que pour huit des douze espèces du territoire. Les regroupements visualisés sont supportés par un bootstraps au moins égal à 75%. A la lecture de ce cladogramme il apparaît que l'ensemble des espèces étudiées, hors *T.minituflora* et *T.glauca*, forment un groupe fermé supporté par un bootstrap à 94%. Dans ce premier groupe se différencie également nettement les espèces *T.guillainii* et *T.nindoensis*, et un sous-groupe constitué de *T.calobuxus*, *T.capitulata*, *T.yateensis* et *T.macphersonii*. Cette dernière espèce, *T.macphersonii*, étant elle-même bien distincte des trois autres. Seules trois espèces sur les huit concernées par cette première analyse ont pu être reconnues. Le faible taux d'identification, à l'échelle spécifique, obtenu dans ces résultats est essentiellement explicable par le manque de répétition d'échantillons étudiés par espèce.

Dans le souci d'une part d'augmenter les effectifs d'échantillons par espèce à analyser, et d'autre part de couvrir l'ensemble des douze espèces de *Tristaniopsis* néo-calédoniennes, une deuxième analyse a été conduite à partir des seuls locus nucléaires, ETS et IST. Elle aboutie au cladogramme présenté Figure 6 pour lequel seules les branches supportées par un bootstraps au moins supérieur à 65% ont été retenues. Les douze espèces y sont bien représentées et au total les séquences sont relatives à 55 individus originaires de différents sites géographiques.

De cette deuxième analyse il ressort, à l'exception du groupe formé des trois espèces *T.calobuxus*, *T.capitulata*, et *T.yateensis*, que chaque espèce étudiée forme une unité taxonomique cohérente qui peut admettre des subdivisions en son sein selon les cas. A noter que dans le cas de *T. lucida* deux unités taxonomiques relatives chacune à un substrat différent se distinguent l'une de l'autre, laissant supposer la probable existence de deux espèces. La non différenciation, apparente au seuil de bootstraps retenu, de *T. polyandra* avec les *T.nindoensis* du mont Nindo, peut être expliqué par le manque de répétitions pour l'espèce *T.polyandra* puisque les séquences de chacune des deux espèces admettent bien des différences entre elles. Il en est de même pour le groupe incluant les *T.lucida* présents sur substrat ultramafique et *T.reticulata*.

L'espèce *T.minituflora* se divise en deux sous unités géographiques (un site au Mont Kaaka et l'autre à Comboui), et *T.guillainii* en quatre.

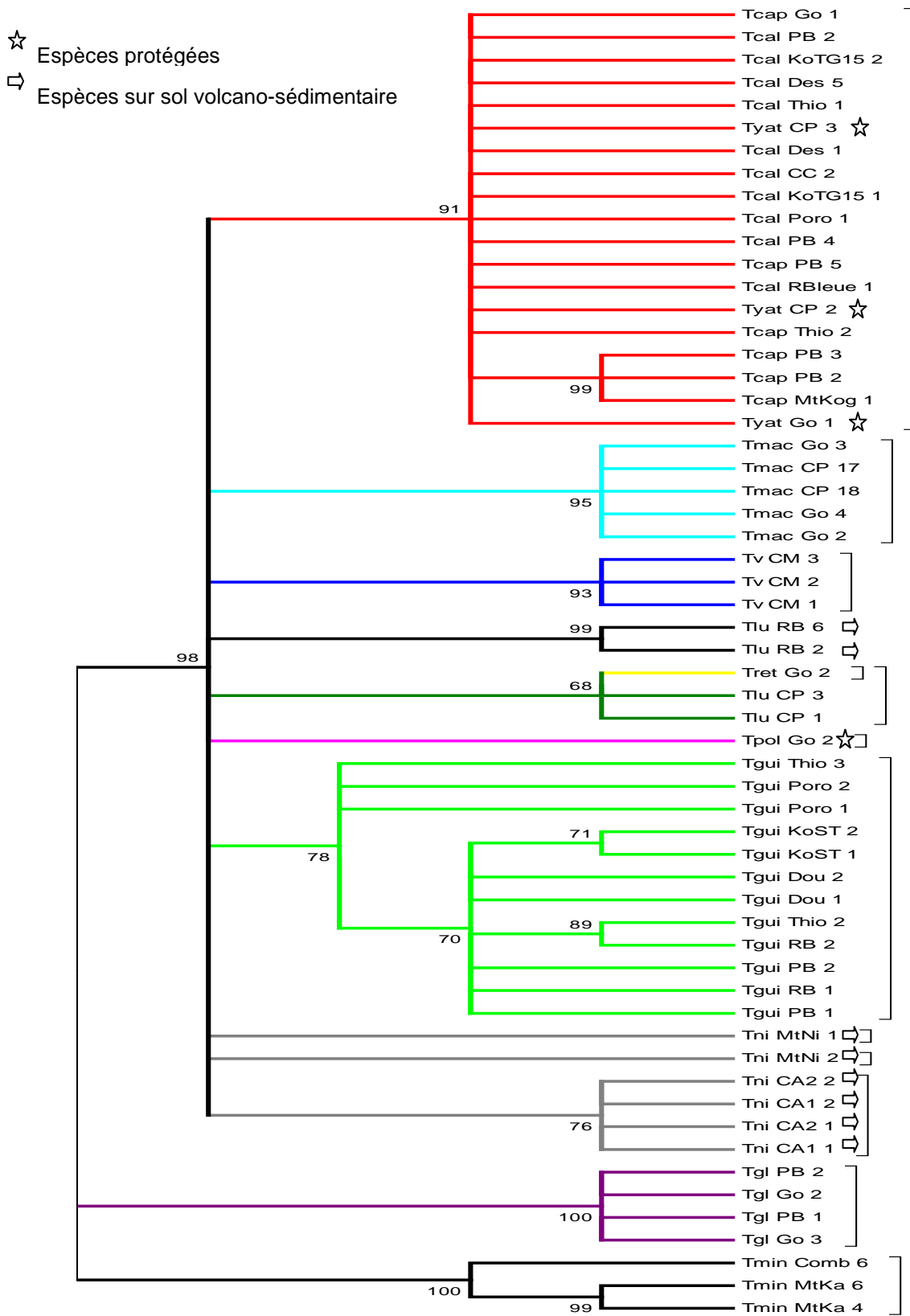


Figure 6 : Cladogramme de 12 espèces de *Tristaniopsis* réalisé avec la combinaison des locus ETS et ITS combinés.

I.2.4. ACP

Dans cette partie ne seront présentés que les résultats relatifs à l'analyse multivariée, ACP, établie à partir des résultats obtenus avec les locus ETS et ITS assemblés. Une première analyse incluant tous les échantillons étudiés s'est révélée difficilement exploitable graphiquement du fait des positionnements très extrapolés de *T.minituflora* et *T.glauca* (Annexe 8 et Annexe 9). Il a donc été convenu de les retirer des données pour conduire une seconde analyse dont le graphe principale, exprimant le plus de variabilité (70.83%), est représenté (Figure 7).

Les deux axes de cette ACP permettent de distinguer sept groupes d'échantillons. Ceux de *T.macphersonii* sont constitués en un seul groupe, de même que pour ceux de *T.guillainii*, et ceux de *T.nindoensis*. On y retrouve le clivage des individus de *T.lucida* suivant les zones géographique. Enfin, cette analyse nous confirme à nouveau la proximité des espèces *T.calobuxus*, *Tcapitulata* et *T.yateensis*.

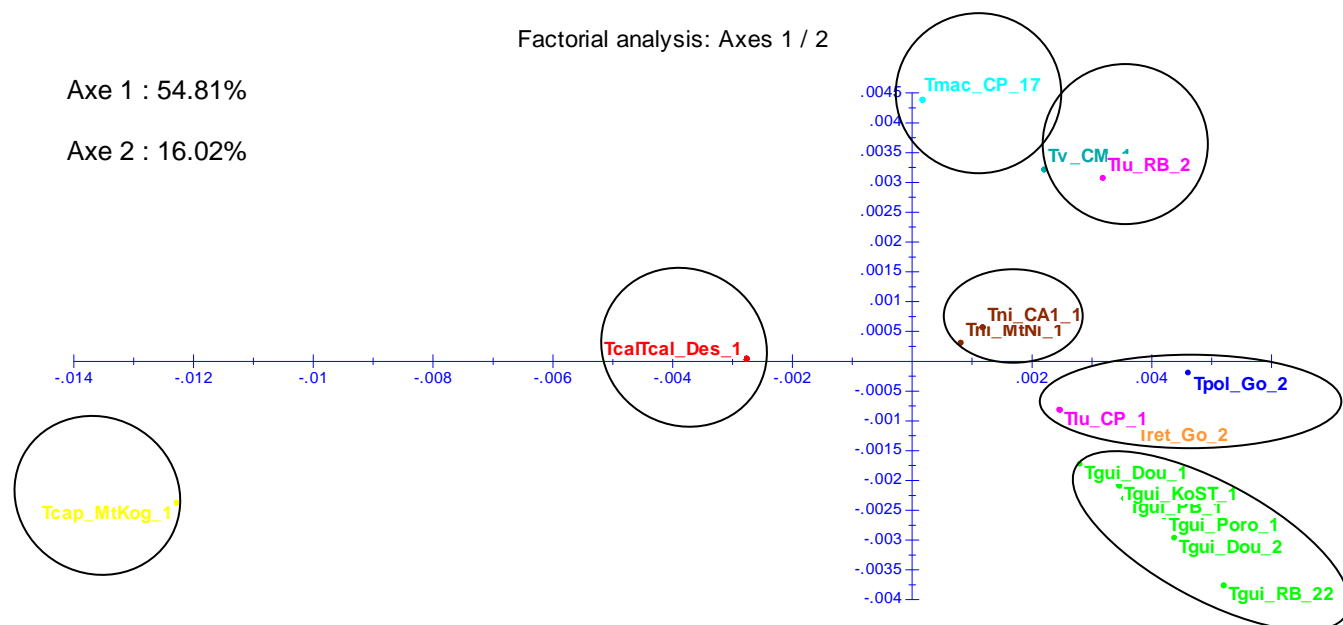


Figure 7 : ACP sans *T.minituflora* et *T.glauca* avec la combinaison des marqueurs ETS et ITS.

I.2.5. Analyse Bayésienne

L'approche bayésienne réalisée à l'aide du logiciel Structure suggère que le modèle à 4 groupes (K=4) est le modèle le plus probable (Figure 8).

La représentation graphique de la répartition des individus en quatre groupes est présentée dans la Figure 9.

Le premier groupe, inclue les trois espèces *T.calobuxus*, *Tcapitulata* et *T.yateensis*. *T.glauca* compose à lui seul le deuxième groupe. Le troisième groupe rassemble les espèces *T.vieillardii*, *T.nindoensis*, *T.macphersoni* et *T.lucida* (de Rivière Bleue). Enfin, le dernier groupe contient les espèces *T.reticulata*, *T.polyandra* et *T.lucida* (de Creek-Pernod).

Encore une fois, il n'a pas été possible avec cette approche de différencier les trois espèces *T.calobuxus*, *Tcapitulata* et *T.yateensis*.

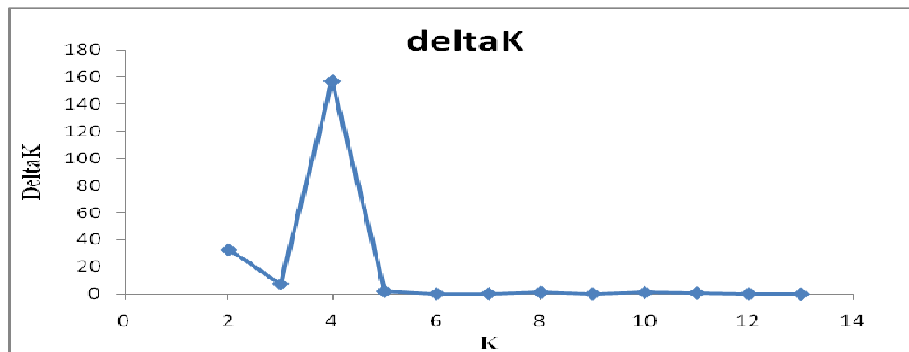


Figure 8 : Graphique représentant la distribution du DeltaK en fonction du K nombre de groupe testé



Figure 9 : Représentation graphique de la répartition des individus obtenus par la démarche bayésienne pour K = 4 groupes.

I.2.6. Marqueurs testés sur les espèces non différenciées

Suite aux différents résultats présentés *supra*, il a toujours été impossible de différencier les trois espèces *T.calobuxus*, *T.capitulata* et *T.yateensis* les unes des autres. Rappelons que l'espèce *T.yateensis* est une espèce protégée et qu'un de notre objectif est de le différencier.

Afin de pousser plus loin notre analyse, nous nous sommes proposé d'adjoindre à notre analyse d'autres locus disponibles au laboratoire (Tableau 5). Parmi les onze nouveaux locus, trois n'ont pu être amplifiés. Au total, et pour les huit nouveaux locus retenus, 50 séquences, toutes espèces confondues, ont été obtenues.

Aucune information supplémentaire, permettant de distinguer une ou les trois espèces en question, n'a été obtenu.

Tableau 5 : Résultats des marqueurs testés sur *T.calobuxus*, *T.capitulata* et *T.yateensis*

Locus	Nombre de contigs obtenue
HK1	7
NTCP9	16
CS	5
QS	4
K1K2	7
ccmp3	0
ccmp5	0
CD	5
DT	5
ML	1
ST	0

I.3. Analyse génotypique (*T.calobuxus*, *T.capitulata* et *T.yateensis*)

Les analyses du génotypage on été réalisées sur un sous ensemble d'individus représentatifs des différents sites pour chacune des espèces.

Tableau 6 : Résultat de l'AMOVA réalisé sur *T.calobuxus*, *T.capitulata* et *T.yateensis*

Source de variation	ddl	SCE	Variances	% de variation	Fst
Entre les espèces	2	4.999	0.02017	0.94	
Dans les espèces	65	138.619	2.13260	99.06	0.00937
Total	67	143.618	2.15278		

P(rand. value = obs. value) = 0.00098

Tableau 7 : Résultat des paires de Fst

Matric of significant Fst P values			
Significance Level = 0,05			
Number of permutaions = 100			
	<i>T.calobuxus</i>	<i>T.capitulata</i>	<i>T.yateensis</i>
<i>T.calobuxus</i>	-	-	-
<i>T.capitulata</i>	-	-	-
<i>T.yateensis</i>	-	-	-

II. Discussion

Rappel des objectifs : mettre au point un outil, d'approche moléculaire, permettant de discriminer les espèces de *Tristaniopsis*, principalement celles qui sont protégées car inscrites sur la liste rouge de l'UICN, *T.polyandra* et *T.yateensis*.

Bien que communément les locus chloroplastiques soient les plus utilisés pour du « code barre ADN » sur les végétaux (Hollingsworth *et al.*, 2011), c'est à partir du génome nucléaire, que les meilleurs résultats ont été obtenus dans nos travaux. Ceci s'explique par le fait que nous avons choisi principalement des régions codantes pour nos locus chloroplastiques, *a contrario* de ce qui a été fait pour le génome nucléaire.

D'une manière générale, les analyses réalisées sur les séquences montrent toutes que les marqueurs ETS et ITS permettent de différencier neuf espèces sur douze, dont une des deux espèces protégées, *T.polyandra*. Ce qui n'a pas été possible pour *T.yateensis* qui fait partie du groupe des trois espèces non différenciables par approche moléculaire avec *T.calobuxus*, et *T.capitulata*. La quasi totalité des taxons moléculaires mis en évidence coïncident donc bien avec la détermination botanique des espèces, avec une particularité pour l'espèce *T. lucida* qui est divisée en deux unités taxonomiques moléculaires bien distinctes. Chacune de ces unités se révélant être liées au substrat fréquenté, ultramafique ou volcano-sédimentaire.

Concernant les neuf espèces différenciées. On remarque que l'espèce *T.minituflora* est une espèce très éloignée génétiquement des autres, avec 67 nucléotides variables sur 122 variations rien que pour le marqueur ETS. D'un point de vue botanique cette espèce se différencie des autres *Tristaniopsis* néo-calédoniens par les capsules de ces fruits qui sont pubescentes. Il est observé également pour cette espèce une différenciation génétique en fonction des sites géographiques fréquentés (Mont Kaala et Comboui) qui n'est pas en relation avec une différence de substrat. Les deux sites étant très éloignés géographiquement l'un de l'autre, et séparés par la barrière naturelle qu'est la dorsale montagneuse du centre de l'île, il est possible que ces populations aient évolué de manière différente en l'absence de flux de gènes homogénéisateurs entre elles. Cette absence d'échange de matériel génétique entre les populations des deux sites peut avoir favorisé l'émergence de deux variétés, voir écotypes, pour l'espèce *T.minituflora*, et conduire à terme à de la spéciation.

T.glauca, *T.macphersonii*, *T.vieillardii* et *T.nindoensis* sont des espèces dont l'ensemble de leurs représentants, quelque soit les sites fréquentés, se retrouvent respectivement dans des unités taxonomiques moléculaires homogènes bien distinctes. Ainsi, les taxons moléculaires coïncident bien avec les espèces déterminés par les botanistes.

L'espèce *T.polyandra*, qui est une des espèces protégées, est différenciée. Il faudrait cependant pousser l'échantillonnage afin de confirmer les résultats car trop peu d'individus ont pu être analysés pour certifier ces résultats. Il en est de même pour l'espèce *T.reticulata*.

Enfin, l'espèce *T.guillainii* se distingue des autres. C'est l'espèce qui présente le plus de variabilité intra-espèce. Les résultats révèlent quatre sous-unités moléculaires au niveau des seules séquences effectuées à partir du génome nucléaire. Il est reconnu à l'échelle du territoire deux variétés botaniques, déterminables par le nombre de fleurs et d'étamines par faisceaux, pour cette espèce, malheureusement aucun bouquet floral n'ayant été aperçu sur le terrain durant le temps imparti à nos travaux, leur identification n'a pas été possible. Il n'a donc pas pu être possible de relier un ou plusieurs sous-unités moléculaires à l'un ou l'autre de ces variant.

Tous les résultats obtenus confirment le regroupement des espèces *T. calobuxus* *T. capitulata* et *T. yateensis* en un unique taxon moléculaire. Aucuns des douze marqueurs moléculaires testés sur ces trois espèces n'a montré de variabilité pouvant les différencier. De plus, le marqueur matK, présente quatre sous taxons pour *T.calobuxus* qu'il partage avec les deux autres espèces, ce qui confirme bien la proximité génétique de ces espèces.

L'initiation d'une étude d'analyse de la diversité par génotypage, généralement réservée à des niveaux taxonomiques de l'ordre du complexe d'espèce, à de l'intra-spécifique, approche fine, a révélé l'existence d'un pool d'allèles commun partagé entre ces trois espèces. Ce résultat reste cependant à consolider par un échantillonnage d'un plus grand nombre d'individus par espèce. Cette approche pourrait également être élargie aux autres espèces de *Tristaniopsis* néo-calédoniens pour avoir une idée précise de la répartition de ces allèles en fonction des espèces étudiées.

Plusieurs explications sont possibles :

- Un problème d'identification des espèces : sachant que les individus ont été récoltés hors période de floraison et de fructification, il faudrait revenir sur les arbres échantillonnés afin de vérifier avec certitudes l'identification de ces espèces.
- Les marqueurs choisis ne sont peut-être pas assez discriminant pour ces trois espèces, bien que cette hypothèse soit peu probable vu le nombre et le panel de marqueurs moléculaires testés.
- Il est possible que ces trois espèces soient en phase initiale de radiation, et donc puissent échanger des flux de gènes entre-elles (ce qui est le cas). Ce qui expliquerait l'impossibilité de les différencier avec les marqueurs moléculaires mis en place dans ce travail (les lignées ayant récemment divergées peuvent partager des haplotypes anciens (Slowinsky et Page 1999)). Il serait alors

souhaitable d'approfondir l'étude de génotypage (par microsatellites), aux niveaux des différentes populations existantes pour chaque espèce, et conduire également des études de descendance, afin de mieux appréhender le fonctionnement des flux de gènes entre elles.

- Enfin, il est aussi possible que les caractères retenus (hauteur de l'arbre, taille des fleurs, position de l'inflorescence, et nombre d'étamine par faisceaux) pour la systématique botanique ne soient pas pertinents, et qu'il s'agisse en fait d'une seule et même espèce. Il est connu que certains caractères de systématique classique, peuvent être soumis à variation en fonction des environnements rencontrés et/ou des stades de vie de la plante (Slowinsky et Page, 1999).

Bien que les données génétiques puissent indiquer un complexe d'espèces, il reste pertinent de conserver une approche intégrative avec des données morphologique et écologique pour s'assurer que la variation n'est pas le reflet d'une forte variation intra-spécifique.

L'utilité de l'intégration de la taxonomie moléculaire comme outil d'aide à la décision dans un contexte d'inscription, ou pas, d'une espèce sur la Liste Rouge de l'IUCN

L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature est la plus grande et la plus ancienne des organisations globales environnementales au monde. Elle développe et soutient la science de la conservation, particulièrement en ce qui concerne les espèces, les écosystèmes, la diversité biologique et leur impact sur les moyens de subsistance des être humains. Elle a également une très forte influence au niveau mondial. Effectivement, elle soutient les gouvernements, les organisations non gouvernementales, les conventions internationales, les organisations des Nations Unies, les sociétés et les communautés, en vue de développer des lois, des politiques et de meilleures pratiques.

Le travail de l'IUCN sur la biodiversité consiste à des recherches approfondies (statut de la biodiversité). Elle travaille également sur des actions pour protéger certaines espèces spécifiques, sur la gestion et la restauration de zones naturelles, ainsi que sur l'incitation à une utilisation durable des ressources naturelles. Afin d'agir efficacement, elle a créé des normes et des outils étant des références locales mais aussi mondiales, et permettant d'influencer les politiques de conservations du monde entier. Un des ces outils est le Liste Rouge des espèces menacées.

La Liste Rouge des espèces menacées répertorie l'ensemble des données les plus récentes sur l'état de la biodiversité et des menaces qu'elle subit. C'est un outil inestimable pour éclairer les actions de conservation axées sur les espèces et pour identifier des sites d'importances mondiales pour la conservation. Elle permet aussi de suivre dans le temps les risques d'extinction des espèces.

Les espèces de la liste sont classées selon neuf catégories, chaque catégorie étant complétée par des critères quantitatifs pour préciser la nature du risque.

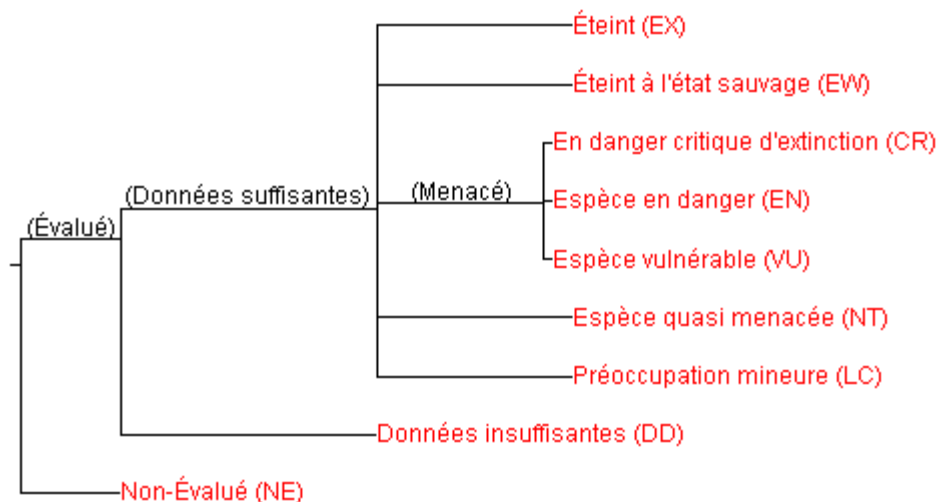


Figure 11 : Les différentes catégories utilisées par l'UICN (rouge). Source : UICN 2001 vers.3.1.

La classification d'une espèce ou sous-espèce dans la liste s'établit suivant cinq critères biologiques souvent associés au risque d'extinction : la taille de population, le taux de déclin, l'aire de répartition géographique, le degré de peuplement et la fragmentation de la répartition.

Les critères sont basés sur les données spécifiques de la distribution, l'évolution géographique et celle des effectifs. Faut-il encore savoir bien déterminer les espèces, l'approche par code-barres ADN est un excellent outil de d'appui dans ce sens. Il permet suivant le choix du marqueur de distinguer les genres et les espèces entre elles présentant une forte plasticité phénotypique qui rend difficile leurs reconnaissances. Pour preuve, des projets d'inventaire de la diversité ont déjà fait usage de cette approche (Pfenninger *et al.*, 2007).

De plus, la classification de la Liste Rouge se porte sur les espèces, sous-espèces, variétés voir sous-population. Il est très difficile de classer ces catégories par voie classique, la méthode de détermination moléculaire pourrait être d'une aide précieuse.

Le concept d'espèce est central bien que très controversé dans les politiques de conservation, et l'application des lois dépendent largement de la définition de ce concept en est tributaire. Etant donnée le flou entourant la notion d'espèce, si tout les décideurs ne sont pas en accord avec une unique définition, l'interprétation de la liste peut être entendue différemment. Cela peut entraver l'application des actions de conservation.

Rappelons, que la liste rouge des plantes présente seulement 11 901 espèces sur 287 000 espèces répertoriées soit à peine 4% du total (version 2006 de la liste rouge de l'UICN). L'approche moléculaire permettrait d'amender les connaissances acquises, et *in fine* de combler les lacunes ou corriger les erreurs en cours.

Conclusion

L'objectif du stage a été partiellement atteints. Effectivement, nous avons pu différencier neuf espèces de *Tristanopsis* sur les douze, dont l'espèce *T.ployandra* figurant sur la liste rouge de l'UICN, avec les locus nucléaires ETS et ITS. Cependant, nous n'avons pas pu différencier *T.yateensis*, autres espèces protégées. Ce résultat nous amène à nous poser des questions sur le statut de *T.yateensis*.

Quelques recommandations sont à faire :

- Il faut compléter l'inventaire des *Tristanopsis*, car il manque une espèce à cette étude et en augmentant le nombre de site et le nombre d'individus par site. Il faut également affiner la prospection sur les différents milieux et types de sols..
- Il faudrait également réaliser une approche génotypique beaucoup plus approfondis sur les espèces non différencié, en prenant en compte plus d'individus et de lieux. Cette étude pourrait être élargie aux autres espèces de *Tristanopsis*.

La question autour du statut de *T.yateensis* est importante. Etant une espèce répertoriée dans la Liste Rouge de l'UICN, la reconnaissance d'une telle espèce sur un site peut remettre en cause l'exploitation de celui-ci. Cela peut donc avoir des fortes répercussions économiques (arrêt des travaux), et avoir une large portée sociale et environnementale (protection d'un patrimoine culturelle et de la flore endémique).

Nous avons observé que l'outil moléculaire pour la différenciation des espèces est une approche utile. Cette approche présente certaines limites qui sont liées à la stratégie d'échantillonnage des espèces ainsi qu'au nombre et au choix des locus. Cela ne remet pas en cause la viabilité de l'approche « code-barres ADN », qui reste une démarche fiable et informative.

Bibliographie

Ayrault N, 2001. La revégétalisation minière en Nouvelle-Calédonie : essai et solutions techniques. France : ISTOM, 89p.

DAWSON J. W. 1992. — Myrtaceae-Leptospermoideae, in MORAT P. & MACKEE H. S. (eds), *Flore de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances*. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris: 1-251

Doyle J.J., Doyle D.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of Individuals using the software STRUCTURE : a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.

Excoffier L., Smouse P., Quattro J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Guillon, J. H. 1975. Les massifs péridotitiques de Nouvelle-Calédonie. *Mémoire ORSTOM* 76: 1-120

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003, Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 313–321.)

Hollingsworth P.M., Graham S.W., Little D.P., 2011, Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE* 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254

Jaffré T. 1980. Etude écologique du peuplement végétal des sols dérivés de roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie. *Travaux et Documents*, n°124, ORSTOM, Paris : 1980 ; 274p.

Jaffré T. 1996. Etude comparative des formations végétales et des flores des roches ultramafiques de Nouvelle-Calédonie et d'autres régions tropicales du monde. In : *Phytogéographie tropicale, réalités et perspectives* (eds Guillaumet J.L., Berlin M.) pp. 137-149. *Colloques et Séminaires ORSTOM*, Paris.

Jaffré T., Morat P., Veillon J.M., MacKee H.S. 1987. Changements dans la végétation de la Nouvelle-Calédonie au cours du Tertiaire : la végétation des roches ultrabasiques. *Bulletin Musée national d'Histoire naturelle, section B, Adansonia*, n°4 : 273-288.

Jaffré T., Veillon JM. 1994. Les principales formations végétales autochtones en Nouvelle-Calédonie : caractéristiques, vulnérabilité, mesures de sauvegarde. *Rapports de synthèses, Science et Vie, Biodiversité, Nouméa* 12p.

- Jaffré T., Munzinger J., Lowry P.P. (2010) Threats to the conifer species found on New Caledonia's ultramafic massifs and proposals for urgently needed measures to improve their protection. *Biodivers Conserv* 19:1485–1502.
- Kress J.W., Wurdack K.J., Zimmer E.A., 2005, Use of DNA barcodes to identify flowering plants,....
- L'Huillier L., Jaffré T. et Wulff A. (2010). Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. 1^{ière} édition. Nouméa, Nouvelle-Calédonie : Editions IAC, 412p.
- Lahaye R., van der Bank M., Bogarin D., Warner J., 2007, DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105, 2923-2928.
- Les dossiers thématique de l'IRD, De la plante au médicament : une passerelle entre tradition et science, <http://www.mpl.ird.fr/suds-en-ligne/fr/plantes/index.htm> On line 06/06/2012
- Meyers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B., Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403 : 853-858.
- Morat P. 1993. Our knowledge of the flora of New Caledonia : Endemism and Diversity in relation to vegetation types and substrates. *Biodiversity letters* 1 : 72-81.
- Morat P., Jaffré T., Veillon J.M. 1999. Menaces sur les taxons rares et endémiques de la Nouvelle-Calédonie. *Bulletin de la Société Botanique du Centre Ouest* Numéro spécial 19 : 129-144
- Nei M., (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89 : 583-590.
- Paris J.P. 1981. Géologie de la Nouvelle-Calédonie. Un essai de synthèse Mém. N°113, Bureau de Recherche Géologiques et Minière, Orléans 278p.
- Pimm, S.L., and R.A.Askins. 1995. Forest losses predict bird extinction in eastern North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 92:9343-9347.
- Sarrailh J.M. 2002. La revégétalisation des exploitations minières : l'exemple de la Nouvelle-Calédonie. *Bois et Forêt des Tropiques*, n°272 : 2002, pp.21-31.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000) ARLEQUIN : a software for population genetics data analysis. In: *Genetics and Biometry Laboratory*. Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Slowinski, J. and Page, R.D.M. (1999) How should species phylogenies be inferred from sequence data? *Syst. Biol.*, 105, 147–158.
- Suprin B. 2011. Florilège des plantes en Nouvelle-Calédonie. Nouméa : Editions Photosynthèse, Tome 1 : 519p. , Tome 2 : 495p.
- Wright S., 1978 *Evolution and the Genetics of Populations, Vol.4, Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.

Sites internet:

Endemia. 2012. *Tristaniopsis*. [On-line].[14/02/2012]. <URL : <http://www.endemia.nc/flore/fiche1032.html>>.

CNRT Nickel et son environnement, [On-line].[14/02/2012].
<http://www.cnrt.nc/index.php?page=attribue_details&attr_id=11&attr=2&year=2009&month=&curpage=>

Isee-NC, 2009

Liste rouge IUCN : [On-line].[14/02/2012]. <<http://www.iucnredlist.org>>

Météo de Nouvelle-Calédonie : www.meteo.nc/climat/climat-en-nc

Table des annexes

Annexe 1 : Classification des <i>Tristaniopsis</i> sur la Liste Rouge de l'UICN.....	55
Annexe 2 : Réalisation des PCR : concentration des produits du mélange réactionnel et programmes du thermocycleur	56
Annexe 3 : Réalisation de la réaction de séquence : concentration des produits du mélange réactionnel et programme du thermocycleur.....	57
Annexe 4 : Base de données des caractères morphologiques des espèces de <i>Tristaniopsis</i> (3pages)	58
Annexe 5 : Récapitulatif des SNP et insertions/délétions par locus.....	61
Annexe 6 : Exemple de Base de données (marqueur ETS)	62
Annexe 7 : Cladogramme de 8 espèces de <i>Tristaniopsis</i> avec la combinaison des marqueurs ETS, ITS, HA et matK.....	63
Annexe 8 : ACP sur tous les individus de <i>Tristaniopsis</i> avec la combinaison des marqueurs ETS et ITS.....	64
Annexe 9 : ACP sans <i>T.minituflora</i> avec la combinaison des marqueurs ETS et ITS	64

Annexe 1 : Classification des *Tristaniopsis* sur la Liste Rouge de l'UICN. Source : <http://www.iucnredlist.org/>

[Tristaniopsis lucida](#)

Status: Lower Risk/conservation dependent [ver 2.3](#)
(needs updating)

[Tristaniopsis macphersonii](#)

Status: Vulnerable D2 [ver 2.3](#)
(needs updating)

[Tristaniopsis minutiflora](#)

Status: Vulnerable B1+2c [ver 2.3](#)
(needs updating)

[Tristaniopsis polyandra](#)

Status: Endangered B1+2c [ver 2.3](#)
(needs updating)

[Tristaniopsis reticulata](#)

Status: Vulnerable B1+2c [ver 2.3](#)
(needs updating)

[Tristaniopsis vieillardii](#)

Status: Vulnerable B1+2c [ver 2.3](#)
(needs updating)

[Tristaniopsis yateensis](#)

Status: Endangered B1+2c [ver 2.3](#)
(needs updating)

Annexe 2 : Réalisation des PCR : concentration des produits du mélange réactionnel et programmes du thermocycleur

Produits	Concentration finale		Volume pour 1 réaction (µl)	
Tampon 5X	1 X		4.00	
MgCl ₂ (25mM)	1.5mM		1.20	
dNTP (10mM)	0.1 mM		0.20	
Primer-F (10µM)	0.1µl	0.2µl	0.20	0.40
Primer-F* (10µM)	0.1µl	-	0.20	-
Primer-R (10µM)	0.2µl		0.40	
Taq 5U/µl	0.032U/µl		0.13	
H ₂ O	-		9.67	
Volume mix	-		16	
Volume d'AND (à 10 ng/µl)	-		4	
Volume final (µl)	-		20	

* amorces marquée par un fluorochrome

Spécifique au génotypage

Programme PCR pour le séquençage				Programme PCR pour le génotypage			
Etape	Temps	Température (°C)	Nb de cycles	Etape	Temps	Température (°C)	Nb de cycles
Dénaturation initiale	5min	94°C	1	Dénaturation initiale	94°C	3min	1
Dénaturation	45sec	94°C		Dénaturation	94°C	30sec	
Hybridation	Suivant le marqueur	Suivant le marqueur	30	Hybridation	55°C	45sec	35
Elongation	1min	72°C		Elongation	72°C	30sec	
Elongation finale	10min	72°C	1	Elongation finale	72°C	5min	1

Annexe 3 : Réalisation de la réaction de séquence : concentration des produits du mélange réactionnel et programme du thermocycleur

Produits	Concentration finale	Volume pour 1 réaction (µl)
Buffer (5X)	0.75X	0.75
Primer-R ou F (10µM)	0.50mM	0.25
RRP (2.5X)	0.125X	0.25
H2O	-	2.75
Volume mix	-	4
Volume produit PCR (à 20 ng/µl)	-	1
Volume final (µl)	-	5

Etape	Temps	Température (°C)	Nb de cycles
Dénaturation initiale	1min	96°C	1
Dénaturation	10sec	96°C	
Hybridation	5sec	50°C	60
Elongation	4min	60°C	
Elongation finale	7min	15°C	1

Annexe 4 : Base de données des caractères morphologiques des espèces de *Tristaniopsis* (3pages)

Espèce	Taille arbre	Ecorce	Feuille adultes		
<i>Tristaniopsis calobuxus</i>	0,5-4m	Lisse gris claire/brun	Largeur au moins 3/4 longueur	1 - 4 x 1 - 2 cm	obtus au sommet, arrondi à la base
<i>Tristaniopsis capitulata</i>	20m	Fissurée/écailleuse	Largeur au moins 1/2 longueur	5 - 10 x 1,5 mm	ondulé, arrondi au sommet, en coin atténué à la base
<i>Tristaniopsis yateensis</i>	2-6m	Fibreuse brun claire	Largeur au moins 2/3 longueur	9 - 13 x 3,5 - 5,5 mm	arrondies au sommet, en coin à la base.
<i>Tristaniopsis Guillainii</i>	0,5-15m	Lisse gris claire	Largeur au moins 2/3 longueur	5 - 20 x 1,5 - 2,5 mm	sommet aigu parfois acuminé à obtus, à base atténuée ou en coin et étroitement atténuée
<i>Tristaniopsis polyandra</i>	10m	Lisse blanchâtre/rouge pourpre	Largeur au moins 2/3 longueur	4 - 9 x 1,5 - 4 cm	aiguës avec une pointe recourbée ou obtuses au sommet, en coin à la base; marge révoluée et ondulée
<i>Tristaniopsis reticulata</i>	5-25m	Lisse gris rosé/pourpre	Largeur au moins 2/3 longueur	5 - 10 x 2 - 5 cm	aiguës, obtuses ou avec une pointe recourbée au sommet, atténuées à la base; marge épaissie; réseau de nervilles nettement réticulé en dessous.
<i>Tristaniopsis macphorsonii</i>	4-6m	Rugeuse gris/brun	Largeur au moins 1/2 longueur	6 - 10 x 1 - 2 mm	limbe un peu ondulé, sommet aif u à obtus, étroitement atténuée à la bas en coin
<i>Tristaniopsis minutiflora</i>	10m	Lisse rougâtre claire	Largeur au moins 2/3 longueur	17 - 4 x 7 - 9 mm	obtus au sommet, en coin à la base.
<i>Tristaniopsis glauca</i>	1-6m	Rugeuse brun clair	Largeur au moins 1/3 longueur	7 - 12 x 2 - 3,5 cm	aiguës ou obtuses au sommet, en coin à la base, les adultes bien glauques.
<i>Tristaniopsis ninndoensis</i>	3m	Lisse gris claire/rougeâtre	Largeur au moins 2/3 longueur	6 - 8,5 x 2 - 4 cm	arrondies au sommet, atténuées à la base
<i>Tristaniopsis Vieillardii</i>		Lisse brun foncé/noir	Largeur au moins 2/3 longueur	9 - 10 x 1 - 2 mm	obtus à arrondi au sommet, en coin étroitement atténué à la base
<i>Tristaniopsis lucida</i>	12-25m	Lisse violet/gris/rose/brun	Largeur au moins 2/3 longueur	5 - 10 x 2,5 - 5,5 cm	arrondies ou rétuses au sommet, en coin à la base, brillantes des 2 côtés; marge ondulée;

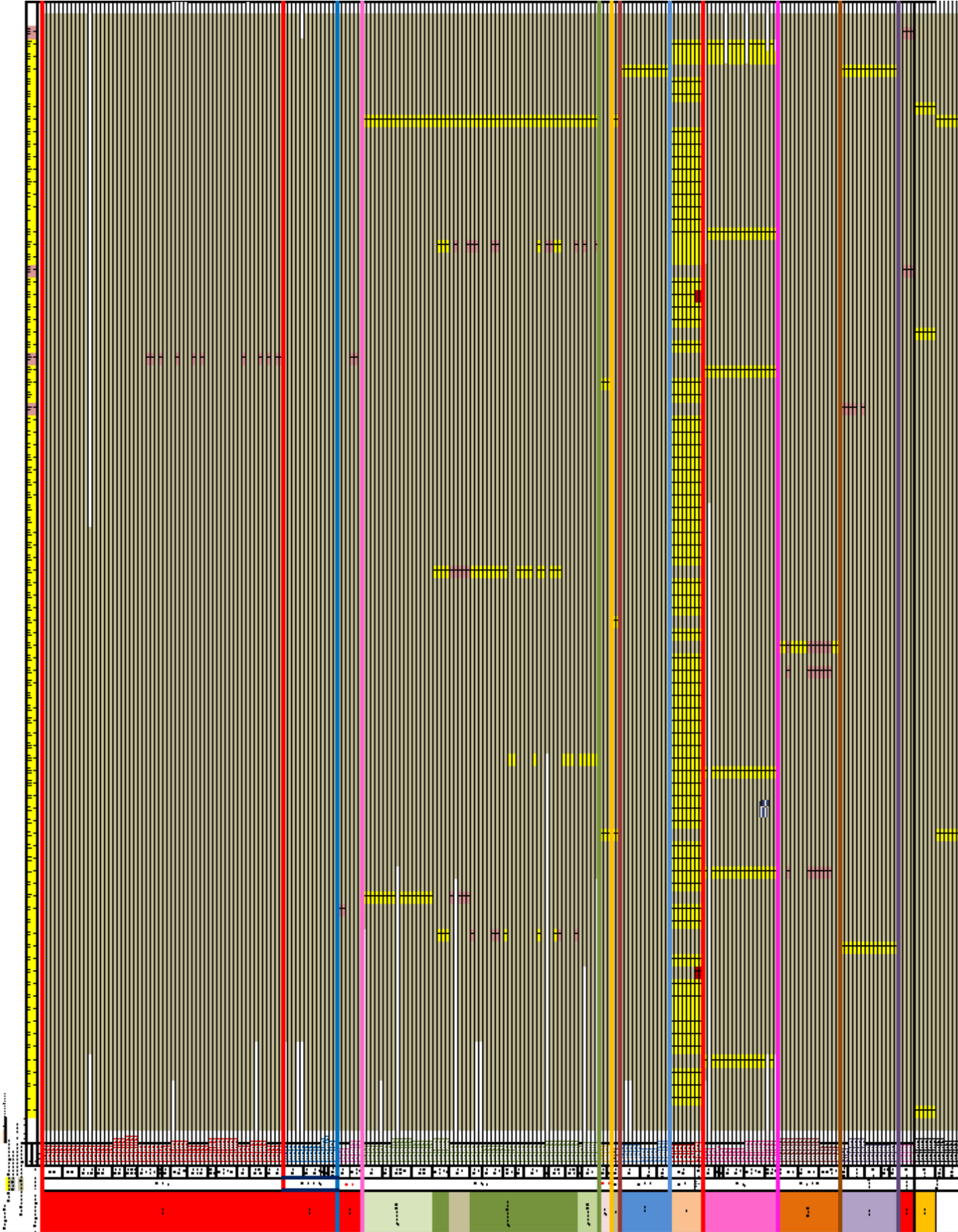
Espèce	Etamines par faisceau	Phénologie	Ovaires	Reproduction	Fruit
<i>Tristaniopsis calobuxus</i>	8 à 12 soudé à la base	inflorescences courtes au sommet des axes, entièrement velues	presque supère	Floraison et fructification étalées sur toute l'année.	Capsules arrondies
<i>Tristaniopsis capitulata</i>	7 à 11	inflorescences courtes à l'aisselle des feuilles	presque supère	Fleur °+ Fruit juin à décembre	capsules non déprimées au sommet
<i>Tristaniopsis yateensis</i>	1 à 2 soudé à la base	inflorescences courtes, axillaires au bout des axes	supère	Floraison en novembre - décembre. Fructification en janvier - février.	Capsules glabrescentes
<i>Tristaniopsis Guillainii</i>	15 à 70 soudé à la base	inflorescence courte à l'aisselle des feuilles de l'extrémité de rameaux	presque supère	Fleur + Fruit mars à décembre	capsules non déprimées au sommet
<i>Tristaniopsis polyandra</i>	30-50 soudé à la base	inflorescences axillaires et courtes au bout des axes	semi-infère	Fleurs observées en août. Fruits observés en janvier.	Capsules arrondies.
<i>Tristaniopsis reticulata</i>	50 à 60 soudé à la base	des inflorescences axillaires, longues portant	semi-infère	Fleurs observés en avril - août. Fruits en novembre - février.	Capsules grosses, déprimées au sommet
<i>Tristaniopsis macphorsonii</i>	3 à 5 presque libres	inflorescences courtes à l'aisselle de feuilles réduites sur l'extrémité de rameaux ordinaires	semi-infère	Fleur Août à Novembre	inconnu
<i>Tristaniopsis minutiflora</i>	1 à 2 soudé à la base	inflorescences courtes, axillaires au bout des axes	semi-infère	Fleur+Fruit novembre à mars.	Capsules pubescentes
<i>Tristaniopsis glauca</i>	4 à 9 soudé à la base	inflorescences axillaires ou terminales	semi-infère	Fleur+Fruit l'ensemble de l'année.	Capsules un peu déprimées au sommet.
<i>Tristaniopsis ninndoensis</i>	30 à 35 soudé à la base	inflorescences copieuses, pourvues d'un pédoncule aplati, axillaires ou terminales	semi-infère	Fleur + Fruit juin-décembre	Capsules immatures, déprimées au sommet.
<i>Tristaniopsis Vieillardii</i>	6 - 7 soudé à la base	inflorescences courtes à l'aisselle de feuilles	presque supère	Fleur Septembre-Novembre	capsules non déprimées
<i>Tristaniopsis lucida</i>	4 soudé à la base	inflorescences courtes axillaires au bout des axes	presque supère	Fleur Juillet-Novembre	inconnue

Espèce	Répartition en NC	Habitat	Substrat
<i>Tristaniopsis calobuxus</i>	Grande Terre, surtout sur substrat minier	Dans le maquis.	Surtout sur les sols ferrallitiques plus ou moins acides et parfois sur des sols magnésiens, sur substrat ultramafique et . également sur les terrains métamorphiques du Nord du Territoire.
<i>Tristaniopsis capitulata</i>	côte est et sud	forêt basse et maquis sur sol rocheux	Sur sol gravillonnaire colluvial, ferrallitique ou plus ou moins érodé sur substrat ultramafique.
<i>Tristaniopsis yateensis</i>	Sud de la Grande Terre	En forêt basse et humide et dans le maquis	Sur sol gravillonnaire colluvial, ferrallitique ou plus ou moins érodé sur substrat ultramafique.
<i>Tristaniopsis Guillainii</i>	Grande Terre, surtout sur substrat minier	dans le maquis	Sur sol plus ou moins profond, colluvial, ferrallitique gravillonnaire, ou plus ou moins érodé sur substrat ultramafique
<i>Tristaniopsis polyandra</i>	Sud de la Grande Terre	Dans le maquis arbustif sur pente rocheuse.	Sur sol rocheux ou fortement érodé sur substrat ultramafique.
<i>Tristaniopsis reticulata</i>	Extrême Sud de la Grande Terre + un peu sur la côte sud-est	En forêt humide et dans le maquis sur pente.	Sur sol plus ou moins profond ou plus érodé sur substrat ultramafique.
<i>Tristaniopsis macphorsonii</i>	Sud de la Grande Terre + Côte Est	Dans le maquis	Sur sol plus ou moins profond, colluvial, ferrallitique gravillonnaire, ou plus ou moins érodé sur substrat ultramafique
<i>Tristaniopsis minutiflora</i>	Nord-Ouest de la Grande Terre + Sud Est	dans le maquis ouvert, sur pente.	Sur sol plus ou moins érodé sur substrat ultramafique.
<i>Tristaniopsis glauca</i>	Extrême Sud de la Grande Terre	Dans le maquis	Sur sol plus ou moins profond, colluvial, ferrallitique gravillonnaire, ou plus ou moins érodé sur substrat ultramafique
<i>Tristaniopsis ninndoensis</i>	Nord de la Grande Terre	Dans le maquis rabougri et clairsemé.	Sur sol fortement érodé sur substrat siliceux.
<i>Tristaniopsis Vieillardii</i>	côte est et sud	dans le maquis	Sur sol plus ou moins profond, colluvial, ferrallitique gravillonnaire, ou plus ou moins érodé sur substrat ultramafique
<i>Tristaniopsis lucida</i>	Sud de la Grande Terre	En forêt dense humide	Sur sol colluvial plus ou moins profond sur substrat ultramafique.

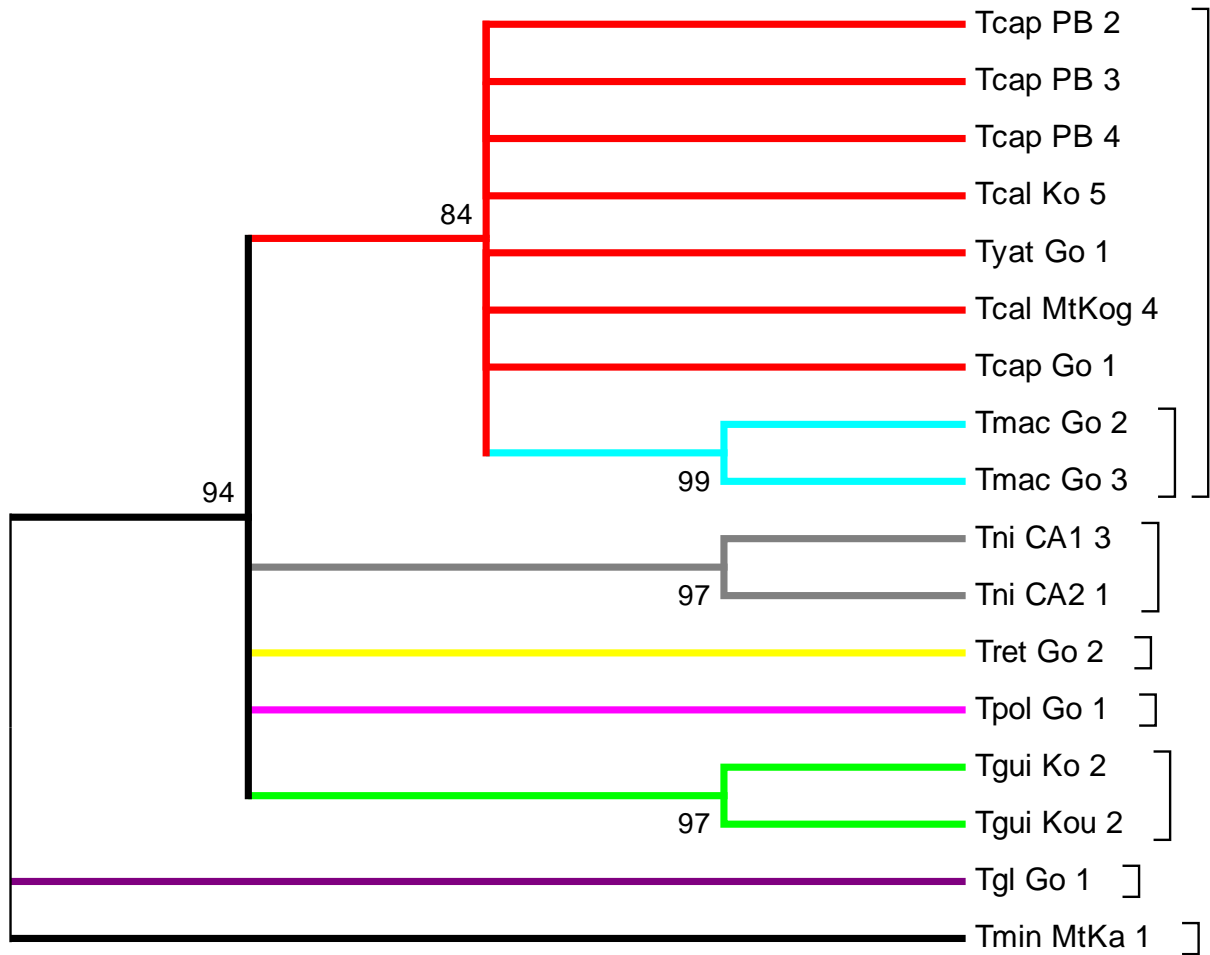
Annexe 5 : Récapitulatif des SNP et insertions/délétions par locus

	ETS	ITS	HA	<i>matK</i>	<i>trnTF</i>
Taille séquence obtenue (pb)	471	500	594	777	728
Nombre de SNP	110	43	79	38	0
Nombre d'Insertion/délétion	12	5	82	0	3
Total	122	48	38	3	161

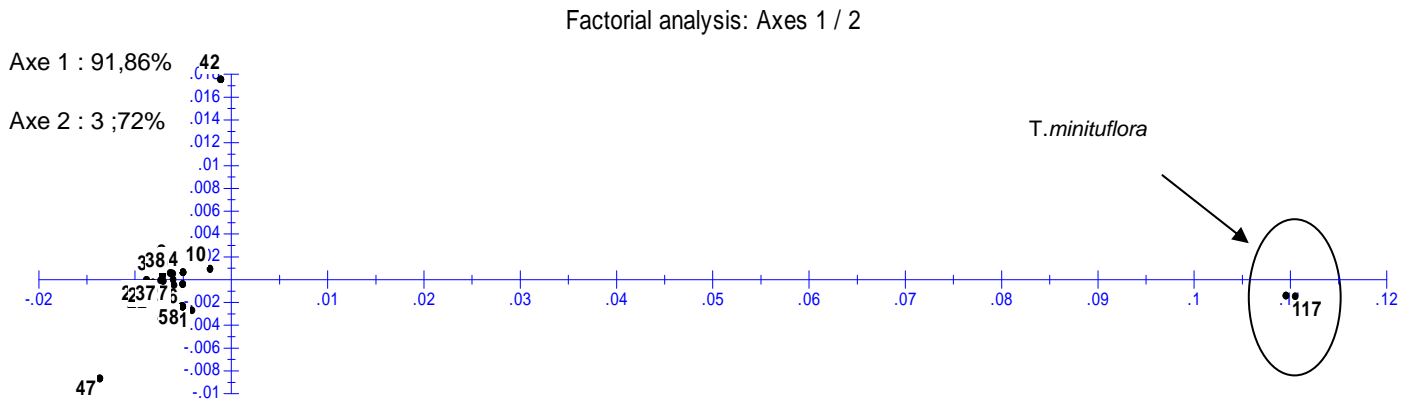
Annexe 6 : Exemple de Base de données (marqueur ETS)



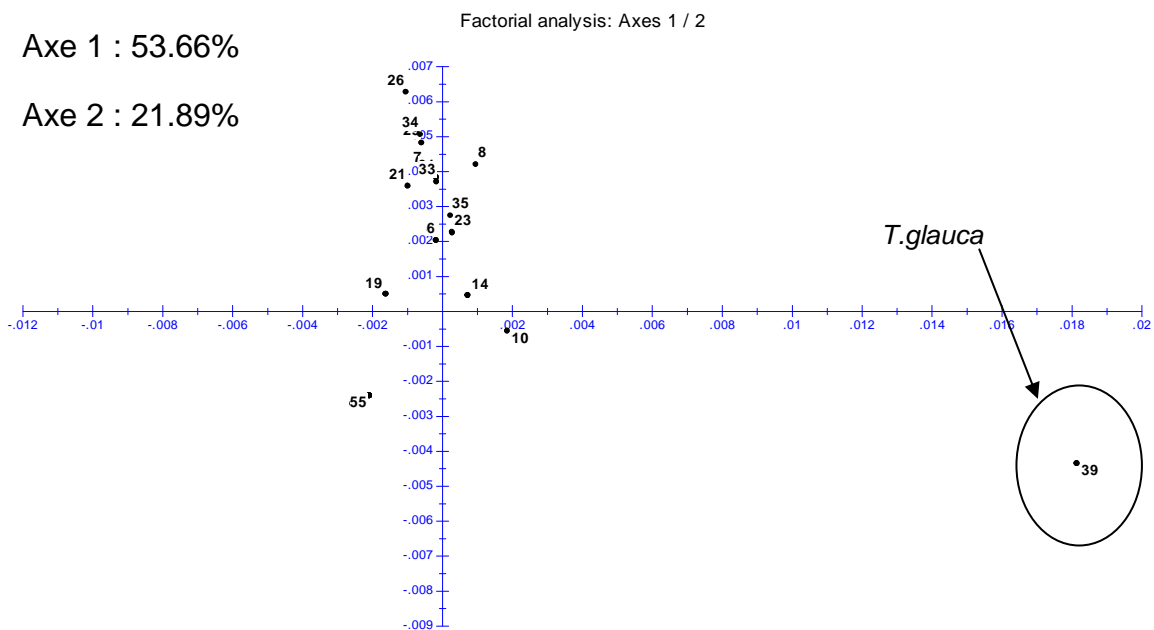
Annexe 7 : Cladogramme de 8 espèces de *Tristaniopsis* avec la combinaison des marqueurs ETS, ITS, HA et matK



Annexe 8 : ACP sur tous les individus de *Tristaniopsis* avec la combinaison des marqueurs ETS et ITS



Annexe 9 : ACP sans *T.minutiflora* avec la combinaison des marqueurs ETS et ITS



Résumé

Du fait de sa flore exceptionnellement riche et de son fort taux d'endémisme, la Nouvelle-Calédonie est classée parmi les 25 *hotspots* du monde. Cependant, pour faire face au développement de l'activité minière, elle se doit d'associer intérêt économique et préoccupation écologique. C'est dans ce cadre que se développent les projets de restauration des sites dégradés par l'exploitation des mines, tel le projet Ecomine-Biotop dans lequel s'insère la problématique de mon stage au sein de l'Institut Agronomique néo-Calédonien. L'objectif de mon stage consiste, à trouver un outil moléculaire permettant de différencier les espèces de *Tristaniopsis* (espèce de référence pour la revégétalisation) qui sont très proches phénotypiquement. Le but principal de ce travail est de permettre une meilleure identification des espèces protégées du genre *Tristaniopsis*. Nous avons donc réalisé une approche code-barres ADN avec l'utilisation de plusieurs loci. Nous avons réussi à discriminer neuf espèces sur douze avec les locus nucléaires ETS et ITS. Trois espèces ne se différencient pas les unes des autres, dont une espèce protégée. Les résultats suggèrent que l'utilisation d'une approche moléculaire pourrait être pertinente pour affiner la taxonomie des végétaux. La mise au point d'un outil basé sur cette approche moléculaire permettrait un véritable appui à la prise de décisions dans le cadre des projets de conservation de la biodiversité.

Mots-Clefs : conservation, espèces protégées, Nouvelle-Calédonie, outil moléculaire, *Tristaniopsis*

Summary

Because of its exceptionally rich flora and its high rate of endemism, New Caledonia is ranked among the top 25 *hotspots* in the world. However, in order to facing with the development of mining activity, New Caledonia must combine economic interest and environmental concern. In this context, projects for the restoration of sites degraded by mining, as the Ecomine-Biotop project, tend to be developed. The topic and aim of my internship at the Institute of Agronomy in New Caledonia is to find a molecular tool allowing differentiating species of *Tristaniopsis* (considered as a species of reference in revegetation) which have very similar phenotypes. The primary purpose of this research is to enable identifying protected species of *Tristaniopsis* genera. We therefore carried out a DNA bar coding using multiple loci. We managed to distinguish nine species out of twelve with nuclear loci ETS and ITS. Three species did not differ from one another, including one protected species. Results suggest that molecular approach could be appropriate to refine plant taxonomy. Such tool could be a real contribution to support decision-making relating to biodiversity conservation projects.

Key-Words : conservation, protected species, New Caledonia, molecular tool, *Tristaniopsis*

Resumen

A causa de su flora excepcionalmente rica y su alto nivel de endemismo, la Nueva Caledonia se posiciona entre los 25 primeros *hotspots* del mundo. Sin embargo, para hacer frente al desarrollo de la minería, la isla se debe de combinar interés económico y preocupación ambiental. En este contexto, aparecen proyectos para la restauración de los suelos degradados, tal como el proyecto Ecomine-Biotop. Mi misión durante mi práctica en el Instituto de Agronomía en Nueva Caledonia, es encontrar un herramienta molecular para permitir diferenciar entre la especies de *Tristaniopsis* (especie de referencia para la revegetación), que son muy similares fenotípicamente. La meta principal de este trabajo es permitir la identificación de las especies protegidas de *Tristaniopsis*. Así que usamos un metodo de código de barras para el ADN con el uso de múltiples loci. Observamos que podemos distinguir nueve especies sobre doce con loci nucleares ETS e ITS. Tres especies no difieren entre sí, una de ellas especie protegida. Los resultados nos llevan a preguntarnos si el uso de un enfoque molecular no sería más adecuado para redefinir la clasificación de la taxonomía de las plantas. Tal herramienta sería sin duda un verdadero apoyo a la toma de decisiones en el cuadro de proyectos relativos a la conservación de la biodiversidad.

Palabras Llaves: conservación, especies protegidas, Nueva-Caledonia, herramienta molecular, *Tristaniopsis*